

# Temas de actualidad

## Nuevos conceptos en isquemia miocárdica y las lesiones de reperfusión

RICARDO FERREIRA\*, JOSE MILEI\*\*

\* Servicio de Cirugía Cardiovascular (ECAVI), Sanatorio Colegiales

\*\* Sección Patología, Hospital Instituto de Cardiología "Fundación Hermenegilda Pombo de Rodríguez", Academia Nacional de Medicina

*Dirección para separatas:* Servicio de Cirugía Cardiovascular (ECAVI), Sanatorio Colegiales, Conde 851, (1426) Buenos Aires, Argentina

La secuencia de fenómenos histoquímicos y cambios en la ultraestructura de la célula miocárdica como consecuencia de la isquemia han sido señalados por diversos autores.<sup>1-3</sup> En normotermia, el cese del flujo coronario produce alteraciones inmediatas al interrumpirse la fosforilación oxidativa. Este proceso, que se verifica a nivel de las crestas mitocondriales, genera, a partir de sustratos (ácidos grasos libres) y de oxígeno, ATP que es utilizado para mantener la homeostasis celular (bombas de intercambio iónico y metabolismo basal) y la función contráctil.<sup>4</sup> La glicólisis anaeróbica que se instala es insuficiente en la producción de ATP y se autolimita debido a la acidosis intracelular generada por la acumulación de lactato y NADH.

Una de las consecuencias inmediatas es el ingreso de sodio y agua con el consiguiente edema celular. La inactivación de la bomba sodio-potasio y el aumento excesivo de catabolitos y protones secundario al consumo de ADP y AMP, son los principales responsables de este mecanismo (Fig. 1).

### PAPEL DEL CALCIO EN LA ISQUEMIA

Zimmerman y colaboradores<sup>5</sup> observaron que la reinstalación del flujo en el corazón aislado (modelo Langendorff) perfundido con una solución libre de calcio, producía lesiones mayores que en aquellos perfundidos con una cierta concentración de calcio. Esta observación experimental la denominó "la paradoja del calcio". Las observaciones de Nayler y otros<sup>6,7</sup> parecen enfocar como sitio inicial de la lesión al disco intercalar. Es éste una compleja estructura constituida por regiones especializadas y la zona de unión entre sarcómeros, y se presume que la transmisión de la tensión contráctil entre célula y célula ocurre a ese nivel. Durante la primera fase de la paradoja del calcio se han obser-

vado separaciones a nivel del disco intercalar a expensas de la fascia adherens y mácula adherens. Estas lesiones se acentúan a medida que transcurre la isquemia, hasta llevar a una pérdida total de cohesión. En la reperfusión, la contracción precipita la ruptura del disco intercalar, facilitando el ingreso de calcio, agua y macromoléculas. De este modo, los sarcómeros se condensan formando bandas de contracción que ya algunos consideran como signo de muerte celular. En la reperfusión, el ingreso masivo del calcio es deletéreo, ya que precipita el consumo de ATP, activa las proteasas y fosfolipasas, causando disrupción de la membrana celular y precipitando la cascada del ácido araquidónico, que entre otros subproductos genera tromboxano. Como es sabido, el tromboxano ocasiona una miríada de efectos farmacológicos, fundamentalmente agregación plaquetaria y vasoespasmo.<sup>8</sup>

Respecto de los mecanismos que facilitan el ingreso irrestricto del  $Ca^{2+}$  en la célula, se considera que los más importantes son: 1) la inactivación de la bomba del  $Ca^{2+}$ , situada en el sarcolema. Este mecanismo es ATP dependiente, ya que la expulsión de este catión se realiza contra gradiente. Se encuentra inactivada por la isquemia y la recuperación de este sistema durante la reperfusión no es inmediata. 2) La membrana plasmática sufre alteraciones de grado variable durante la reperfusión y se supone que el control del ingreso del  $Ca^{2+}$  a través de la misma se halla perturbado. 3) La inversión de flujo iónico del sistema transportador  $Na^{+}/Ca^{2+}$ . Normalmente, éste funciona intercambiando dos moléculas de  $Na^{+}$  que ingresan a la célula por una de  $Ca^{2+}$  que sale al espacio intersticial. Durante la isquemia se produce un ingreso excesivo de  $Na^{+}$ , que en la reperfusión la célula trata de eliminar hacia el exterior. Lo realiza in-

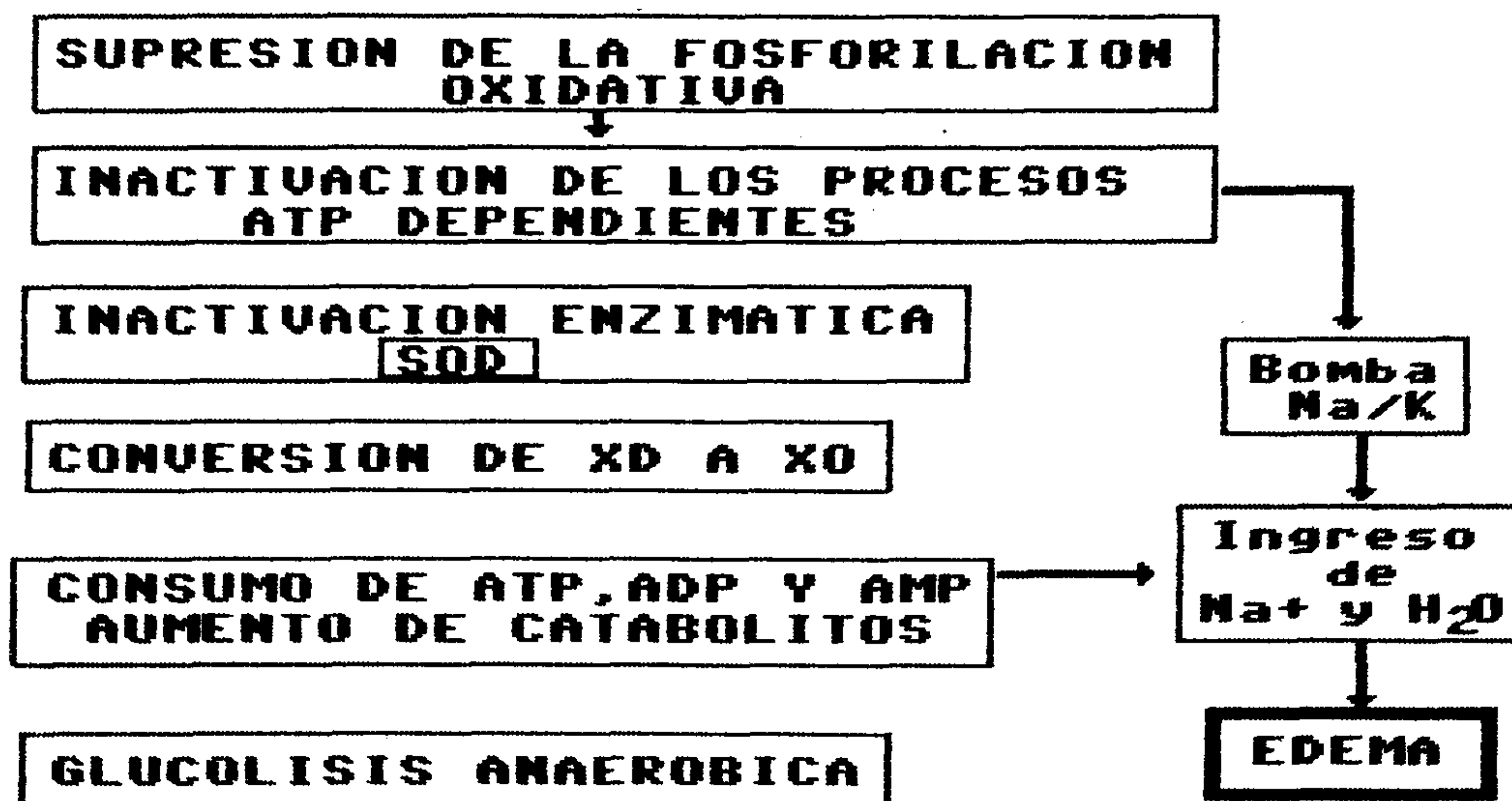


Fig. 1. Cambios metabólicos producidos por la anoxia en la célula miocárdica.

virtiendo el flujo del sistema transportador, o sea expulsando el  $\text{Na}^+$  a cambio del ingreso del  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>1, 2, 10</sup>

La paradoja del calcio puede ser contrarrestada de diversas maneras. La más importante es sin duda la hipotermia. Otras formas de neutralizarlo son los bloqueantes cálcicos, un pH entre 6,8 y 7 y las soluciones pobres en sodio. Obviamente la reducción del tiempo de isquemia juega un papel fundamental. No obstante, durante la etapa de la reperfusión, las lesiones que se producen en la estructura celular no son imputables al calcio exclusivamente. Ni siquiera puede decirse que constituye el mecanismo más importante.

#### LA PARADOJA DEL OXIGENO.

##### LOS RADICALES LIBRES

Hearse y colaboradores<sup>11, 12</sup> observaron que, al reinstaurarse el flujo sanguíneo luego de un período de isquemia, el daño celular se acentuaba. A este fenómeno contradictorio se lo denominó "la paradoja del oxígeno". A principios de la década del 80 diversos trabajos experimentales han atribuido a un grupo de metabolitos gran parte de la responsabilidad de los daños de reperfusión y los principales implicados de la llamada "paradoja del oxígeno".<sup>9, 13-15</sup> Estos agentes son los radicales libres del oxígeno (RL).

El oxígeno en la cadena de transporte de electrones se reduce en forma tetravalente. En aproximadamente un 5% de este proceso, la reducción es univalente con generación de RL. Estos están constituidos por moléculas que poseen electrones desapareados; son químicamente muy inestables

y activos y actúan sobre otras moléculas reduciéndolas u oxidándolas. Del oxígeno se conocen tres radicales libres: el hidróxilo ( $\text{OH}^\circ$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Todos ellos son citotóxicos, particularmente el primero.<sup>16</sup>

Una de las características de los organismos aeróbicos es la de poseer mecanismos celulares de defensa contra estos metabolitos. Fundamentalmente son enzimas como la superoxidodismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión oxidasa y reductasa y estructuras moleculares "sofocadoras" de los RL como el alfa tocoferol, el ácido ascórbico y el beta caroteno. La SOD dismuta el  $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la catalasa degrada a este último en agua. Milei y colaboradores han demostrado experimentalmente la acción protectora de las vitaminas A y E en la cardiopatía por adriamicina, cuya toxicidad se ejerce por liberación de radicales libres.<sup>17, 18</sup>

Los mecanismos de defensa celulares son aptos para neutralizar la reducida producción de RL que liberan los procesos metabólicos de las distintas estructuras del miocito. No obstante son insuficientes para neutralizar grandes cantidades de RL, condición que ocurre en el fenómeno isquemia-reperfusión. Como se observa en la Figura 1, desde los primeros minutos de isquemia se inhiben y disminuyen las reservas de SOD y presumiblemente también de las restantes enzimas. Además, por efecto de la isquemia, la xantino dehidrogenasa, enzima que depura las xantinas produciendo ácido úrico y NADH, vira a xantino oxidasa, que genera ácido úrico y  $\text{O}_2^-$ . Se considera que aproximadamente el 95% de la enzima original (tipo D)

vira a xantino oxidasa (tipo O) dentro del primer minuto de anoxia.<sup>16, 19</sup>

En la reperfusión, el reingreso de oxígeno lleva a una alta generación de  $O_2^-$ . El anión superóxido, en virtud de la reacción de Haber-Weiss y en presencia de hierro, produce el altamente citotóxico radical oxhidrilo.<sup>16</sup> El  $OH^\circ$  interacciona con prácticamente todas las estructuras celulares dañándolas, pero su actividad citotóxica se centra en las membranas celulares, principalmente, la membrana plasmática, debido a la presencia en las mismas de altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados.

### MECANISMO DE ACCION DE LOS RL. LIPOPEROXIDACION

Los RL interaccionan en las dobles uniones de las cadenas de ácidos grasos, rompiéndolas, con generación de lipoperóxidos. El fenómeno de lipoperoxidación es una reacción autocatalítica y por lo tanto se "autoalimenta", ya que las moléculas de  $HO^\circ$ , al interaccionar con las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, generan radicales de ácidos grasos y peróxidos, propagándose de esta manera el fenómeno de lipoperoxidación. Esta reacción terminaría cuando los peróxidos se neutralizan entre sí o por la acción de antioxidantes o sustancias sofocadoras como la peroxidasa y las vitaminas A, E y ácido ascórbico, normalmente presentes en la célula.<sup>20-23</sup>

La rotura, a diversos niveles, de las cadenas de ácidos grasos y de moléculas proteicas presentes en la superficie de la membrana, determina que ésta pierda sus características físicas, facilitando el ingreso de agua, calcio y macromoléculas y conduciendo a la muerte celular. Se han realizado numerosos estudios experimentales, particularmente en el modelo Langendorff, detectando la presencia de RL y su vinculación con las lesiones de reperfusión.<sup>24-27</sup> Ferreira y colaboradores<sup>28</sup> demostraron, en pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica, la acción citotóxica de los RL, analizando durante la etapa de reperfusión la lipoperoxidación por técnica de quimioluminiscencia.

Como los RL son especies altamente excitadas y muy inestables, su duración es efímera y por lo tanto difíciles de dosar. La mayoría de las técnicas (excepto la resonancia magnética nuclear) son indirectas y las más aplicadas se basan en la cuantificación de la magnitud de la lipoperoxidación. Esto puede lograrse dosando malondialdehído, que es uno de los productos finales de esta reacción autocatalítica, o por medio de la quimioluminiscencia. Sintéticamente, esta técnica consiste en

detectar y cuantificar la energía que en forma de fotones produce la etapa terminal de la lipoperoxidación. Boveris y colaboradores<sup>29, 30</sup> y Chance y colaboradores<sup>31</sup> han trabajado extensamente con este método y demostraron su sensibilidad, aparentemente mayor que la del dosaje de malondialdehído.

### IMPLICANCIA DE LOS RL EN EL INFARTO DE MIOCARDIO Y LAS MIOCARDIOPATIAS

Existen otras situaciones, además del mecanismo isquemia-reperfusión, donde los RL parecen tener un rol predominante. En el infarto agudo de miocardio (IAM) y diversas miocardiopatías donde se observa infiltrado leucocitario se ha demostrado la acción citotóxica de los RL. En estos casos la liberación de los mismos está mediada por los leucocitos. En el IAM, y aproximadamente dentro de las seis horas de su evolución, la liberación del complemento C3 inicia una infiltración leucocitaria a predominio de polimorfonucleares.<sup>32</sup> Los leucocitos son verdaderas fábricas de producción de RL debido a las enzimas que poseen, y descargan, en la zona del infarto y adyacencias, una elevada concentración de RL. Este fenómeno contribuiría al incremento del área de tejido dañado por el infarto.<sup>33, 34</sup> Fetchner y colaboradores<sup>35</sup> han demostrado clínicamente este mecanismo en pacientes con infarto agudo de miocardio y síndrome preinfarto.

En las cardiomiopatías, como en la enfermedad de Chagas, en las miocarditis inespecíficas y en la producida por el rechazo de un homoinjerto, se observa un fenómeno similar.<sup>16, 36</sup>

### VALOR PRACTICO DE LOS RECIENTES AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DE LA FISIOPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA

El fenómeno de isquemia-reperfusión se presenta en dos situaciones sumamente frecuentes: durante la cirugía cardíaca y en el IAM. En la primera circunstancia dicho fenómeno ha sido controlado con las técnicas de protección miocárdica rutinariamente aplicadas. El mecanismo de acción de éstas se basa en producir una reducción sustancial del metabolismo celular mediante la hipotermia y el paro cardíaco en diástole por despolarización de la membrana con soluciones que contienen una elevada concentración de potasio.

En modelos experimentales se ha demostrado extensamente la acción protectora de los bloqueantes cálcicos (particularmente el diltiazem), y a partir de 1982, de los agentes antioxidantes. Sin embargo, en pacientes sometidos a cirugía cardíaca hay escasa aplicación de los primeros y nin-

**Tabla 1**  
Principales agentes antioxidantes que han sido empleados experimentalmente sobre el miocardio

Agente	Mecanismo de acción
SOD	Cataliza la disminución del $O_2^-$ formando $H_2O_2$
Catalasa	Cataliza la conversión del $H_2O_2$ en $H_2O$
Peroxidasa	Interfiere las fases de la lipoperoxidación
Allopurinol	Inhibe la acción de la XO
Manitol	Reduce el $HO^\circ$
Deferoxamina	Bloquea la reacción que genera $HO^\circ$
Trimetazidina	No se halla definido su mecanismo de acción
Vitaminas A, E y C	Reducen el $O_2^-$ produciendo $H_2O_2$ . Desactivan productos finales de la lipoperoxidación

SOD: superoxidodismutasa; XD: xantinoxidasa;  $O_2^-$ : radical peróxido de hidrógeno;  $HO^\circ$ : radical hidróxilo.

guna de los segundos. Este es un campo que está aún por desarrollarse y que sin duda contribuirá a obtener una mejor protección miocárdica durante el stress quirúrgico. Se han empleado experimentalmente numerosos agentes antioxidantes (Tabla 1) y la mayoría de ellos pueden ser administrados previamente a la cirugía o durante la misma, tanto en la circulación extracorpórea como en las soluciones cardioplégicas.

En el IAM en su fase inicial se ha demostrado, también experimentalmente, una reducción del área infartada con la administración de antioxidantes. En trasplantes renales experimentales, estos agentes han demostrado una mejor preservación del injerto. No hay estudios hasta el presente que indiquen haber aplicado estos resultados en humanos. Tampoco existe la experiencia respecto del empleo de antioxidantes para neutralizar la liberación de los RL mediados por los leucocitos durante la fase de rechazo agudo.

La miocardiotoxicidad de algunos fármacos como la adriamicina puede ser controlada por la administración de atrapadores de RL. En esta línea de investigación se han empleado con éxito las vitaminas A y E, como se señaló previamente. Por lo tanto, el conocimiento adquirido acerca de la acción citotóxica de los polimorfonucleares y de ciertas drogas, basado en su capacidad de producir RL, abre posibilidades a nuevas terapéuticas que merecen ser desarrolladas.

#### BIBLIOGRAFIA

- Nayler WG, Elz JS: Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma? *Circulation* 74: 215, 1986.
- Hearse DJ: Reperfusion of the ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 9: 605, 1977.

- Buckberg GD: Studies of controlled reperfusion after ischemia. I. When is cardiac muscle damaged irreversibly? *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 483, 1986.
- Katz AM: *Physiology of the heart* (6ª ed), p 51. Raven Press, New York, 1986.
- Zimmerman ANE, Hulsmann WC: Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 211: 646, 1966.
- Ganote CE, Nayler WG: Contracture and the calcium paradox. *J Mol Cell Cardiol* 17: 733, 1985.
- Muir AF: The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J Anat* 101: 239, 1967.
- Moncada S, Higgs ER: Arachidonate metabolism in blood cells and the vessel wall. *Clinics in Haematology* 15: 273, 1986.
- Hess ML, Man NH: Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 16: 969, 1984.
- Wens SW, Shea MJ, Lucchesi BR: Free radicals in ischemic myocardial injury. *J Free Radic Biology & Medicine* 1: 103, 1985.
- Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB: Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused heart. A study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 5: 395, 1973.
- Hearse DJ, Humphrey SM, Nayler WG, Slade A, Border D: Ultrastructural damage associated with oxygenation of the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 7: 315, 1975.
- Guarnieri C, Flamigni F, Caldara CM: Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 12: 797, 1980.
- Shlafer M, Kane PF, Kirsh MM: Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic reperfused heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 83: 830, 1982.
- Stewart JR, Blacwell WH, Crute SL et al: Inhibition of surgically induced ischemia/reperfusion injury by oxygen free radical scavengers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 86: 262, 1983.
- Thompson JA, Hess ML: The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis. *Progress Cardiovasc Disease* 28: 449, 1986.
- Milei J, Boveris A, Llesuy S, Molina A, Storino R, Ortega D, Milei SE: Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J* 111: 95, 1986.
- Llesuy S, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S: Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71: 241, 1985.
- Fridovich I: Superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 44: 147, 1975.
- Hess M, Manson NH, Okabe E: Involvement of free radicals in the pathophysiology of ischemic heart disease. *Can J Physiol Pharmacol* 60: 1382, 1981.
- White BC, Krause GS, Aust SD, Eyster GE: Postischemic tissue injury by iron-mediated free radical lipid peroxidation. *Ann Emerg Med* 14: 804, 1985.
- Freeman BA, Crapo JD: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412, 1982.
- Llesuy S: Quimioluminiscencia e injuria celular oxidativa en órganos de mamíferos. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, 1986.
- Menasche P, Grousset C, Gauduel Y, Piwnica A: A comparative study of free radical scavengers in cardioplegic solution. Improved protection with peroxidase. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 264, 1986.
- Bernier M, Hearse DJ, Manning AS: Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. *Circ Res* 58: 331, 1986.
- Otani H, Engelman RM, Rousou JA, Breyer RH, Lemeshow S, Das DK: Cardiac performance during reperfusion improved by pretreatment with oxygen free-radical scavengers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 91: 290, 1986.
- Gardner TJ, Stewart JR, Casale AS, Downey JM, Chambers

- DE: Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. *Surgery* 94: 423, 1983.
28. Ferreira R, Llesuy S, González Flecha B, Storino R, Molteni L, Hourquebie H, de Palma C, Scordo D, Milei J: Mediación de los radicales libres del oxígeno en pacientes sometidos a cirugía cardíaca. *Medicina* 46: 608, 1986.
29. Boveris A, Cadenas E, REiter R, Filipkowsky M, Nakase Y, Chance B: Organ chemiluminescence: non invasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Nat Acad Sci USA* 77: 347, 1980.
30. Boveris A, Cadenas E, Chance B: Ultraweak chemiluminescence: a sensitive assay for oxidative radical reactions. *Fed Proc* 40: 23, 1981.
31. Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527, 1979.
32. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbein GW: Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 251: H314, 1986.
33. Weiss SJ, LoBuglio AF: Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 47: 5, 1982.
34. Babior BM: Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64: 959, 1984.
35. Fetchner J, Artigou JL, Goy J, Emerit J, Grosgeat Y: Toxicité des radicaux libres au cours de l'insuffisance coronaire. *Arch Mal Coeur* 79: 1017, 1987.
36. Parks DA, Bulkey GB, Granger DN: Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery* 94: 428, 1983.