

Lipoperoxidación de membranas y daño ultraestructural por estrés oxidativo en isquemia-reperfusión miocárdica

JOSÉ MILEI^{MTSAC, 1}, PEDRO FORCADA¹, CÉSAR G. FRAGA², DANIEL R. GRANA¹, ISABELLA TRITTO³, GABRIELE JANNELLI⁴, MASSIMO CHIARIELLO⁴, GIUSEPPE AMBROSIO^{3,5}

Recibido: 14/11/2005

Aceptado: 21/12/2005

Dirección para separatas:

Prof. Dr. José Milei
Instituto de Investigaciones
Cardiológicas (ININCA)
Marcelo T. de Alvear 2270
(C1122AAJ) Buenos Aires,
Argentina
Tel. + 54 (11) 4508-3880/1
Fax. + 54 (11) 4508-3888
e-mail: ininca@fmed.uba.ar

RESUMEN

Introducción

En modelos experimentales, la formación de especies reactivas del oxígeno durante la reperfusión posisquémica induce "estrés oxidativo" que afecta al miocardio. Dado que los pacientes sometidos a cardioplejía sufren isquemia-reperfusión, se sugirió que en ellos habría estrés oxidativo. Sin embargo, este fenómeno aún no se ha caracterizado correctamente.

Objetivo

El propósito del presente trabajo fue correlacionar la liberación de glutatión (el paso inicial de estrés oxidativo) con marcadores de progresión del daño oxidativo, como peroxidación de lípidos de membrana y desarrollo de alteraciones ultraestructurales.

Material y métodos

En 24 pacientes sometidos a cirugía de puente aortocoronario se investigaron cambios en varios marcadores de estrés oxidativo y daño tisular durante la reperfusión posisquémica. Se obtuvieron muestras de sangre y biopsias cardíacas basales y luego de la reperfusión a $40,9 \pm 11,9$ minutos de la cardioplejía. La liberación de glutatión basal fue insignificante ($0,02 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$), pero aumentó a los 15 minutos de la reperfusión ($1,10 \pm 0,40 \mu\text{mol/L}$; $p < 0,05$); también disminuyeron los niveles tisulares de ubiquinol, de $144,5 \pm 52$ a $97,6 \pm 82 \text{ nmol/g}$ ($p < 0,05$). Aunque estos cambios documentan el estrés oxidativo cardíaco, no hubo alteraciones bioquímicas indicativas de daño celular, ya que no se produjo un incremento de marcadores de peroxidación lipídica, tanto en sangre del seno coronario como en las biopsias cardíacas. Tampoco se observaron alteraciones ultraestructurales importantes.

Conclusiones

A pesar de observarse estrés oxidativo en pacientes sometidos a cirugía cardíaca, en las condiciones descriptas, no induce lesiones progresivas de membranas ni daño celular irreversible.

REV ARGENT CARDIOL 2006;74:12-18.

Palabras clave > Cirugía cardíaca - Estrés oxidativo - Daño por reperfusión - Puente aortocoronario - Protección miocárdica

Abreviaturas >	ECG Electrocardiograma	MDA Malondialdehído
	ERO Especies reactivas del oxígeno	TBARS Sustancias reactivas al ácido barbitúrico
	IR Isquemia-reperfusión	

INTRODUCCIÓN

La isquemia-reperfusión (IR) se acompaña de formación de "especies reactivas del oxígeno" (ERO) (1) que pueden inducir "estrés oxidativo", el cual provocaría daño cardíaco mediado por reperfusión, que se sumaría al daño causado por la isquemia. (2, 3)

Investigar el estrés oxidativo en cirugía cardíaca ofrece una oportunidad única de lograr observaciones en condiciones clínicas relevantes, hasta ahora derivadas de modelos experimentales y tendría implicaciones terapéuticas importantes, porque prevenir este fenómeno podría mejorar la protección miocárdica y el posoperatorio.

- Premio XXXII Congreso Argentino de Cardiología

Trabajo subvencionado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y la Universidad de Buenos Aires (Argentina) y la beca #CNRC008A28_005 del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma (Italia)

^{MTSAC} Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

¹ Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Prof. Dr. Alberto C. Taquini" - Facultad de Medicina, UBA-CONICET

² Cátedra de Físico-Química, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

³ División de Cardiología, Universidad de Perugia, Italia

⁴ Departamento de Cardiología, Universidad de Nápoles, Italia

⁵ Miembro Honorario Sociedad Argentina de Cardiología

A diferencia de los resultados observados en modelos experimentales, (4, 5) los estudios clínicos con antioxidantes en cirugía cardíaca no dieron resultados concluyentes. (6-14) Esto se debería en parte a una caracterización incompleta del fenómeno en el ser humano.

En pacientes derivados a cirugía cardíaca, la reperfusión luego de la cardioplejía se acompaña de formación de ERO, como lo demuestra la medición directa de radicales del oxígeno (15) o la liberación de glutatión cardíaco. (16, 17) Sin embargo, la exposición a agentes oxidantes no equivale a daño. De hecho, la vía del glutatión es uno de los principales mecanismos de defensa endógenos antioxidantes. Las ERO, al oxidar al glutatión (que es liberado activamente en forma extracelular), son inactivadas. (18, 19) Por otro lado, cuando el ataque oxidativo continúa o se intensifica, se produce peroxidación de los lípidos de membrana que induce disfunción de las organelas, la cual puede culminar en daño ultraestructural, según se documentó experimentalmente. (20-23) La evidencia de estos fenómenos en pacientes es escasa; (24) más aún, no se reunió información como para poder relacionar las alteraciones y tener una visión fisiopatológica de este fenómeno, lo cual puede limitar nuestra capacidad para desarrollar estrategias óptimas de protección miocárdica perioperatorias.

En este estudio se investigó sistemáticamente si existe una relación entre el estrés oxidativo, la peroxidación de lípidos de membrana y la evidencia ultraestructural de daño tisular irreversible en el corazón de pacientes sometidos a IR durante la cirugía cardíaca.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de pacientes

Se incluyeron 24 pacientes consecutivos programados para cirugía de puente aortocoronario. Los criterios de inclusión fueron: a) historia de angina de esfuerzo (> 3 meses), b) evidencia angiográfica de estenosis \geq 70% de la arteria descendente anterior y al menos uno de los otros vasos coronarios mayores pasibles de cirugía, c) fracción de eyección > 40% y d) ausencia de episodios de cuadros coronarios agudos recientes (> 4 semanas).

Se excluyeron los pacientes con enfermedad valvular y los tratados con carvedilol, captopril y otros agentes antioxidantes. El protocolo fue aprobado y controlado por un Comité de Ética independiente.

Ocho pacientes más se incorporaron en un estudio separado realizado en Italia según se describe más adelante.

Protocolo de estudio

- 1) *Visita de inclusión*: el día 0 (D0), en los pacientes elegibles se realizaron un examen clínico, ECG y ventriculograma radioisotópico con ^{99}Tc para evaluar la función sistólica y diastólica. Se ajustó el tratamiento según fuera necesario.
- 2) *Visita preoperatoria* (D20): se repitió el examen clínico, el ECG y se realizó un nuevo ventriculograma radioisotópico.
- 3) *Cirugía* (D21).

- 4) *Visita de alta* (D31): diez días luego de la intervención, al momento del alta o inmediatamente luego de ella, evaluación como en D0 y D20.

Protocolo quirúrgico

Se consideraron los siguientes parámetros: presión arterial, frecuencia cardíaca, presión de aurícula derecha, presión en arteria pulmonar, gasto cardíaco, el índice de trabajo sistólico y ECG.

La circulación extracorpórea se inició bajo hipotermia leve (32°-33° C). Luego del clampeo aórtico, el corazón se detenía con 500 ml de solución cardiopléjica de Saint Thomas fría (4° C), inyectada en la raíz aórtica a 10 mm Hg. (11) Se introducía una cánula de perfusión en la aurícula derecha a través de una jareta y se avanzaba con control manual en el seno coronario, para el envío retrógrado de solución cardiopléjica (a 4° C) cada 30 minutos y para muestreo de sangre venosa del sistema coronario. Luego de completar los puentes se retiraba el clamp aórtico y se reperfundía el corazón.

Las muestras de sangre (10 ml) se tomaron del seno coronario y de la línea arterial, inmediatamente antes del clampeo y a los 5 y 20 minutos de la reperfusión. El plasma se congeló de inmediato y se guardó para los estudios bioquímicos.

Se tomaron muestras para biopsia miocárdica inmediatamente antes del paro cardíaco y 10 minutos luego de la reperfusión de todo el espesor de la pared anterior del ventrículo izquierdo, cerca de la punta del corazón (Travenol Tru-Cut). Las biopsias se sumergieron de inmediato en glutaraldehído frío para microscopía electrónica o se guardaban en hielo seco para estudio bioquímico. Además, se recolectaron 5 ml de sangre de vena periférica previo a la cirugía, 4 horas luego de la reperfusión y a los 4 días posoperatorios para evaluar los niveles de CPK-MB (Wiener).

Determinaciones bioquímicas

Los tejidos para biopsia se homogenizaron con 10 vol de 120 mM ClK, 30 mM fosfato de potasio (pH 7,4), en presencia de 1 vol de hidroxitolueno butilado (BHT, 4% w/v en etanol). La suspensión resultante se centrifugó a 600 g durante 10 min para descartar los núcleos y otros desechos celulares y el sobrenadante se usó como "homogeneizado de tejido".

La vitamina E (α -tocoferol) y la ubiquinona (ubiquinol-10) se determinaron por HPLC. (25)

El contenido total de glutatión se determinó por espectrofotometría. (26)

Los compuestos di-keto son producidos por peroxidación de radicales de oxígeno y son determinados por sustancias reactivas al ácido barbitúrico (TBARS), tanto en tejidos como en plasma. (27)

Análisis ultraestructural

La metodología de la microscopía electrónica ya fue descrita previamente. (28) El daño celular miocárdico se estableció según una escala de 0-4. Las células que mostraban grados de daño 3 y 4 se consideraron necróticas.

El daño mitocondrial asignó valores de 0 a 4 a cada mitocondria de acuerdo con el grado de alteraciones morfológicas. (29) El valor promedio se obtuvo de dos observadores que expresaban el grado como un porcentaje de las mitocondrias contadas por muestra. Se analizaron aproximadamente 150 mitocondrias por espécimen.

Investigaciones adicionales

Sobre la base de los resultados de la lipoperoxidación, se decidió expandir el análisis para incluir además hallazgos derivados de un estudio realizado simultáneamente en Nápoles, Italia; estos datos se consideraron una segunda

rama y se emplearon solamente para analizar la peroxidación preferencial de diferentes organelas subcelulares.

Se incluyeron 8 pacientes consecutivos derivados a cirugía cardíaca con una técnica quirúrgica similar a la ya descrita. Se tomaron muestras para biopsia de la pared anterior del ventrículo izquierdo con la misma técnica anteriormente explicitada antes de la detención del corazón y 10 minutos luego de la reperfusión para estudios bioquímicos.

El procedimiento para investigar la distribución de la peroxidación lipídica a nivel subcelular se describió previamente. (22, 30)

El homogeneizado en su totalidad así como las fracciones subcelulares se analizaron en busca de MDA (malondialdehído). (31)

Análisis estadístico

Se efectuó la prueba de la "t" para datos apareados de dos colas o para múltiples determinaciones se utilizó la prueba de ANOVA unidireccional, seguida de la prueba de Tuckey-Kramer. En caso de variables categóricas, se usó la prueba de chi cuadrado con la corrección de Yates.

RESULTADOS

Características de los pacientes

Todos los pacientes evaluados e incluidos en el D0 entraron en el protocolo y todos se recuperaron satisfactoriamente de la cirugía, sin apoyo inotrópico. En la Tabla 1 se detallan sus características clínicas y demográficas.

El tiempo de clampeo aórtico alcanzó en promedio $40,9 \pm 11,9$ minutos.

En las primeras 24 horas de la cirugía se observó un incremento de la CK-MB de $2,4 \pm 1,7$ UI/L a $11,5 \pm 6,8$ UI/L ($p < 0,01$), que disminuyó a $6,5 \pm 2,9$ UI/L en el día 4. Un paciente falleció a las 24 horas del posoperatorio debido a un infarto agudo de miocardio y otro por sepsis (mediastinitis) 28 días luego de la operación; estos pacientes no se incluyeron en el análisis.

Función cardíaca

Los parámetros hemodinámicos volvieron a la normalidad en las primeras horas del posoperatorio. La fracción de eyección promedio se mantuvo sin cambios luego de la cirugía.

Marcadores de estrés oxidativo en efluentes cardíacos

Glutación: antes de la isquemia, la concentración de glutación era similar en sangre arterial sistémica y en el seno coronario ($0,7 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/L}$ y $0,8 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/L}$, respectivamente) y durante la reperfusión posisquémica no se modificó el valor arterial (valor pico $0,8 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/L}$; NS), pero se observó un aumento en la sangre venosa del seno coronario ($1,8 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/L}$; $p < 0,01$), que persistió hasta los 20 minutos.

Peróxidos lipídicos: previo a la detención del corazón, los TBARS en la sangre sistémica arterial alcanzaban un promedio de $3,7 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/L}$ y en la sangre del seno coronario este valor era levemente más bajo

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de los pacientes

Parámetros	
Sexo (masculino/femenino)	20/4
Edad (años)	$60,1 \pm 9,2$
Peso (kg)	80 ± 13
Tabaquismo (%)	58
Alcoholismo (%)	29
Episodios anginosos/semana	$4,7 \pm 6,1$
Infarto de miocardio previo (%)	50
Hipertensión (%)	67
Diabetes (%)	21
Hipercolesterolemia (%)	42
Número de lesiones coronarias (ocuidas / > 70%)	
Arteria descendente anterior	3/21
Arteria circunfleja	4/12
Arteria coronaria derecha	9/8
Tronco coronaria izquierda	0/1

($3,3 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/L}$), indicativo de que antes de la isquemia había una tendencia neta a la extracción de peróxidos lipídicos por el corazón. Cinco minutos luego de la reperfusión, las concentraciones de TBARS fueron similares en la sangre arterial ($3,1 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/L}$) y en el seno coronario ($3,1 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/L}$) y persistieron a los 20 minutos de reperfusión.

Marcadores de estrés oxidativo en el tejido cardíaco

Antioxidantes: la concentración cardíaca de ubiquinol disminuyó $> 30\%$ luego de la IR (de $144,5 \pm 52,0$ nmol/g en la biopsias preisquémicas a $97,6 \pm 82,0$ nmol/g 10 minutos posreperfusión; $p < 0,05$). Las concentraciones de α -tocoferol no cambiaron luego de la IR ($42,6 \pm 28$ nmol/g preisquemia y $46,7 \pm 25$ nmol/g en las biopsias 10 minutos posreperfusión).

Peróxidos lipídicos: la concentración de TBARS promedió $0,99 \pm 0,42$ nmol/mg de proteína en las biopsias cardíacas tomadas antes de la cardioplejía y $0,92 \pm 0,37$ nmol/mg de proteína en las biopsias tomadas 10 minutos luego de la reperfusión.

En modelos de daño de reperfusión en animales se observó que la peroxidación de membranas es relativamente baja cuando se mide en homogeneizados cardíacos totales, pero es más pronunciada en ciertas organelas en particular. (21, 22, 30) Por este motivo evaluamos la concentración lipoperóxidos en varias fracciones subcelulares (rama italiana del estudio). En la Tabla 2 puede observarse que tampoco hubo incremento de TBARS en homogeneizados completos de las biopsias posreperfusión ni en las fracciones subcelulares.

Tabla 2. Distribución subcelular de los productos de lipoperoxidación

Espécimen	Buenos Aires		Nápoles	
	Homogenato total (nmol/mg prot)	Homogenato total (nmol/mg prot)	Mitocondrias (nmol/mg prot)	Citosol (nmol/mg prot)
Preisquemia	0,99 ± 0,42	1,07 ± 0,20	1,04 ± 0,16	1,27 ± 0,30
Reperusión	0,92 ± 0,37	1,06 ± 0,20	0,70 ± 0,19	1,04 ± 0,28

Microscopía electrónica

Análisis cualitativo. La arquitectura intracelular de los miocitos estaba conservada en las biopsias preisquémicas. Se observó ocasionalmente edema citosólico e intermiofibrilar leve, con disminución del glucógeno, y las mitocondrias mostraban crestas compactas, sin edema o con signos mínimos de éste (Figura 1).

Luego de la reperusión no se observaron alteraciones morfológicas mayores, tanto de la estructura miocárdica como vascular. A lo sumo se observaron áreas de edema intermiofibrilar y disminución o ausencia de glucógeno y las mitocondrias mostraron daño leve a moderado (Figura 2). Sólo en algunas zonas se observó edema mitocondrial, con disrupción de las estructuras (aclaramiento de la densidad de la matriz y separación de las crestas), hipercontracción leve de los sarcómeros y dilatación de los túbulos T (Figura 2).

Análisis cuantitativo. No se observaron diferencias entre las biopsias preisquémicas y posisquémicas en el daño global ($1,7 \pm 0,5$ versus $1,8 \pm 0,4$). Las mitocondrias son el blanco principal de la lesión de reperusión mediada por oxidación (24) y estos valores se obtuvieron de una evaluación sistemática de más de 6.000 mitocondrias. Antes de la cardioplejia, la gran mayoría de las mitocondrias no mostraban cambios o éstos eran mínimos. Luego de la reperusión había una disminución leve de la proporción de mitocondrias normales y un incremento de las mitocondrias que mostraban alteraciones ultraestructurales (NS).

DISCUSIÓN

En este estudio se evidenció la formación de compuestos oxidantes; sin embargo, el estrés oxidativo fue limitado, dado que no se observó elevación de marcadores de daño de las membranas celulares ni daño ultraestructural grave. Tampoco hubo deterioro de la función cardíaca. Por lo tanto, estos datos indican que no se produce un daño oxidativo mayor durante la reperusión en corazones de pacientes sujetos a cirugía cardíaca, al menos en las condiciones de nuestro estudio.

Los estudios en los que a los pacientes sometidos a cirugía cardíaca se les administraron antioxidantes no mostraron una protección miocárdica consistente y significativa. (6-14) Una posible explicación de esto podría ser que la magnitud del daño mediado por este mecanismo sea modesta en las condiciones halladas durante la cirugía cardíaca actual. Los hallazgos de nuestro trabajo apoyan esta hipótesis.

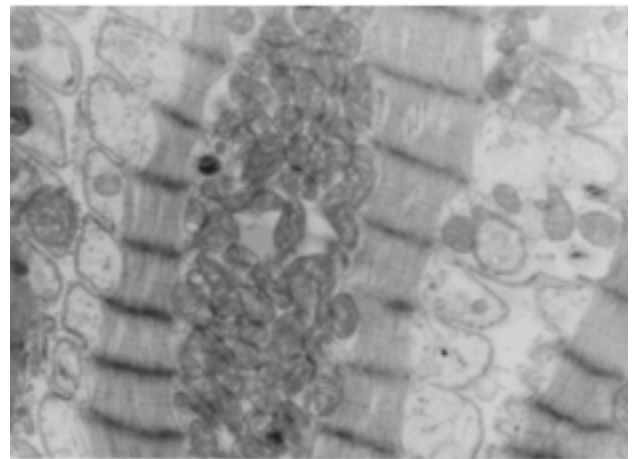


Fig. 1. Microfotografía electrónica de una biopsia de preisquemia. Se observan mitocondrias normales de diferentes tamaños con daño grado I-II, edema citosólico y ausencia de glucógeno. Hay preservación sarcolémica (x8.000).

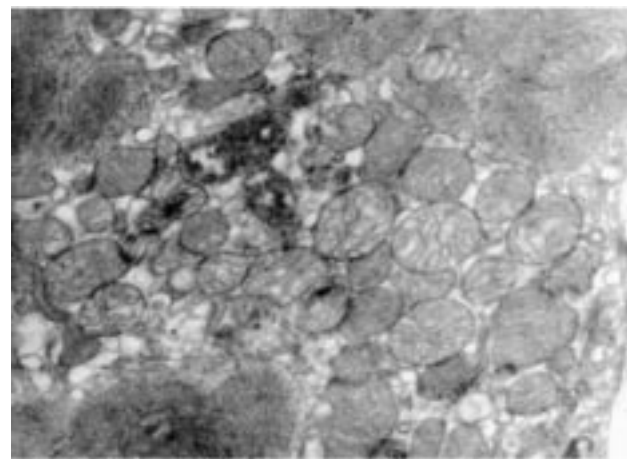


Fig. 2. Microfotografía electrónica de una biopsia de reperusión. Daño mitocondrial grado II-III con ausencia de glucógeno, dilatación sarcotubular y preservación sarcolémica (x10.000).

Se demostró previamente liberación de glutatión en pacientes sometidos a cirugía cardíaca y ésta se interpretó como evidencia de estrés oxidativo. (16, 17) Nosotros observamos liberación de glutatión en el seno coronario durante la reperusión. Sin embargo, esto no significa necesariamente daño oxidativo, ya que podría indicar simplemente la exposición cardíaca a los agentes oxidantes. (19, 32-34) Las ERO oxidan el

glutación; éste no se acumula, sino que es exportado fuera de la célula como parte de una vía de inactivación mayor. (32, 34, 35) Una defensa de primera línea contra los oxidantes son las vitaminas antioxidantes endógenas. En nuestros pacientes, las concentraciones cardíacas de ubiquinol disminuyeron en forma significativa con la reperfusión, consistentemente con el concepto de que las ubiquinonas pueden desintoxicar oxidantes y ser consumidas en dicho proceso. (33)

De cualquier manera, la oxidación de glutatión y las vitaminas antioxidantes son una cadena compleja de eventos disparados por la generación de ERO y estas mediciones deberían completarse con otros índices de ataque oxidativo para poder establecer si ocurrió daño. Este tipo de análisis se trata de presentar en nuestro estudio.

La peroxidación de lípidos insaturados de membrana es una de las principales consecuencias del ataque por ERO, ya que siempre tiene consecuencias deletéreas porque afecta la estructura y la función de las membranas celulares. (20, 23)

Se comunicó aumento de la concentración plasmática (12, 14) y en el seno coronario (36, 37) de TBARS en pacientes sometidos a cardioplejía y reperfusión. Varios factores pueden afectar el nivel plasmático sistémico de TBARS independientemente del ataque oxidativo y por ello se practican correcciones a las determinaciones sistémicas de dichos compuestos. Para evitar este problema, en nuestro estudio la concentración de TBARS se midió simultáneamente tanto en sangre sistémica como en la del seno coronario. De esta manera pudimos verificar que no se producía liberación de peróxidos por el corazón e incluso, en estado basal, hubo consumo neto.

Tampoco detectamos un incremento significativo de lipoperóxidos en los homogeneizados de tejido cardíaco. Es importante destacar que las muestras para biopsia se obtuvieron 10 minutos luego de la reperfusión, en coincidencia con el pico de producción de lipoperóxidos. (20)

Para verificar si la lipoperoxidación era selectiva en ciertas organelas y si a pesar de estar presente fuera "diluida" en el homogeneizado total del tejido, analizamos las subfracciones celulares por centrifugación diferencial y no encontramos diferencias en nuestros pacientes, aun cuando este método es muy eficaz en modelos experimentales para demostrar lipoperoxidación selectiva. (21, 22, 30)

Si consideramos en conjunto la falta de liberación de lipoperóxidos por el corazón, la ausencia de indicadores de lipoperoxidación de las membranas cardíacas y la preservación de la concentración del α -tocoferol, todo parecería indicar que la formación de oxidantes en el corazón no se acompaña de una peroxidación lipídica apreciable en nuestros pacientes. Hasta el momento, una evaluación tan completa sólo estaba disponible en corazones humanos explantados, sometidos a IR, en los que se observó que no

había liberación o incremento de la concentración tisular de MDA. (35)

En este estudio, la ultraestructura miocárdica estaba preservada, con ausencia de las alteraciones características del daño por reperfusión.

Estos hallazgos están parcialmente en desacuerdo con nuestro estudio de 1988, (24) en el que los pacientes eran sometidos a condiciones clínicas similares y se demostró una correlación significativa entre el grado de daño mitocondrial y la quimioluminiscencia inducida por hidroperóxidos. Sin embargo, la diferencia entre las observaciones es esperable debido a la notable mejora en las condiciones preoperatorias y posoperatorias entre ambos estudios.

Desde 1988 al presente hubo mejoras en las técnicas de circulación extracorpórea, como nuevos oxigenadores, bombas centrifugas y circuitos de perfusión que preservan mejor el miocardio durante la cirugía. Además, el tiempo de clampeo en promedio fue de 55 ± 5 minutos en 1988, (24) mientras que en este trabajo fue de $40,9 \pm 11,9$ minutos ($p < 0,01$) y los pacientes incluidos en este estudio tenían su medicación ajustada 3 semanas antes de la cirugía de manera de obtener una protección efectiva. Asimismo, la fracción de eyección se evaluó nuevamente la semana previa a la cirugía para verificar su estabilidad y normalidad.

Limitaciones

Debido a los estrictos criterios de inclusión, estas observaciones no pueden generalizarse a pacientes inestables desde el punto de vista hemodinámico o sintomático y/o a aquellos con función ventricular deteriorada, que son más sensibles a la IR.

Perspectivas

Este estudio puede tener implicaciones importantes. En primer lugar, respecto del estrés oxidativo, indica que éste ocurre y que sus consecuencias no pueden inferirse a partir de una variable, sino que es mejor usar varias determinaciones simultáneas.

Por otro lado, explica la controversia sobre la terapia antioxidante en la cirugía cardíaca, ya que, de acuerdo con estos resultados, la formación de ERO y de lesión oxidativa con las técnicas actuales de circulación extracorpórea es escasa y al ser suficientes los antioxidantes endógenos hace innecesaria una intervención ulterior. Posiblemente, la exposición a cantidades pequeñas de ERO podrían además "preacondicionar" al corazón y hacerlo más tolerante a episodios futuros de isquemia o de IR (38) y si el paciente recibiera antioxidantes podría verse privado de este estímulo favorable para los sistemas de defensa miocárdica contra la isquemia.

En conclusión, los pacientes sometidos a cirugía de puente aortocoronario sufren estrés oxidativo luego de la reperfusión, pero la magnitud de este fenómeno no justificaría el uso de terapia antioxidante.

Agradecimiento

Los autores quieren expresar su agradecimiento al Dr. Luis Molteni por su coordinación en las intervenciones quirúrgicas.

SUMMARY

Formation of Reactive Oxygen Species during Post Ischemic Reperfusion. Ultrastructural Damage

Background

Formation of reactive oxygen species during post ischemic reperfusion in experimental models induces "oxidative stress", which may exert deleterious effects on myocardium. Since during cardioplegic arrest patients undergo ischemia/reperfusion, it has been proposed that oxidative stress might occur during cardiac surgery. However, this phenomenon has not been yet fully characterized.

Study Aim

To correlate glutathione release (the initial step of oxidative stress) with markers of progression of oxidant injury, such as peroxidation of membrane lipids and development of ultrastructural alterations.

Methods and Results

We systematically investigated changes in several markers of oxidative stress and tissue injury occurring during post ischemic reperfusion in 24 patients undergoing coronary artery bypass. Trans-cardiac blood sampling and tissue biopsies were taken at baseline and after reperfusion following an average 40.9 ± 11.9 min cardioplegic arrest. Glutathione release was negligible at baseline (0.02 ± 0.04 $\mu\text{mol/L}$), but markedly increased 15 min after reperfusion (1.10 ± 0.40 $\mu\text{mol/L}$; $p < 0.05$); concurrently, tissue concentration of the antioxidant ubiquinol decreased from 144.5 ± 52.0 to 97.6 ± 82.0 nmol/g ($p < 0.05$). Even though these changes document exposure of the heart to oxidants, this was not accompanied by biochemical alterations indicative of cell injury, since neither coronary sinus blood nor cardiac biopsies showed increased lipid peroxidation. Furthermore, electron microscopy showed no major ultrastructural alterations.

Conclusions

Although an excess of oxidant production occurs in patients undergoing cardiac surgery, in our settings, cardiac oxidative stress did not progress to membrane damage and irreversible injury.

Key words > Cardiac surgery - Oxidative stress - Reperfusion injury - Coronary artery bypass - Myocardial protection

BIBLIOGRAFÍA

- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652-9.
- Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999;138:S69-75.
- Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res* 2000;86:117-8.
- Menasche P, Grousset C, Gauduel Y, Piwnica A. A comparative study of free radical scavengers in cardioplegic solutions. Improved protection with peroxidase. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:264-71.
- Chambers DJ, Braimbridge MV, Hearse DJ. Free radicals and cardioplegia. Free radical scavengers improve postischemic function of rat myocardium. *Eur J Cardiothorac Surg* 1987;1:37-45.
- Ferreira R, Burgos M, Llesuy S, Molteni L, Milei J, Flecha BG, et al. Reduction of reperfusion injury with mannitol cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1989;48:77-83.
- Ferreira R, Burgos M, Milei J, Llesuy S, Molteni L, Hourquebie H, et al. Effect of supplementing cardioplegic solution with deferoxamine on reperfused human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;100:708-14.
- Milei J, Ferreira R, Llesuy S, Forcada P, Covarrubias J, Boveris A. Reduction of reperfusion injury with preoperative rapid intravenous infusion of taurine during myocardial revascularization. *Am Heart J* 1992;123:339-45.
- Yau TM, Weisel RD, Mickle DA, Burton GW, Ingold KU, Ivanov J, et al. Vitamin E for coronary bypass operations. A prospective, double-blind, randomized trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:302-10.
- Westhuyzen J, Cochrane AD, Tesar PJ, Mau T, Cross DB, Frenneaux MP, et al. Effect of preoperative supplementation with alpha-tocopherol and ascorbic acid on myocardial injury in patients undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113:942-8.
- Butterworth J, Legault C, Stump DA, Coker L, Hammon JW Jr, Troost BT, et al. A randomized, blinded trial of the antioxidant pegargotein: no reduction in neuropsychological deficits, inotropic drug support, or myocardial ischemia after coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1999;13:690-4.
- Lassnigg A, Punz A, Barker R, Keznickl P, Manhart N, Roth E, et al. Influence of intravenous vitamin E supplementation in cardiac surgery on oxidative stress: a double-blinded, randomized, controlled study. *Br J Anaesth* 2003;90:148-54.
- Tossios P, Bloch W, Huebner A, Raji MR, Dodos F, Klass O, et al. N-acetylcysteine prevents reactive oxygen species-mediated myocardial stress in patients undergoing cardiac surgery: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1513-20.
- Paraskevaïdis IA, Iliodromitis EK, Vlahakos D, Tsiapras DP, Nikolaidis A, Marathias A, et al. Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance. *Eur Heart J* 2005;26:263-70.
- Wu ZK, Tarkka MR, Eloranta J, Pehkonen E, Kaukinen L, Honkonen EL, et al. Effect of ischemic preconditioning on myocardial protection in coronary artery bypass graft patients: can the free radicals act as a trigger for ischemic preconditioning? *Chest* 2001;119:1061-8.
- Ferrari R, Alfieri O, Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Marzollo P, et al. Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart. *Circulation* 1990;81:201-11.
- Ceconi C, La Canna G, Alfieri O, Cargnoni A, Coletti G, Curello S, et al. Revascularization of hibernating myocardium: rate of metabolic and functional recovery and occurrence of oxidative stress. *Eur Heart J* 2002;23:1877-85.
- Blaustein A, Deneke SM, Stolz RI, Baxter D, Healey N, Fanburg BL. Myocardial glutathione depletion impairs recovery after short periods of ischemia. *Circulation* 1989;80:1449-57.
- Ishikawa T, Zimmer M, Sies H. Energy-linked cardiac transport system for glutathione disulfide. *FEBS Lett* 1986;200:128-32.
- Romaschin AD, Rebeyka I, Wilson GJ, Mickle DA. Conjugated dienes in ischemic and reperfused myocardium: an in vivo chemical signature of oxygen free radical mediated injury. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19:289-302.
- Romaschin AD, Wilson GJ, Thomas U, Feitler DA, Tumiati L, Mickle DA. Subcellular distribution of peroxidized lipids in myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol* 1990;259:H116-23.
- Ambrosio G, Flaherty JT, Duilio C, Tritto I, Santoro G, Elia PP, et al. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J Clin Invest* 1991;87:2056-66.
- Ambrosio G, Zweier JL, Flaherty JT. The relationship between

- oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:1359-74.
24. Ferreira R, Llesuy S, Milei J, Scordo D, Hourquebie H, Molteni L, et al. Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization. *Am Heart J* 1988;115:307-12.
25. Actis-Goretta L, Carrasquedo F, Fraga CG. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. *Clin Chim Acta* 2004;349:97-103.
26. Sies H, Akerboom TP. Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods Enzymol* 1984;105:445-51.
27. De Cavanagh EM, Ferder L, Carrasquedo F, Scrivo D, Wassermann A, Fraga CG, et al. Higher levels of antioxidant defenses in enalapril-treated versus non-enalapril-treated hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999;34:445-55.
28. Milei J, Fraga CG, Grana DR, Ferreira R, Ambrosio G. Ultrastructural evidence of increased tolerance of hibernating myocardium to cardioplegic ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:2329-36.
29. Kloner RA, Fishbein MC, Braunwald E, Maroko PR. Effect of propranolol on mitochondrial morphology during acute myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1978;41:880-6.
30. Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, et al. Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J Biol Chem* 1993;268:18532-41.
31. Liedtke AJ, Mahar CQ, Ytrehus K, Mjos OD. Estimates of free-radical production in rat and swine hearts: method and application of measuring malondialdehyde levels in fresh and frozen myocardium. *Basic Res Cardiol* 1984;79:513-8.
32. Ambrosio G, Santoro G, Tritto I, Elia PP, Duilio C, Basso A, et al. Effects of ischemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress. *Am J Physiol* 1992;262:H23-30.
33. Ferrara N, Abete P, Ambrosio G, Landino P, Caccese P, Cirillo P, et al. Protective role of chronic ubiquinone administration on acute cardiac oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:858-65.
34. Abete P, Napoli C, Santoro G, Ferrara N, Tritto I, Chiariello M, et al. Age-related decrease in cardiac tolerance to oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:227-36.
35. Janssen M, Koster JF, Bos E, de Jong JW. Malondialdehyde and glutathione production in isolated perfused human and rat hearts. *Circ Res* 1993;73:681-8.
36. Menasche P, Antebi H, Alcindor LG, Teiger E, Perez G, Giudicelli Y, et al. Iron chelation by deferoxamine inhibits lipid peroxidation during cardiopulmonary bypass in humans. *Circulation* 1990;82:IV390-6.
37. Ferreira R, Fraga C, Carrasquedo F, Hourquebie H, Grana D, Milei J. Comparison between warm blood and crystalloid cardioplegia during open heart surgery. *Int J Cardiol* 2003;90:253-60.
38. Tritto I, D'Andrea D, Eramo N, Scognamiglio A, De Simone C, Violante A, et al. Oxygen radicals can induce preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res* 1997;80:743-8.

AMBULANCIAS PARA HERIDOS

1792: el cirujano militar francés Dominique Jean Larrey establece por primera vez las llamadas "ambulancias" (*ambulances volantes*). El ejército francés de la Revolución, que desde 1792 está en guerra con Austria y Prusia, se enfrentó a graves problemas: los servicios sanitarios no podían seguir el avance de las tropas y asistirlos en el campo de batalla. Lo normal era transportar a los heridos en carretas sin techo, por caminos muy difíciles de transitar, hasta hospitales improvisados en las iglesias. La mayoría morían en el camino y con frecuencia no se recogía a los heridos hasta que terminara la batalla. Larrey, que se hizo famoso por mejorar métodos quirúrgicos, concretamente las técnicas de amputación, creó las ambulancias mientras trabajaba como médico del Estado Mayor en el ejército del Rin. Formó grupos de tres cirujanos a caballo y una persona que asistía a los enfermos, provistos de vendas y canastas para transportar a los heridos; de esta forma podían atenderlos en el campo de batalla. Las canastas se sustituyeron por carruajes ligeros con ballestas. Así comenzaron las primeras ambulancias.
