ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LESIONES POR REPERFUSIÓN

A. J. Bravo, H. Navarro (*), A. Ordóñez (**), J.B. Pérez-Bernal (***), J.M.Borrego (**), E. Poblador, M. Torres Cansino.
Servicio de Cirugía Torácica. Servicio de Análisis Clínicos. Servicio de Cirugía Cardiovascular. Servicio de Cuidados Intensivos.
Hospital Virgen del Rocío. Sevilla.

Las especies activas del oxígeno han sido implicadas en la físiopatología de muchos procesos de discutida etiopatogenia, como la aterosclerosis, el envejecimiento, o enfermedades inflamatorias pulmonares. Originan un disbalance en el equilibrio prooxidación-antioxidación, que afecta fundamentalmente a los lípidos plasmáticos y de membrana.

Son muchas las situaciones desencadenantes de la producción de radícales libres de oxígeno, siendo una de ellas la isquemia operatoria seguida de reperfusión.

Hemos estudiado el fenómeno de isquemia-reperfusión en animales sometidos a una ligadura reversible de la arteria pulmonar izquierda. El daño bioquímico oxidativo se cuantificó midiendo malondialdehído, un producto metabólico de degradación de la cadena de lipoperóxidos, en plasma y en tejido, observando un aumento muy significativo en plasma ($p<0.001$) entre los niveles medios basales (0.84 umol/1) y los encontrados a los 5 minutos de reperfusión (2.33 umol/1). En tejido, este aumento no alcanzó la significación estadística.

Palabras clave:

- Peroxidación lipídica.
- Lesión por reperfusión.
- Radicales libres.

Active species of the oxygen have been implicated in the pathophysiology of many processes of uncertain pathogenesis, as the atherosclerosis, the aging, or inflammatory pulmonary diseases. They originate an imbalance in the equilibrimn pro-oxidation-anti-oxidation, that affects fundamentally both plasmatic and membrane lipids. There are a lot of triggering circumstances that conduce to free radicals production, one of this is the surgical ischemia fallowed by reperfusion. We have studied the phenomenon of ischemia-reperfusion in animals underwent to reversible ligature of pulmonary left artery. The biochemical oxidative damage was quantified by measurement of malondialdehyde, a metabolic degradation product of the chain of lipoperoxides, both in plasma and in tissue, observing a significant increase in plasma ($p<0.001$) between the basal medium levels (0,84 umol/1) and after five minutes of reperfusion (2,33 umol/1). In the tissue, this increase did not achieve the statistical significance.

Key words:

- Lipid peroxidation.
- Reperfusion lesion.
- Free radicals.

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres (RL) son átomos con un electrón desapareado en su orbital externo, lo que les hace ser muy reactivos. Ciertas vías metabólicas generan un aumento de RL, como ocurre cuando se activa el mecanismo bactericida de los neutrófilos. Los radicales libres de oxígeno (RLO) más importantes son el anión superóxido (O_2-), el radical hidroxilo (OH·) y los hidroperóxidos orgánicos (ROOH·). La isquemia actúa como situación favorecedora en la producción de RLO.

En 1981, Guarnieri y cols.[1] demostraron la intervención de RL en el daño tisular que sufría el miocardio isquémico durante la reoxigenación. Años más tarde, Freeman[2] cuantificó malondialdehído (MDA) en fase de reperfusión como medida indirecta de ese daño oxidativo.

La isquemia provoca una serie de cambios bioquímicos (descenso de los fósfatos de alta energía y aumento del calcio intracelular) que originan una activación de proteasas, un aumento de hipoxantina, y una quimiotaxis de neutrófilos[3]. Secundariamente, se activan enzimas como la xantina-oxidasa (XO), que convierte la xantina en ácido úrico, la NADPH-oxidasa de neutrófilos, y las fósfólipasas, que son las principales fuentes de producción de RLO (Figura 1). Esto ocurre, fundamentalmente, a nivel de la interfase endotelio-vascular.

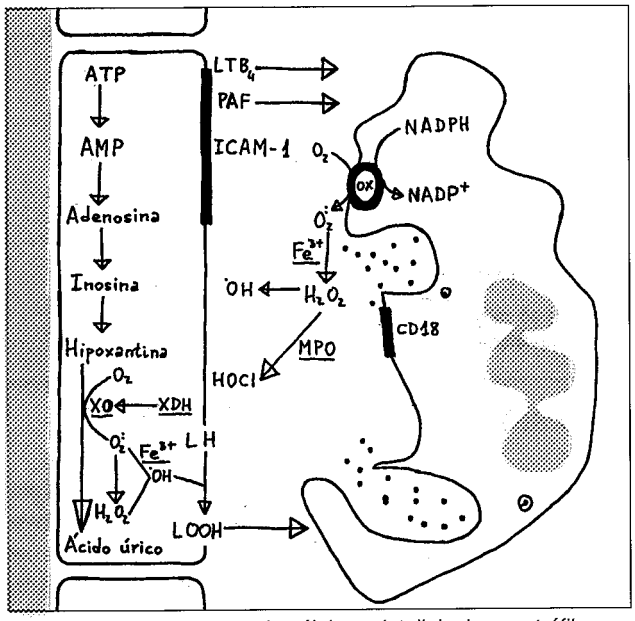

Fig. 1. Interacciones entre la célula endotelial y los neutrófilos tras un fenómeno de isquemia-reperfusión.

XO: xantina oxidasa.
XDH: xantina deshidrogenasa.
MPO: mieloperoxidasa.
NADPH-oxidasa.
ICAM: molécula de adhesión intercelular.

Las moléculas diana del estrés oxidativo son los ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente, lo que origina modificaciones en la membrana celular que alteran su funcionalidad. En los lípidos plasmáticos, las partículas más susceptibles a la oxidación por RLO son las lipoproteínas de baja densidad (LDL)[4], que se convierten en LDLoxidadas, las cuales son citotóxicas para el endotelio. Estas lipoproteínas oxidadas son reconocidas por receptores scavenger de los macrófagos, los cuales se convierten en células espurnosas[5-6].

Los lipoperóxidos, a nivel endotelial, favorecen el aumento de tromboxano A_2 y disnúnuyen el nivel de prostaglandina I_2 y de óxido nítrico, lo cual genera vasoconstricción. Tienen capacidad para intábir la acción de la antitrombina IH, y aumentan la agregabilidad plaquetaria, lo que crea una situación procoagulante[7]. Todo esto pone en relación los RLO con la enfermedad aterosclerótica.

Además, tienen otras acciones, como inactivar proteínas con acción antiproteásica, como la α-1-antitripsina, favoreciendo lesiones inflamatorias pulmonares.

Los RLO tienen una vida media muy corta, lo que hace muy difícil su detección. Por ello, hemos cuantificado una sustancia, MDA, como medida indirecta del daño oxidativo que causan. El MDA se genera como producto de degradación en la oxidación lipídica que originan los RLO.

Nuestro objetivo es medir el nivel de MDA en las distintas fases de la experiencia de isquemia-reperfusión, para comprobar la relación entre RLO y lesión por reperfusión.

MATERIAL Y MÉTODOS

La experiencia fue realizada con 5 conejos blancos New Zealand con un peso comprendido entre 2.5 y 3 kg.

Los animales fueron anestesiados con isoflurano inhalado. Tras la inducción, los animales fueron traqueotomizados, intubados mediante una cánula traqueal pediátrica, y ventilados con un respirador pediátrico Sheffield Mark IV. La anestesia de mantenimiento se realizó con isoflurano al 2% en óxido nitroso.

Una vez intubados, y previa administración de heparina sódica (300 UI/kg i.v.), se les practicó una esternotomía media, disecando la arteria pulmonar izquierda en su origen. Tras canular la aurícula izquierda y tomar la primera muestra de sangre y tejido pulmonar izquierdo (basal), se realizó una ligadura reversible de la arteria pulmonar izquierda durante 15 minutos, al cabo de los cuales fue retirada dicha ligadura.

Las muestras de sangre y tejido, además de las basales ya mencionadas, se obtuvieron al final del período de isquemia, y a los 5, 10 y 15 minutos de estar reperfundiendo el pulmón. Las muestras de sangre se recogieron en tubos de EDTA K3 0.17 M (Vacutainer Systems. Becton Dickinson. USA) y se centrifugaron, conservando el plasma a -20ºC hasta el momento de realizar la determinación. Las muestras de tejido se congelaron en nitrógeno líquido instantes después de extraerse, conservándolas con posterioridad a -20ºC hasta que fueron procesadas. No necesitamos congelar a -80ºC, temperatura idónea para inactivar cualquier actividad metabólica, dado que los niveles de MDA se mantienen estables a -20ºC.

Determinación de lipoperóxidos: en las muestras de plasma empleamos la técnica de Hoving[8], que supone algunas modificaciones respecto a la técnica clásica de Yagi[9]. En primer lugar, realizamos un extracto lipídico del plasma bajo flujo de nitrógeno para evitar posibles interferentes. La reacción de MDA se efectuó con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 74.9 mM (Sigma Chemical. USA. Nº ref. T-5500), optimizando a pH=3.5 con ácido fosfórico 2.5 M.

La reacción se produce a pH bajo y alta temperatura, por lo que calentamos a 95ºC en "baño maría" durante 45 rninutos. A continuación, añadimos 2 ml de N-butanol y, tras centrifugar, medimos la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro a 537 nm.

Para realizar la curva de calibración, se empleó un análogo químico de MDA, el ^{1,1,3},3-tetraetoxipropano (TEP) (Sigma Chemical. USA. N'ºref. T-9889).

Para la determinación de lipoperóxidos en tejido, utilizamos una adaptación del método de Mitsuru y Midori[10] de 1978.

El tejido fue lavado con suero fisiológico y hornogeneizado en un potter con una solución de KCl [1. 15 % (p/v)] en la proporción 1/10 peso/volumen. Utilizamos el mismo análogo químico de MDA (TEP) como patrón para la curva de calibración. El pH de la reacción se optimizó con ácido fosfórico al 1% (p/v), y el cromógeno utilizado fue TBA al 0.6% (p/v).

La reacción de color se desarrolló durante 45 minutos en "baño maría" a temperatura de ebullición. A continuación se añaden 4 ml de N-butanol para extraer el complejo con el TBA y, tras agitar, centrifugar y lavar, se lee la absorbancia del sobrenadante a 535 nm.

Análisis estadístico: se ha realizado mediante el paquete estadístico RSIGMA (Horus Hardware), determinando la tStudent para datos apareados (previamente se comprobó que se ajustaban a una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov).

RESULTADOS

Se observa un ascenso brusco de los valores de MDA en los primeros minutos de la reperfusión. Tras esta rápida elevación, las cifras de MDA van decayendo paulatinamente.

Al comparar los valores obtenidos a los 5 minutos de la reperfusión con los hallados en fase basal y a los 10 minutos de reperfundir, encontramos una muy alta significación estadística ($p<0.001$), que también se mantuvo al contrastarlos con los valores de fase de isquemia y a los 15 minutos postreperfusión, aunque en estos 2 últimos casos el nivel de significación estadística fue algo menor ($p<0.0l$).

Los valores obtenidos a los 10 minutos de la reperfusión casi alcanzaron la significación estadística al compararlos con los valores de fase de isquemia. No fueron significativamente distintos al resto de los valores los hallados a los 15 minutos de la reperfusión.

La media de las cifras de MDA en plasma, en los distintos tiempos de obtención de muestras fue:

- Basal: 0.84 (0.44-1.36) μmol/l.
- Al final del período de isquemia: 0.72 (0.52-1.12) μmol/l.
- A los 5 minutos de reperfusión: 2.33 (1.6-2.88) μmol/l.
- A los 10 minutos de reperfusión: 1. 16 (0.8-1.52) μmol/l.
- A los 15 minutos de reperfusión: 1.03 (0.44-1.36) μmol/l.

En las muestras de tejido, los valores medios obtenidos, expresados en nmol/g de tejido, se recogen en la Tabla 1.

Estas modificaciones de los valores de MDA en tejido no llegaron a alcanzar significación desde el punto de vista estadístico.

TABLA 1

VALORES DE MIDA EN TEJIDO

➢ Basal	218 nmol/g
➢ Al final del período de isquemia	180 nmol/g
➢ A los 5 minutos de reperfusión	280 nmol/g
➢ A los 10 minutos de reperfusión	190 nmol/g
➢ A los 15 minutos de reperfusión	170 nmol/g

DISCUSIÓN

El aumento de lipoperóxidos, detectado en plasma en fase de reoxigenación, demuestra el estrés oxidativo que sufre el tejido. El aumento de lipoperóxidos se detecta mejor en plasma que en tejido, lo que se podría explicar porque, durante la reperfusión, el daño oxidativo ocurre fundamentalmente a nivel de la interfase endotelio-vascular. La acción oxidativa inmediata de los RLO hace que el aumento de MDA se produzca en los primeros minutos de la reperfusión, coincidiendo con la entrada brusca de oxígeno en el territorio isquémico.

Nuestros resultados de MDA en plasma coinciden con los de Bando[11], aunque en la literatura encontremos distintos valores según la técnica empleada para su determinación [12-13].

Autores como Maulik y Lin[14] afirman que el daño que se produce a las 24 horas postreperfusión ya no es debido al efecto de los RLO, sino al release de endotelina y a la activación de la vía de la fosfolipasa mediada por los canales de Ca^{2+}.

Los valores obtenidos para MDA en las muestras de tejido son similares a los de 0hkawa[15] pero, debido al pequeño tamaño de nuestra muestra, el aumento de lipoperóxidos en tejido no fue estadísticamente significativo.

En condiciones normales, el organismo dispone de una defensa antioxidante de componentes enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, ...)[16] y no enzimáticos (vitamina E, ...)[17].

El organismo mantiene una serie de barreras contra la agresión oxidativa. Estas barreras pueden verse desbordadas en situaciones como: dietas deficitarias de antioxidantes (déficit de vitamina E, C, selenio, magnesio, ...), en fumadores con enfermedades que originen deterioro respiratorio, etcétera.

En un proceso de isquemia-reperfusión, se producirá una ruptura brusca del equilibrio procixidación-antioxidación. En estas situaciones, sería de utilidad aplicar una terapéutica antioxidante, la cual podría actuar a varios niveles: impidiendo su producción (inhibiendo las principales vías que los generan, como la de la XO, NADPH-oxidasa)[18] o evitando su acción, como sería el tratamiento con antioxidantes (vitaminas E o C)[19].

La investigación de este tipo de terapéutica favorece el campo de la cirugía y el futuro de los trasplantes de órganos sólidos[20-21].

BIBLIOGRAFÍA

1. Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera. Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxigenation of hypoxic heart. J Moll Cell Cardiol 1980; 12: 797-808.

2. Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. Lab Invest 1982; 12: 797-808.

3. Inauen W, Suzuki M, Granger DN. Mechanisms of cellular injury: potential sources of oxygen free radicals in ischemia/ reperfusion. Microcirc Endoth Lymphatics 1989; 5: 143-55.

4. Salonen JT. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. Lancet 1992; 339: 8837.

5. Reid VC, Mitchinson MJ. Toxicity of oxidised low density lipoprotein toward mouse peritoneal macrophages in vitro. Atherosclerosis 1993; 98: 17-24.

6. Hinsbergh VWM. Biologic generation and metabolic effects of oxidized lipoproteins. Agents Actions 1987; 22: 349-50.

7. Zarco P. Radicales libres y endotelio vascular. Rev Lat Cardiol 1990; 11: 42-5.

8. Hoving EB, Laing C et al. Optimized detemination of malondialdehyde in plasma lipid extracts using 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid. Clin Chim Acta 1992; 208: 63-76.

9. Yagi K. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. En: Yagi K. editor. Lipid peroxides in biology and medicine. New York: Academic Press. 1982: 223-42.

10. Mitsuru U, Midori M. Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. Anal Biochem 1978; 86: 271-8.

11. Bando K, Tago M. Prevention of free radical induced rnyocardial injury by allopurinol. J Thorac Cardiovasc Surg 1988; 93: 465-73.

12. Handriks T, Assmann R. FTA on the fluorimetric assay of circulating lipoperoxides. Clin Chim Acta 1988; 174: 263-70.

13. Gorog P, Kotak DC. Simple and specific test for measuring lipid peroxides in plasma. J Clin Pathol 1991; 44: 7657.

14. Maulik N, Lin X. Release of endothelin during reperfusion of ischernic myocardium. ET-1 release from reperfused heart. Am J Cardiovasc Path 1992; 4: 133-44.

15. Ohkawa H, Ohisi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbiturie acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351-8.

16. Turrens JE Superoxide Dismutases. Drugs of today 1988; 24: 755-65.

17. Nath KA, Paller MS. Dietary deficiency of antioxidants exacerbates ischemic injury in the rat kidney. Kidney International 1990; 38: 1109-17.

18. Aiba M, Yokoyarna Y, Snow TR. Effects of allopurinol pretreatment with pulmonary flush on lung preservation. J Heart Lung Transplant 1992; 11: 1025-30.

19. Murphy ME, Kolvenbach R. Antioxidant depletion in aortic crossclamping ischemia: increase of the plasma alphatocophery1 quinone / alpha-tocopherol ratio. Free Radic Biol Med 1992; 13: 95-100.

20. Nezu K, Kushibe K. Protection against lipid peroxidation induced during preservation of lungs for transplantation. J Heart Lung Transplant 1994; 13: 998-1002.

21. Paller MS. Free radical mediated postischemic injury in renal transplantation. Ren Fail 1992; 14: 257-60.