

---

## REVISIONES

### Revisión del papel de los radicales libres en la secuencia isquemia-revascularización

#### Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury

Fernando Vaquero Morillo - Rafael Fernández-Samos - Camino Fernández Moran - Oscar Morán de la Torre- Raquel Arias Bardón - Anabel Barrios Castro - José Manuel Ortega Martín - Jorge García Vázquez - Andrés Zorita Calvo

---

**Servicio de Angiología y Cirugía Vascular.  
Hospital de León (Jefe del Servicio: Fernando  
Vaquero Morillo). León (España)**

---

#### RESUMEN

El fenómeno Isquemia-Revascularización es un tema de controversia al no estar perfectamente aclarada su etiopatogenia; las formas de evaluación y tratamiento tampoco están generalizadamente consensuadas.

El objetivo de esta revisión es la actualización del tema bajo el punto de vista del Angiólogo-Cirujano Vascular.

Se ofrece una visión sistemática estructurada de los acontecimientos que ocurren en la fase precoz de revascularización, ligada a la aparición masiva de radicales libres del oxígeno, así como del papel que juega el binomio endotelio-neutrófilos cuando son activados por los radicales y se comportan como retro-activadores de productos gravemente tóxicos.

Las situaciones de daño celular y tisular provocadas por estas alteraciones concatenadas pretenden ser contrarrestadas por nuestros neutralizantes fisiológicos. Precisamente a través de estas vías los investigadores están abriendo nuevas alternativas de tratamiento que atenuen, o controlen, los daños provocados por medio de barreneros de radicales libres, moduladores de respuesta inflamatoria, antioxidantes y otros variados recursos.

Concluimos con la convicción de que se está entreabriendo la puerta para el control definitivo del daño producido por la secuencia Isquemia-Revascularización.

**Palabras clave:** Isquemia; Revascularización; Radicales libres; Neutrófilo.

#### SUMMARY

*Ischemia-Reperfusion injury (IRI) is a topic of controversy because of its etiology, diagnosis and treatment.*

*IRI is revisited from the initial events after ischemia and posterior revascularization, the role of toxic oxygen metabolites and free radicals, and the role of neutrophil chemotaxis, sequestration and activation, that can lead to severe tissue damages.*

*The treatment strategy of toxic metabolite-induced injury includes a variety of therapies, as antioxidant physiologic defenses, elimination of reactions that produce free radicals and minimizing initiation or modulation of destructive inflammatory responses through activation of alternative pathways, such as chelation therapy, exogenous antioxidant delivery, enzyme induction, and «scavengers».*

*We think that severe IRI mediating damage of multiple tissues may be soon controlled, opening new therapeutic approaches for vascular surgeons.*

**Key words:** Ischemia; Reperfusion; Free radicals; Neutrophil.

#### Introducción

Hasta hace pocos años conocíamos suficientemente bien a nivel histológico, los fenómenos de daño celular ocasionados por la secuencia isquemia-revascularización; más recientemente, estamos conociendo dicho fenómeno a nivel bioquímico intracelular, con lo que se completa su comprensión. Como consecuencia de esta nueva perspectiva fisiopatológica, se

atisban unos procedimientos terapéuticos que cambiarán completamente el panorama actual, en breve plazo.

Los radicales libres del oxígeno (RLO) parece que juegan un papel clave en esta apasionante secuencia, siendo responsables de lesionar la membrana celular, el endotelio vascular y activar los neutrófilos. Una vez puestos en marcha estos mecanismos, se producen una serie de mediadores que conjuntamente conforman el complejo fenómeno de la lesión por revascularización con diversa extensión local, regional y sistémica, más o menos marcada según sea la profundidad e importancia del fenómeno primario isquémico.

Para seguir una visión sistematizada de todo el proceso haremos esquemáticamente los siguientes apartados:

1. Fase de isquemia
2. Fase de revascularización
  - A. Visión local
  - B. Visión sistémica
    - a. Papel de los neutrófilos
    - b. Papel del endotelio
3. Mecanismos que contrarrestan la acción de los RLO
4. Rerpercusiones regionales y generales
5. Recapitulación-Conclusiones

#### 1. Fase de isquemia

Los fenómenos de sufrimiento y muerte celular por isquemia son suficientemente conocidos. Es la intensidad y duración de la misma la que va a provocar una serie de daños, clásicamente diferentes según el tejido isquémico. El consumo energético metabólico es inversamente proporcional a la resistencia a la isquemia.

Así sabemos cómo en isquemia absoluta, que en la práctica clínica casi nunca es real, el tejido nervioso es el más sensible a la muerte por isquemia, después son los diversos parenquimas diferenciados, riñón, intestino, hígado, pulmón, etc., y, posteriormente, el tejido muscular (corazón y músculo esquelético), hueso, etc. (1).

En la presente revisión nos fijaremos exclusivamente en los fenómenos de isquemia-revascularización relativos al músculo esquelético (miembros). La relativa tolerancia del músculo a la isquemia es debi-

da a su bajo gasto metabólico en reposo, a sus reservas de glucógeno y a su capacidad de mantener una vía anaeróbica alternativa de producción de energía (2). La vía aeróbica es realmente la única eficaz para reponer nuestros acumuladores energéticos: Adenosin Difosfórico (ADP) Adenosin Trifosfórico (ATP).

Si recordamos el ejemplo de la oxidación de una molécula de Glucosa:



Con estas 690 Kcal. se recargan 38 ADP - 38 ATP. El costo energético en pasar un ADP a ATP son 10 Kcalorías aproximadamente; el rendimiento de nuestras células como «motor de combustión» es muy bueno, pues es superior al 30%, conseguido por una temperatura uniforme y una cadena enzimática muy bien regulada y precisa (3).

El Oxígeno (O<sub>2</sub>) es nuestro combustible básico, repone en la vía metabólica aeróbica los enlaces de fosfato de alta energía que necesitan nuestras células para su normal funcionamiento.

Por contra, la vía anaeróbica no llega como la anterior hasta el ciclo de Krebs, tiene un rendimiento energético muchísimo menor, sólo rinde por cada molécula de glucosa escindida 2 conversiones de ADP-ATP en vez de las 38 habituales.

La cadena metabólica se detiene en el ácido pirúvico que se transforma en láctico sin poder oxidarse por la vía del Succinil Coenzima A, produciéndose una acidificación del pH intracelular, lo que por un mecanismo de autorregulación conduce a la inactivación de su enzima de conversión, paralizándose el proceso (3, 4).

Durante las 3 primeras horas de isquemia se mantiene precariamente la energía necesaria para los intercambios metabólicos por la depleción de las reservas de creatinin-fosfato y la vía anaeróbica (5).

Entre las 3-6 horas se consume el agotamiento de los depósitos de energía, depleccionándose la cadena metabólica completa desde el ATP. Fig. 1, tomada de Nahum (6).

A partir de las 6-7 horas no existe la posibilidad de producción de energía en la célula muscular, lo que conduce a su muerte, a la del músculo, de los tejidos isquémicos y en ocasiones pérdida del miembro y de la vida (7).

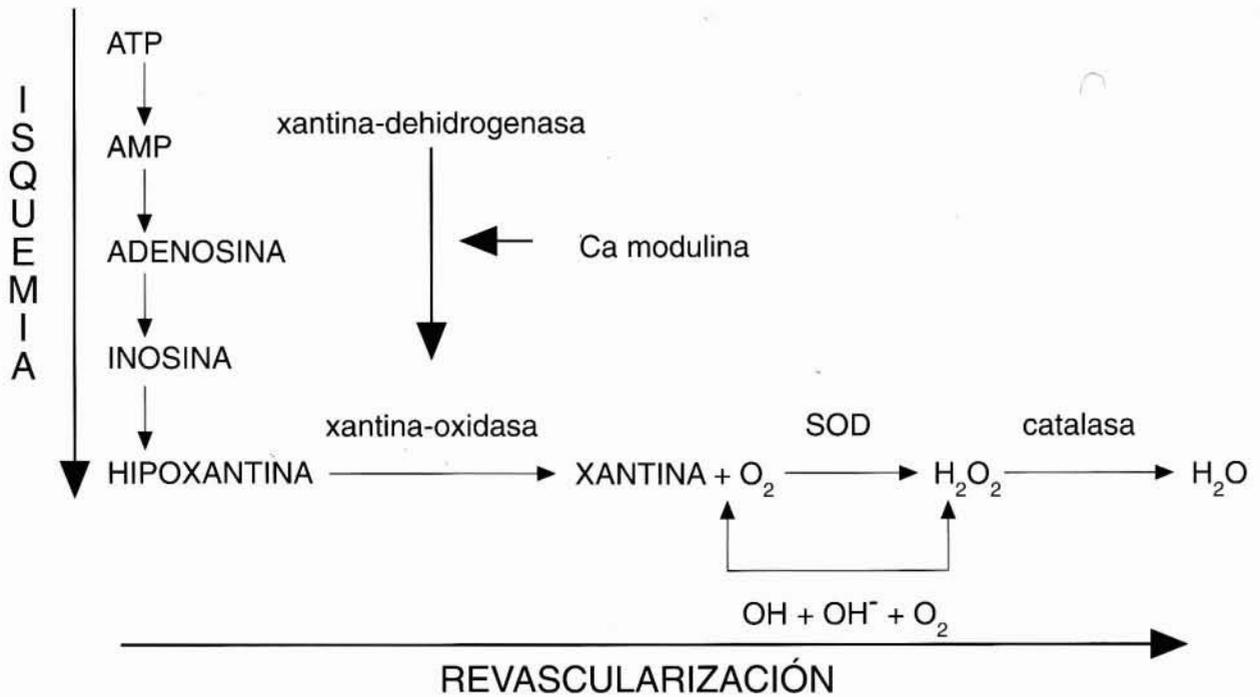


Fig. 1. Secuencia isquemia-revascularización

La descripción clásica de la muerte celular comienza por la pérdida de gradiente energético a través de las membranas celulares, el fracaso de la bomba de sodio y calcio, así como el estado de acidosis. Estos procesos conducen a un shock osmótico, con encharcamiento celular, fracaso sistemático y global de todas sus funciones, terminando con la filtración y pérdida al exterior de sus proteínas y enzimas.

Bajo el microscopio esto se traduce al principio en edema de membrana, agrupamiento de la cromatina y picnosis del núcleo, para progresar a un edema y destrucción completa de todas las partes de la célula, pérdida de compartimentalización y rexis celular (8, 9).

## 2. Fase de revascularización

Para seguir un orden que nos ayude a sistematizar esta fase haremos primero una descripción de los fenómenos bioquímico-metabólicos a nivel celular local, para atender posteriormente los ocurridos a distancia a nivel sistémico.

### A. Visión local

Habíamos dejado a la célula en la fase anterior de isquemia, en un estadio de sufrimiento, en que casi agotadas sus reservas energéticas empieza a surgir el shock de membrana.

Si en esta fase se produce la revascularización, veremos que la brusca llegada de sangre bien oxigenada tiene perniciosas consecuencias, que no ocurren, o al menos en tan grande medida, si la revascularización se produce de forma muy gradual con sangre hipóxica (10).

Suficientes estudios han señalado a los Radicales Libres del Oxígeno (RLO) como los mediadores responsables de las lesiones producidas por la revascularización (6, 10).

La aparición de Ión Superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en pequeñas cantidades, así como la formación de Agua Oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el Radical Hidroxilo (OH), es hasta cierto punto normal durante la reducción secuencial simple de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias y retículo endoplásmico (11).

El final del ciclo de Krebs significa la combustión o reducción del Oxígeno por la vía de la citocromo-oxidasa.

Durante esta reacción cuatro electrones deben ser transferidos para liberar su energía y formarse agua al final de la misma (6, 12). El flujo de electrones se produce en su sistema de transporte a través de una reducción secuencial de flavoproteínas, ubiquinona y citocromos, dentro de las mitocondrias (13).

La inhibición de la cadena respiratoria distal al lugar de la reducción de la ubiquinona da lugar a un incremento de la producción de ion superóxido ( $O_2^-$ ).

Se ha sugerido que la aparición de formas reducidas de ubiquinona y ubisemiquinona reaccionan con el Oxígeno ( $O_2$ ) para formar ( $O_2^-$ ) durante la reoxidación por el complejo citocromo B. La mayor fuente de producción de ( $O_2^-$ ) intracelular parece ser la merma de electrones durante la cadena de transporte electrónico en la mitocondria y en el sistema citocromo P450 del retículo endoplásmico (12, 13).

En circunstancias normales un 5% del oxígeno consumido por la cadena respiratoria es transformado, marginalmente, en sus metabolitos tóxicos o radicales libres del Oxígeno (RLO), que son neutralizados por los mecanismos de defensa antioxidantes intracelulares (12, 13).

La figura 2, tomada de Nahum (6), nos ilustra la reducción secuencial de electrones desde el oxígeno

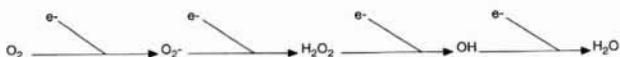


Fig. 2. Reducción secuencial electrónica del Oxígeno al Agua.

hasta el agua, por la vía marginal.

La lesión celular ocurriría cuando la producción de RLO sobrepasa la capacidad de defensa de los antioxidantes celulares.

Esta situación hipotética se hace realidad en la revascularización brusca de los tejidos sometidos a isquemia; durante esta última, los depósitos de ATP se deplecionan, incrementándose los de ADP, AMP, etc., llevado a la formación de hipoxantina (ver Fig. 1).

Al mismo tiempo la isquemia convierte la xantina-dehidrogenasa en xantino-oxidasa a través de una

calciomodulina, mecanismo propiciado por la entrada de  $Ca^{++}$  durante esta fase (14).

Consecuentemente, ya tenemos cebada la «bomba» productora del estallido principal de radicales libres (RLO); sólo la falta de  $O_2$  hace que no se forme ion superóxido ( $O_2^-$ ) al pasar la hipoxantina a xantina a través de la xantino-oxidasa. En cuanto se produce la revascularización, la presencia de  $O_2$  molecular activa la reacción de transformación de la hipoxantina acumulada durante la isquemia, por degradación del AMP, en xantina siguiendo la vía del ácido úrico (6, 15). (Ver Fig. 1).

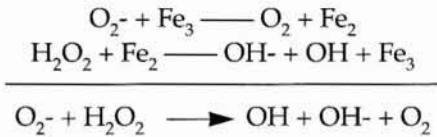
La aparición masiva de  $O_2^-$  puede inactivar enzimas específicas, pero su acción perjudicial más característica es ser el precursor del agua oxigenada o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y, de lo que es peor, del radical hidroxilo ( $OH^-$ ) gravemente tóxico por su reactividad (6, 16).

En condiciones fisiológicas esa fracción del 5% aproximadamente de escape de  $O_2$  molecular en ion superóxido ( $O_2^-$ ), a través de los llamados «agujeros» en las cadenas de transporte electrónico mitocondrial, del retículo endoplásmico y de membrana (17, 18), es neutralizada por los llamados barrenderos («scavengers») de los radicales libres (RLO), como son la superóxido-dismutasa (SOD) y la catalasa.

La SOD cataliza la conversión del ion superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La catalasa es una metaloproteína que lleva a la producción de agua y oxígeno ( $H_2O$  y  $O_2$ ) a partir del agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), actuando in vivo en combinación con la SOD (ver Fig. 1) (19).

Con la aparición masiva de  $O_2^-$  los barrenderos celulares se ven desbordados, acumulándose  $H_2O_2$  que es un oxidante relativamente estable pero precursor, en presencia de ciertos metales: hierro, manganeso, cobre, hemoproteínas, etc., de la reacción de Haber-Weiss catalizada por el hierro, descrita por Fenton, en que aparece en escena el temido radical hidroxilo ( $OH^-$ ), altamente inestable y reactivo (6, 20).

Esta tercera reducción electrónica del  $O_2$ , en que se forma el radical libre hidroxilo ( $OH^-$ ), no ocurre más que en estas contadas ocasiones de descarrilamiento del  $O_2^-$ , que ha favorecido por otra parte la presencia de hierro (Fe). Esta reacción de Haber-Weiss se describe así:



El radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>) puede reaccionar en la práctica con cualquier molécula orgánica y es tal su actividad que reacciona en el lugar en que se produce (6, 21).

Es fácil comprender la vulnerabilidad del DNA y de la membrana celular a su acción, lo que lleva rápidamente a la disfunción celular.

El OH<sup>-</sup> puede iniciar la peroxidación lipídica de la membrana celular, secuestrando un Hidrógeno (H), propagándose a través del radical lipídico activado; la peroxidación se ve favorecida por la presencia de Fe<sup>2</sup> que aparece en la isquemia.

El metabolismo final de la reacción de peroxidación lipídica produce un metabolito (malondialdehído), que es fácilmente mensurable, utilizándose como marcador (22, 23).

Otros estudios han señalado al radical perhidroxilo como un oxidante más poderoso que el ión superóxido y el hidroxilo, capaz por sí solo de inactivar proteínas, desencadenar la peroxidación lipídica, además de daño del DNA (24).

Una constelación de mecanismos patológicos activados por la secuencia isquemia-reperfusión, es capaz de producir RLO, que a su vez retro-alimentan la producción masiva de más radicales libres. Así, no sólo derivarían del metabolismo de la xantino-oxidasa (25) sino de la oxidación de las catecolaminas (26), activación de las peroxidasas, oxidación de los compuestos sulfidrilo, etc. (27).

Por otra parte, la activación de los neutrófilos (28) y de las células endoteliales (29), inducidas por los radicales libres, son también seguramente la

mayor causa de retroalimentación de los RLO. (Fig. 3).

La resonancia espectrofotométrica del spin de los electrones y la quimioluminiscencia han sido utilizadas para demostrar la explosión de oxidantes que se produce inmediatamente después de la revascularización, durando aproximadamente unos 2-5 minutos (16, 30, 31).

ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE RLO Y DAÑOS QUE OCASIONAN

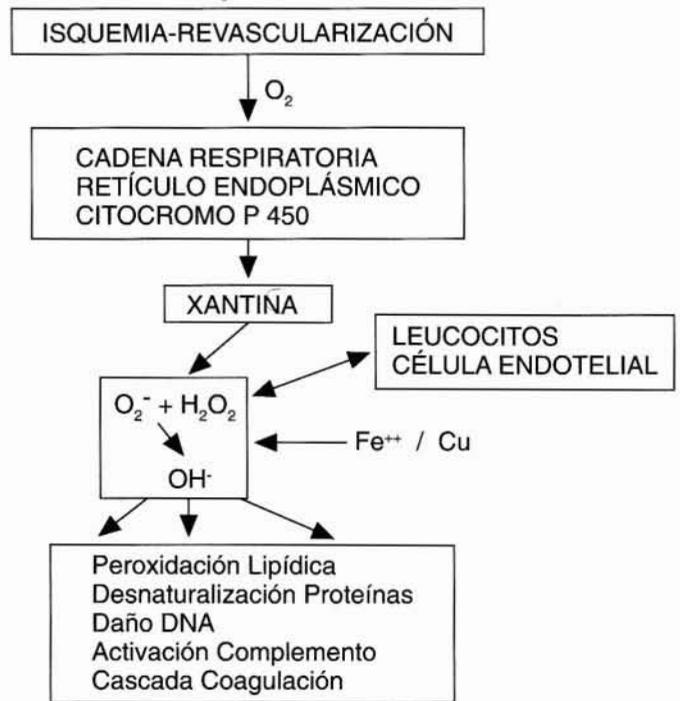


Fig. 3. Esquema de producción de RLO y daños que ocasionan. Modificada de Nahum.

B. Visión sistémica

Una vez estudiados los mecanismos de daño celular mediados por los RLO, es fácil comprender cómo esos productos no sólo tienen un efecto local sino sistémico una vez drenados por la microcirculación y puestos en contacto con el resto del organismo por el aparato circulatorio.

Un ejemplo es la medición del H2O2 excretado

por los pulmones a causa de su volatilidad, alta permeabilidad lipídica y relativa estabilidad, en diversos procesos de toxemia metabólica no relacionados primariamente con afectación pulmonar; aunque una vez producido el Síndrome de Distrés Respiratorio del Adulto (SDRA) se miden las mayores concentraciones en el aire expirado (32).

Esta presencia y drenaje de radicales y metabolitos en una situación de daño celular intenso pone en marcha la respuesta inflamatoria defensiva del organismo, que va a tener su mayor importancia a nivel local y regional, pero con importantes *repercusiones sistémicas* una vez activado el binomio *endotelio vascular-neutrófilo*.

#### a. Papel de los Neutrófilos

Los Neutrófilos juegan un papel clave en el daño producido por la revascularización. No está del todo claro si resultan atrapados cuando circulan por la zona, o si más bien son reclutados, claramente atraídos por fenómenos quimiotácticos, como consecuencia de la presencia y actuación de los RLO sobre las células endoteliales y los propios neutrófilos.

La acumulación de neutrófilos, fácilmente demostrable en las zonas reperfundidas-isquémicas, produce un aumento del daño lesional con aumento de la permeabilidad, presencia de edema y taponamiento grumoso microcirculatorio; si experimentalmente se deplecionan los neutrófilos la lesión es menor (33).

Los estudios realizados evidencian que los RLO reaccionarían con las *células endoteliales (CE)* y los *neutrófilos*, poniendo en marcha una serie de interacciones que conducen a la suelta de mediadores y la destrucción de los leucocitos activados, una vez mostradas sus moléculas de adhesión al endotelio (Integrinas CD11 y CD18). El endotelio activado a su vez muestra sus moléculas de adhesión (Endotelio-Leucocito Adhesión Molécula: ELAM) (16).

Esta adherencia de los neutrófilos activados a las moléculas de adhesión endotelial activadas se ve contrarrestada por una serie de fuerzas de dispersión que actúan para desalojar al neutrófilo de la pared del endotelio, a través de una molécula antiadhesiva endógena y la propia fuerza hidrostática de la corriente (34).

Existen diversas formas de activación de los neu-

trófilos en relación al endotelio y, por ende, de la microcirculación:

a. Adherirse al endotelio (por medio de moléculas de interfase) de arteriolas precapilares, capilares y vénulas postcapilares, como paso previo a la diapedesis extravascular y posible rotura lesional posterior con estallido de RLO (34).

b. Formar tapones o grumos por acumulación leucocitaria al hacerse rígida y no deformable su membrana, junto con la eritrosedimentación y la activación de la cascada de la coagulación que se produce en estas circunstancias, conducen a la obstrucción microcirculatoria. Este bloqueo se observa en las situaciones de isquemia profunda y mantenida, siendo conocido como fenómeno de «no reflujo», pues se ha llegado a una situación en que, aunque se restablezca el flujo, no se produce revascularización efectiva (35).

c. Agregación de leucocitos activados que forman microémbolos con actuación a distancia; clásicamente el filtro natural serán los capilares pulmonares (36).

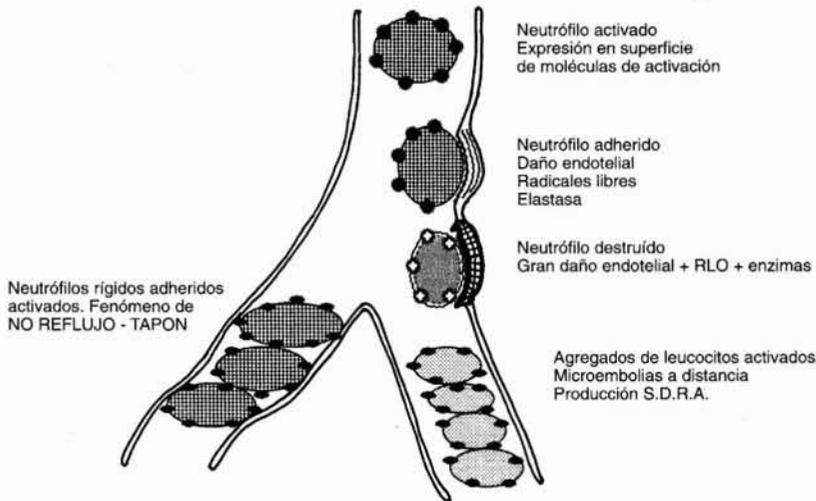
Los microémbolos de leucocitos activados en el endotelio capilar pulmonar pondrían en marcha la serie de interacciones que conducen a la explosión de RLO, conformando el conocido síndrome de distress respiratorio del adulto (SDRA), de aparición durante el shock, sepsis, quemaduras, politraumatismos, síndromes de revascularización, etc. (37).

Por último, en relación al papel jugado por los neutrófilos en todas las circunstancias señaladas anteriormente, recordar que durante su activación, fijación, diapedesis y rotura, liberan, además de RLO, las temibles enzimas lisosomales que están previstas en principio como mecanismo defensivo contra la agresión externa. Los estudios sobre la elastasa, especialmente, la señalan como provocadora de lesión endotelial por digestión de la membrana basal, con aumento de la permeabilidad y producción de edema. También se la relaciona con activación de las plaquetas, con los metabolitos del ácido araquidónico y los diversos mediadores de la lesión endotelial (35), (Fig.) 4.

#### b. Papel del endotelio

Lejos están los tiempos en que fue considerado solamente como una cubierta la activación de la coa-

## CONSECUENCIAS DE LA ACTIVACIÓN DE LOS NEUTRÓFILOS



**Fig. 4.** Consecuencias de la activación de los neutrófilos. Modificada de Hickman.

gulación cuando pierde su integridad; así como las diversas lesiones endoteliales. Especialmente los estudios relacionados con la arterioesclerosis y el shock han llevado a la convicción de que estamos ante un verdadero órgano endocrino todavía poco conocido, de gran extensión, ocupando un puesto clave de intermediación entre la sangre y el resto de nuestro ser vivo, con decisivas actuaciones en la coagulación, transporte de lípidos y reactividad inmunológica (38).

En su forma natural se mantiene una superficie no trombogénica por la producción de diversas sustancias: Prostaciclina (PGI<sub>1</sub>), Activador tisular del Plasminógeno (tPA), proteínas antitrombóticas de superficie, heparina, el llamado Factor Relajante del Endotelio (FRDE) que se ha identificado como Óxido nítrico (NO) (39).

En las situaciones de Isquemia-Revascularización se producen radicales libres que provocan lesión endotelial con exacerbación, por una parte, de sustancias que guardaban equilibrio con las anteriores: Tromboxano (TxA<sub>2</sub>); Leucotrienos (LTB<sub>4</sub>); Endotelina, y explosión de otras, que se forman empujadas por los RLO: Factor Activador de las Plaquetas (PAF), activación del Complemento y Citoquinas (40).

El *tromboxano* (TxA<sub>2</sub>) y los *leucotrienos* (LTB<sub>4</sub>) son metabolitos del ácido araquidónico. El TxA<sub>2</sub> por la vía de la ciclooxigenasa mantiene un delicado equilibrio con la PGI<sub>1</sub>.

Su interacción endotelio-plaquetaria es bien cono-

cida, así como diversos mecanismos farmacológicos de efectos antiagregantes usados en la clínica diaria.

El LTB<sub>4</sub> producido por la vía de la lipooxigenasa se cree desarrolla un papel clave en la lesión de reperusión. Dentro de los RLO, parece ser el ión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) el estimulador fundamental de su producción.

Su mecanismo lesional se realiza uniéndose a los receptores específicos de la superficie de los neutrófilos, activando sus moléculas de adhesión (CD18), y las de adherencia de las células endoteliales (ELAM); los neutrófilos activados continúan la producción de más RLO y proteasas (41).

Se le señala como el más potente quimiotáctico de los neutrófilos. Administrado de forma exógena reproduce la mayoría de las alteraciones microcirculatorias de la secuencia isquemia-revascularización; por otra parte su neutralización reduce significativamente la presencia de infiltrados de neutrófilos activados; la neutralización precoz de los RLO seguramente bloquearía su producción y se impediría el mecanismo principal de activación de los neutrófilos (16).

La *endotelina* es liberada por el endotelio como respuesta a la hipoxia. Está considerada como el vasoconstrictor más potente que se conoce. También puede liberarse en otras situaciones. Se cree que guarda un delicado equilibrio con la producción del FRDE, también identificado como óxido nítrico (NO).

Durante la isquemia-revascularización se produce lesión endotelial, con inhibición de la producción de

NO; esta situación, junto a la disminución de las fuerzas antiadherentes y la producción de RLO tendrían como consecuencia la rotura del balance crítico *endotelina-NO*, con predominio absoluto del efecto vasoconstrictor y pérdida de la regulación hemodinámica local y sistémica; así como efectos en la proliferación celular en las fases subcríticas (16, 42).

Por otra parte, se piensa que en las situaciones de explosión de RLO, el NO puede reaccionar con el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, produciéndose reacciones secundarias en que fácilmente aparece peroxinitrito, que a determinadas concentraciones iniciaría la peroxidación lipídica sin necesidad de presencia de hierro, formándose también ácido nitroso corrosivo (29).

Diversas sustancias como el *factor activador de las plaquetas (PAF)*, *complementos* y *citoquinas*, están involucrados en esta desestabilización del endotelio, inducida por los RLO.

El PAF se forma a partir de un fosfolípido de

membrana, se conoce como potente agregante y liberador de los gránulos plaquetarios (43); también se piensa que es un mediador quimiotáctico muy potente de la activación de los neutrófilos, aunque está en discusión si su acción es directa o mediada indirectamente por los Leucotrienos LTB<sub>4</sub> y LTC<sub>4</sub>.

Los *complementos* se activarían como respuesta a la isquemia. Esta aparición de proteínas o fracciones de las mismas, biológicamente activas, inducirían a su vez la activación de los neutrófilos con sus efectos ya conocidos.

Asimismo, en estas situaciones aparecen en la circulación diversas *citoquinas* (IL-1, IL-6, IL-8), así como el Factor de Necrosis Tumoral (FNT). Parece ser que estas sustancias estimularían la producción de Moléculas de Adhesión Intercelulares (ICAM 1 y 2) de los Neutrófilos, con efecto quimiotáctico y activador (16, 40). Fig. 5.

### LA SECUENCIA ISQUEMIA - REVASCULARIZACIÓN

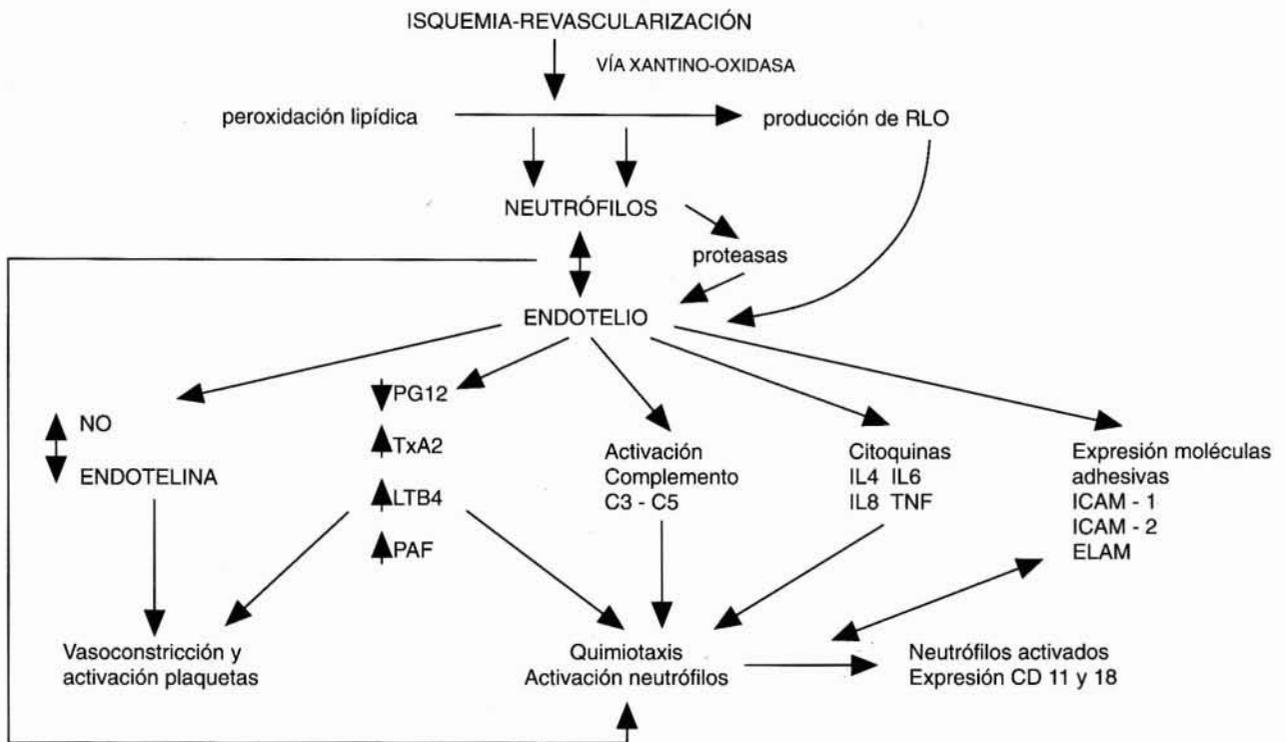


Fig. 5. La secuencia isquemia - revascularización. Modificada de Grace

### 3. Mecanismos que contrarrestan la acción de los radicales libres

#### a. Barrenderos de los RLO:

Se conocen de esta manera («scavengers») las sustancias que reaccionan con los RLO para convertirlos en productos menos nocivos para el organismo.

Desde el descubrimiento de la superóxido dismutasa (SOD), en 1969 (19), se ha avanzado bastante en este atractivo campo de investigación.

Seguramente estamos en este momento en el umbral de la posible eclosión de sustancias que sean verdaderamente capaces de luchar contra los RLO y modificar o modular el tono de respuesta perjudicial que conlleva la revascularización.

Es perfectamente posible que, en un plazo breve de tiempo, estén suficientemente experimentados como para usar en clínica varios tipos de barrenderos de RLO que ayuden a controlar los devastadores efectos de la revascularización postisquemia.

También en el momento actual está en discusión y estudio a partir de qué nivel son perjudiciales los RLO; cómo se pueden contrarrestar sin provocar desequilibrios biológicos que podrán ser perjudiciales; o buscar otros caminos para impedir la producción de RLO, contrarrestarlos, mejorar la tolerancia celular a los mismos, etc.

Dentro de los barrenderos, además de la SOD que cataliza la reacción de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , actuaría en vivo conjuntamente con la catalasa que haría el paso de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$  (44).

Recientemente, gracias a la técnica del DNA recombinante, se ha logrado una SOD y Catalasa similar a la humana y por modificación enzimática del polietilenoglicol prolongar su vida media, consiguiendo una aceptable difusión intracelular. La disponibilidad comercial es un hecho; en los próximos años se espera una rápida difusión de su empleo y la publicación de resultados terapéuticos (45, 46).

Contra el radical  $OH^-$  se están experimentando la dimetilurea, el dimetil sulfóxido y la mercapto-propionil glicina; así como, anteriormente, el manitol.

La mayoría de los barrenderos de los RLO tropiezan con graves dificultades para su uso, como es su propia toxicidad, inestabilidad, imposibilidad de

actuación en el lugar necesario, etc. Todo ello, sumado a las cautelas propias de la investigación y posible comercialización, hace que el camino para la aparición de nuevos productos esté abierto, pero todavía con grandes dificultades (16).

#### b. Inhibidores de los RLO:

La terapéutica quelante bloqueando el  $Fe^{2+}$  logra reducir la aparición de  $OH^-$  a través de la reacción de Fenton.

La Desferrioxamina ha sido empleada con éxito experimentalmente, pero es muy tóxica para uso clínico. Se están buscando ávidamente quelantes menos tóxicos que impidan efectivamente la producción del radical  $OH^-$  (20, 47).

El Alopurinol es otra vía que se sigue, el ser un análogo estructural de la hipoxantina, como inhibidor competitivo; no actuaría la xantina oxidasa, no produciéndose la reacción de aparición de xantina + ión superóxido  $O_2^-$  (24, 48).

#### c. Modulación de la respuesta inflamatoria:

Es una de las vías más perseguidas para atenuar las consecuencias de la revascularización postisquémica. Se trata de actuar, bien sobre aquellos mediadores que tienen capacidad quimiotáctica, sobre quienes promueven la aparición de moléculas de adhesión; o sobre quienes activan nuestro sistema defensivo antiinflamatorio: linfocitos, monocitos, neutrófilos, macrófagos, células endoteliales, plaquetas, etc.

La pentoxifilina está en estudio como sustancia que modulase a la baja la respuesta inflamatoria del neutrófilo (6).

También se experimenta el uso de antagonistas del PAF, inhibidores de la lipooxigenasa (49), anticuerpos monoclonales contra los sistemas de adhesión CD 11 y 18 (50), adenosina, compuestos químicos perfluorados, antiproteasas (51).

La evidencia obtenida en múltiples modelos experimentales es altamente coherente al señalar un efecto beneficioso de los tratamientos que limitan la acumulación de leucocitos en las zonas revascularizadas; la investigación de su utilidad clínica, que está en sus inicios, parece que está claramente justificada (iloprost; fluoxol; polaxómero 188, etc.) (52).

*d. Antioxidantes:*

Serían una variante de «barrenderos» al interrumpir la peroxidación producida por los RLO. Experimentalmente se ha trabajado sobre la Vitamina E, propanolol, bloqueadores de canales del calcio, captopril, nafezatrom, trimetazidina, mercaptopropionil glicina, etc. (16, 24), sin conseguir un consenso eficaz sobre su empleo en clínica, aunque los caminos siguen abiertos.

*e. Otros procedimientos:*

Se siguen intentando otras vías para atenuar las consecuencias de la revascularización post-isquemia. Una muy interesante es la del llamado Precondicionamiento isquémico, que vendría a ser una variante de entrenamiento celular en hipoxia, provocada artificialmente, durante un tiempo elegido. De esta manera se preformarían de forma fisiológica una mayor cantidad de barrenderos y se pondrían en marcha mecanismos protectores, con lo que el tejido estaría en mejores condiciones para soportar la secuencia isquemia-revascularización. La dificultad está en trasladar en aprovechamiento clínico la utilidad de este interesante fenómeno (53).

Igualmente se ha utilizado la Hipotermia, así como la Hipoxia. La primera para reducir el metabolismo en la fase de isquemia con mayor conservación del ATP o una menor liberación de intermediarios posteriormente tóxicos (54).

La Hipoxia, controlada durante la fase de revascularización, podría atenuar la producción de RLO, produciéndose menor lesión sobre el tejido isquémico reperfundido que en condiciones normales (10).

*4. Repercusiones regionales y generales*

Las consecuencias regionales de la vascularización, en especial el aumento de la permeabilidad tisular con aparición de edema, son temas suficientemente conocidos (lesión por presión compartimental fasciotomías). Lo mismo podemos decir de las consecuencias sistémicas: el llamado síndrome de revascularización, descrito por Haimovici (55) como «metabólico-mionefrópático» en atención a su fisiopatología.

La acidosis tras la revascularización, la disminución del pH a límites más que peligrosos, la circula-

ción descontrolada de los productos de rexis celular: K, Ca; enzimas celulares: proteasas; mioglobina; etc., provocan una serie de acontecimientos bien conocidos que, de no poderse corregir en los casos más graves, conducen a la muerte del sujeto.

Basándose en estos cambios, un procedimiento a tener en cuenta puede ser desechar la primera sangre venosa después de la revascularización postisquemia aguda tardía de miembro (300-500 cc), canulando y drenando la vena femoral; o el paso por una máquina de diálisis especialmente acondicionada de la sangre venosa tras revascularización mesentérica.

*5. Recapitulación-Conclusiones:*

Hemos seguido los acontecimientos que explican las alteraciones que se producen en la isquemia seguida de revascularización.

Durante la Isquemia tisular se fraguan trastornos ligados a la falta de energía que pueden conducir, según su intensidad y duración, a la lesión reversible o irreversible.

Durante la revascularización ocurren una serie de acontecimientos, incubados en la fase anterior, que van a explotar sobre todo en los primeros instantes, ligados a la producción masiva de radicales libres del oxígeno, desbordando todos los mecanismos intrínsecos de protección.

Estos RLO median una serie de procesos en los que se lesionan las membranas celulares, se desnaturalizan las proteínas, se altera el DNA; se pone en marcha la lesión de la célula endotelial y la activación de los neutrófilos, con una serie de intermediaciones en que la destrucción de endotelios y sobre todo de neutrófilos agrava todavía más el proceso; se forman tapones, se liberan émbolos, se producen más radicales libres y proteasas, conduciendo al edema y al bloqueo microcirculatorio.

El daño regional y a distancia también se explica por el paso a la corriente sistémica de toda una serie de productos nocivos del catabolismo celular isquémico o de destrucción de la propia célula.

En condiciones fisiológicas de respiración celular existen «agujeros» de escape en la cadena de transporte electrónico de la reducción del oxígeno para la formación de agua y obtención de energía, en que se forman radicales libres, fracción estimada en un 5% del total del oxígeno consumido.

Para combatir los efectos de este escape «fisiológico» estamos adecuadamente preparados con una batería de antagonistas y neutralizadores (barrenderos). Para lo que no estamos preparados es para el escape masivo de radicales libres, con sus efectos locales y de reacción en cadena a través de la activación del binomio neutrófilo-endotelio.

Siguiendo los pasos de los mecanismos de activación de todos los acontecimientos, se están intentando una serie de actuaciones que tendrían un inmenso valor terapéutico, tendentes a bloquear, reducir, o modular cualquiera de los eslabones de la cadena isquemia revascularización.

Se ha buscado atenuar la pérdida de energía en isquemia a través de hipotermia, provocar entrenamiento tisular en hipoxia, modificar los sustratos tóxicos a través de análogos estructurales, combatir los radicales libres con toda la serie posible de barrenderos y antagonistas, inhibir su producción, modular la respuesta inflamatoria, etc.

Los avances en el laboratorio son muchos, pero pocos se pueden llevar a la práctica, unas veces por la toxicidad y efectos secundarios, otras por su breve vida útil y la mayoría por imposibilidad de que la acción deseada se lleve a cabo en el lugar necesario.

De todos modos, podemos asegurar que nos encontramos en el umbral de una frontera en que el tratamiento eficaz del proceso *isquemia revascularización* con su patología satélite provocada por los RLO y ligada a la activación *neutrófilo-endotelio*, sea una realidad.

El primer paso se ha dado con la comercialización por ingeniería genética de la superóxido dismutasa y de la catalasa. Sin duda este camino y los grandes esfuerzos de investigación que se realizan en estos campos básicos conducirán, en breve, a nuevos descubrimientos que nos permitan una visión más optimista, de todo este complejo proceso.

## BIBLIOGRAFIA

1. CHERVU, A.; HOMSHER, E.; MOORE, W. S.; QUIÑONES-BALDRICH, W. J.: Differential

- recovery of skeletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion. *J. Surg. Res.*, 1989; 47:12-19.
2. FERNANDEZ SAMOS, R.; ORTEGA, J. M.; FERNANDEZ MORAN, C.; ARIAS, R.: Etiopatogenia y clínica de la isquemia aguda. En: Fernando Vaquero, ed. *Isquemias Agudas*. Barcelona: Uriach S.A. 1994:49-57.
3. ROZMAN, C.: Enfermedades del metabolismo y de la nutrición. En: Farreras II *Medicina Interna*. Barcelona: Marín S.A., 7ª ed. 1967:625-36.
4. RHODES, R.; DE PALMA, R.: Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. *Surg. Gyn. Obst.*, 1989; 150:347-52.
5. CAPDEVILA, J. M.: Consideraciones básicas sobre la isquemia aguda. En: Fernando Vaquero, ed. *Isquemias Agudas*. Barcelona: Uriach S.A. 1994:31-42.
6. NAHUM, A.; SZNAJDER, J. L.: Role of free radicals in critical illness. In Smith GA, Wood L Th. *Principles of critical care*. McGraw Hill. New York 1992; 679-692.
7. WALKER, P. M.; LINDSAY, T.; LABBE, R.: Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers. *J. Vasc. Surg.*, 1987; 5:68-73.
8. CHAUDRY, I.; CLEMENS, M.; BAUE, A.: Alterations in cell function with ischemia and shock and their correction. *Arch. Surg.*, 1981; 116:1309-17.
9. HALLIWELL, B.: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. J. Exp. P.*, 1989; 70:737-57.
10. PERRY, M.; WADHWA, S.: Gradual reintroduction of oxygen reduces reperfusion injury in cat stomach. *Am. J. Physiol.*, 1988; 254:366-72.
11. FREEMAN, B.; CRAPO, J.: Biology of disease, free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 1982; 47:412-26.

12. FISHER, A. B.: Intracellular production of oxygen derived free radicals. In: Halliwell B ed. *Oxygen radicals and tissue injury*. Bethesda, MD, American Societies for Experimental Biology 1988:34-42.
13. FISHER, A. B.; FORMAN, H. J.: Oxygen utilization and toxicity in the lungs. In Fishman, A. P., Fisher; A. B. ed. *Handbook of Physiology*, Baltimore, Waverly Press, 1985:231-54.
14. ROY, R.; MC CORD, J.: Superoxide and ischemia: conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In Cohen, G.; Greenwald ed. *Oxy-radicals and their scavenger systems*. Vol. 2. New York, Elsevier, 1983:143-53.
15. HICKMAN, P.; MC COLLUM, P.; BELCH, J. J.: Neutrophils may contribute to the morbidity and mortality of claudicants. *Br. J. Surg.*, 1994; 81:790-98.
16. GRACE, P. A.: Ischaemia-Reperfusion injury. *Br. J. Surg.*, 1994; 81:637-47.
17. BOVERIS, A.: Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1977; 78:67-82.
18. TURRENS, J.; FREEMAN, B.; LEVITT, J.; CRAPO, J.: The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982; 217:401-10.
19. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C.: Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press 1985.
20. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C.: The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.*, 1985; 8:189-93.
21. SOUTHORN, P.; POWIS, G.: Free radicals in medicine. In: Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin. Proc.*, 198; 63:381-89.
22. KELLOG, E. W.: Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.*, 1975; 250:8812-17.
23. SLATER, T. F.: Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry*, 1984; 222:1-15.
24. KUKREJA, R. C.; HESS, M. L.: The oxygen free radical system: from equations through membrane protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc. Res.*, 1992; 26:641-55.
25. CHAMBERS, D.; PARKS, D.; PATTERSON, G.: Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1985; 17:145-52.
26. SINGAL, P.; KAPUR, N.; DHILLON, K.; BEAMISH, R.; DHALLA, N.: Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1982; 60:1390-97.
27. GRISHAM, M. B.; MC CORD, J. M.: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In Taylor, A.; Matalon, S.; Ward, P. ed. *Physiology of oxygen radicals*. Baltimore Waverly Press, 1986:1-8.
28. MC CORD, J. M.: Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Federation Proceedings*, 1987; 46:2402-06.
29. BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P.; FREEMAN, B.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1990; 87:1620-24.
30. MORRIS, J.; BULKLEY, G.; HAGLUND, U.; CADENAS, E.; SIES, H.: The direct real-time demonstration of oxygen free radical generation at reperfusion following ischemia in rat small intestine. *Gastroenterology*, 1987; 92:1541-47.
31. TURRENS, J.; GIULIVI, C.: Low level chemiluminescence from isolated hepatocytes, intact lung and intestine in-situ. In: Simic, M. ed. *Proceedings of 4th International Congress on oxygen radicals*, 1987:64-65.
32. SZNAJDER, J.; FRAIMAN, A.; HALL, J. B.:

- Increased hydrogen peroxide in the expired breath of patients with acute hypoxic respiratory failure. *Chest*, 1989; 96:606-12.
33. KLAUSNER, J.; PATERSON, I.; VALERI, C.; SHEPRO, D.; HECHTMAN, H.: Limb ischemia-induced increase in permeability is mediated by leukocytes and leukotrienes. *Ann. Surg.*, 1988; 208:755-60.
  34. PERRY, M. A.; GRANGER, D. N.: Role of CD11/CD18 in shear rate dependent leukocyte endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J. Clin. Invest.*, 1991; 87:1798-804.
  35. BELCH, J. J. F.: The role of the white blood cell in arterial disease. *Blood coagul. Fibrinolysis*, 1990; 1:183-91.
  36. WORTHEN, G. S.; SCHWAB, B.; ELSON, E.; DOWNEY, G.: Mechanics of stimulated neutrophils: cell stiffening induces retention in capillaries. *Science*, 1989; 245:183-86.
  37. HAMMOND, B.; KONTOS, H.; HESS, M.: Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1985; 63:273-87.
  38. HENDERSON, A. H.: Endothelium in control. *Br. Heart. J.*, 1991; 65:116-25.
  39. WARREN, J. B. Ed.: The endothelium: An introduction to current research. New York, Wiley-Liss, 1990.
  40. ENTMAN, M.; KUKIELKA, G.; DREYER, W.: The neutrophil in cardiac ischemia reperfusion injury. *J. Vasc. Surg.*, 1993; 18:108-10.
  41. KARASAWA, A.; GUO, J.; MA, X.; TSAO, P.; LEFER, A.: Protective actions of a Leukotriene B4 antagonist in splanchnic and reperfusion in rats. *Am. J. Physiol.*, 1991; 261:191-98.
  42. LERMAN, A.; BURNETT, J.: Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation*, 1992; 86 (suppl III): 12-19.
  43. HOURANI, S.; CUSACK, N.: Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol. Rev.*, 1991; 43:243-98.
  44. HALLIWELL, B.: Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Radic. Res. Commun.*, 1989; 5:315-18.
  45. GREENWALD, R. A.: Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases: A critical review. *Free Rad. Biol. Med.*, 1990; 8:201-10.
  46. BECKMAN, J. S.; MINOR, R. L. Jr.; WHITE, C. W.: Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263:6884-92.
  47. LELLI, J.; PRADHAN, S.; MASON, C. L.: Prevention of postischemic injury in immature intestine by deferoxamine. *J. Surg. Res.*, 1993; 54:34-38.
  48. ZORITA, A.; VAZQUEZ, J.: Bases del tratamiento quirúrgico de la isquemia aguda. En Fernando Vaquero Ed. *Isquemias agudas*. Barcelona, Uriach S.A., 1994:105-14.
  49. GRANGER, D.; KVIETYS, P.; PERRY, M.: Leukocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1993; 71:67-75.
  50. SIMPSON, P.; TODD, R.; FANTONE, J.; MICKELSON, J.; GREIFFIN, J.; LUCHESI, B.: Reduction of experimental canine reperfusion injury by monoclonal antibody (anti-Mol, anti Cd 11b) that inhibits leukocyte adhesion. *J. Clin. Invest.*, 1988; 81:624-29.
  51. FORMAN, M.; PERRY, J.; HADLEY, W. B.: Demonstration of myocardial reperfusion in humans: results of a pilot study utilizing acute coronary angioplasty with perflurochemical in anterior myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1991; 18:911-18.
  52. BARRABÉS, J. A.; GONZALEZ, M. A.; RUIZ MEANA, M.; GARCIA-DORADO, D.: Control farmacológico de la respuesta inflamato-

- ria durante la reperfusión miocárdica. *Rev. Esp. Cardiología*, 1995; 48:194-201.
53. MARBER, M.; LATCHMAN, D.; WALKER, J.; YELLON, D.: Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, 1993; 8:1264-72.
54. KELLY, C.; CREAGH, T.; GRACE, P.; BOUCHIER-HAYES, D.: Regional hypothermia protects against tourniquet neuropathy. *Eu. J. Vasc. Surg.*, 1992; 6:288-92.
55. HAIMOVICI, M.: Muscular, renal and metabolic complications of acute arterial occlusions. Myonephropathic-metabolic syndrome. *Surgery*, 1979; 85:461-68.