

Producción de radicales libres en colgajo microvascular: Un modelo para estudiar daño isquémico post reperfusión. Caso clínico

⁽¹⁾ Sergio Sepúlveda, ⁽²⁾ Omar Valenzuela, ⁽³⁾ Claus Behn, ⁽⁴⁾ José Galaz, ⁽⁵⁾ Denise Manieu, Daniela Merino, Cristián Palma, Oscar Araneda.

Resumen

La cuantificación de radicales libres liberados post reperfusión de un colgajo microvascular fue investigada a través de un modelo clínico. La determinación plasmática pre y postoperatoria de radicales libres fue comparada en una paciente sometida a reconstrucción mamaria con colgajo libre músculocutáneo, utilizando muestras procedentes exclusivamente del tejido isquémico transplantado y reperfundido mediante microanastomosis. La cuantificación de la producción de radicales libres se efectuó con un método de captación luminiscente. Los resultados demuestran que post isquemia de dos horas e iniciada la revascularización, existe un aumento de radicales libres en esta paciente, lo que hace indispensable iniciar una serie clínica prospectiva con el objeto de validar esta información preliminar. Creemos que el autotransplante de tejidos con

microcirugía es un excelente modelo para estudiar la magnitud del daño post reperfusión, cuantificando la producción de radicales libres post isquemia, lo que es relevante para una posible inhibición de la liberación de radicales libres con medicamentos antioxidantes y con ello disminuir el índice de necrosis tisular en estos transplantes de tejidos.

Summary

Oxygen-derived free radicals after free flap reperfusión were investigated in a clinical model. Superoxide blood levels prior and after reperfusión were quantified in a patient who underwent breast reconstruction with a free TRAM flap. Collection of blood samples were obtained from free flap via a venous route.

Superoxide levels were quantified by a chemiluminescence method. Elevation of blood oxygen-derived free radical levels were correlated with successful vascular patency after reperfusión. A prospective clinical series will be necessary. Our findings appear to demonstrate that a free flap is an excellent model to study ischemia reperfusión injury and the superoxide levels are a promising clinical marker which can predict vascular insufficiency during reperfusión following tissue ischemia.

Introducción

Existe suficiente evidencia experimental que indica que la liberación de radicales libres (oxigenados), que se generan durante la reperfusión de un tejido previamente isquémico, ejerce un daño parenquimatoso y microvascular en muchos órganos o tejidos. Según

⁽¹⁾Dpto. de Cirugía -
Unidad Cirugía
Plástica,

Hospital Clínico de la
Universidad de Chile

⁽²⁾Departamento de
Medicina. Hospital

Clínico de la
Universidad de Chile.

⁽³⁾ICBM Departamento
de Fisiología.

⁽⁴⁾Bioquímica

Departamento Fisiología
ICBM

⁽⁵⁾Alumnos de Medicina.
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

el grado de isquemia, el daño puede traducirse en un aumento de la permeabilidad que resulta en producción de edema, infiltración neutrofílica con liberación de enzimas citosólicas a la circulación o en casos más graves, cambios micro o macroscópicos que conducen a la destrucción tisular^(1,2,3,4).

El daño tisular de un tejido isquémico ocurre en dos etapas: la primera es inducida por la interrupción del flujo sanguíneo y depende de la duración de ésta y la segunda que ocurre en el período de reperfusión inmediata⁽⁵⁾. Un período prolongado de isquemia tisular representa una condición favorable para la formación de radicales libres oxigenados en la etapa de reperfusión⁽⁶⁾. En un reporte previo del autor⁽⁷⁾, se demuestra que los leucocitos polimorfonucleares jugarían un rol fundamental en la liberación de estos radicales. La infiltración de estos leucocitos en el músculo esquelético⁽⁸⁾, colgajos cutáneos, intestino e hígado sujetos a daño isquémico post reperfusión experimentales, apoyan esto.

La producción de radicales libres en el ser humano representa un mecanismo de defensa ante la injuria tisular, sin embargo esto termina resultando deletéreo para algunos órganos o tejidos, lo que hace complejo asociar una causa definida al aumento de radicales libres en humanos. Sin embargo un colgajo microvascular que ha sido sometido a isquemia y que luego es vascularizado permite la cuantificación fiel de la producción de radicales post reperfusión, lo que parece ser un modelo experimental «in vivo» muy adecuado.

Material y método

Una paciente de sexo femenino de 37 años, que ingresa a la Unidad de Cirugía Plástica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile para una reconstrucción mamaria, la incluye voluntariamente en este estudio de detección y cuantificación de radicales libres. Se somete a una encuesta prototipo de búsqueda de factores que alteren los niveles de radicales libres plasmáticos. Destaca el hábito tabáquico, la qui-

mioterapia, alteraciones del sueño y stress previo a la cirugía.

El procedimiento quirúrgico planificado fue una reconstrucción mamaria con un colgajo miocutáneo libre (microquirúrgico) de recto abdominal (TRAM). Este colgajo se obtiene identificando claramente uno de sus pedículos vasculares, vasos epigástricos inferiores, y se transplanta al tórax mediante la anastomosis microvascular de la arteria y de la vena, quedando el colgajo previo a su revascularización, al menos, dos horas en isquemia fría completa. Se obtienen muestras de sangre venosa pre y post perfusión del colgajo obtenidas de la vena del colgajo post revascularización inmediata, lo que asegura muestras de sangre venosa exclusiva del tejido transplantado.

La cuantificación de radicales libres se realiza a través de la emisión luminosa emanada de la unión de los radicales libres a un compuesto químico llamado luminol. Este reactivo al ser oxidado por los radicales libres emite fotones que son censados por un contador de centelleo Beckmann LS 6000 TA. La información es enviada a un procesador lo que nos permite obtener curvas de luminiscencia en el tiempo. Las muestras de sangre venosa fueron anticoaguladas y mezcladas con 1800 ul de Buffer CVB, que tiene la propiedad de conservar la viabilidad de los elementos celulares sanguíneos, se agrega 100 ul de luminol, 100 ul de Zymozan opsonizado que estimula el «burst» respiratorio de los fagocitos polimorfonucleares y neutrófilos, creando así el tiempo cero de la reacción.

Resultados

Los resultados obtenidos demuestran que existe una diferencia considerable en la cuantificación de radicales libres en muestras de plasma preoperatorio versus las muestras procedentes de sangre venosa procedente exclusivamente del tejido revascularizado.

La figura 1 compara las curvas de luminiscencia de muestras sanguíneas pre y postoperatorias. Se observa que la curva preoperatoria tiende a ser lineal, con

Figura 1

Comparación de luminiscencias, muestras sanguíneas pre y post operatorias.

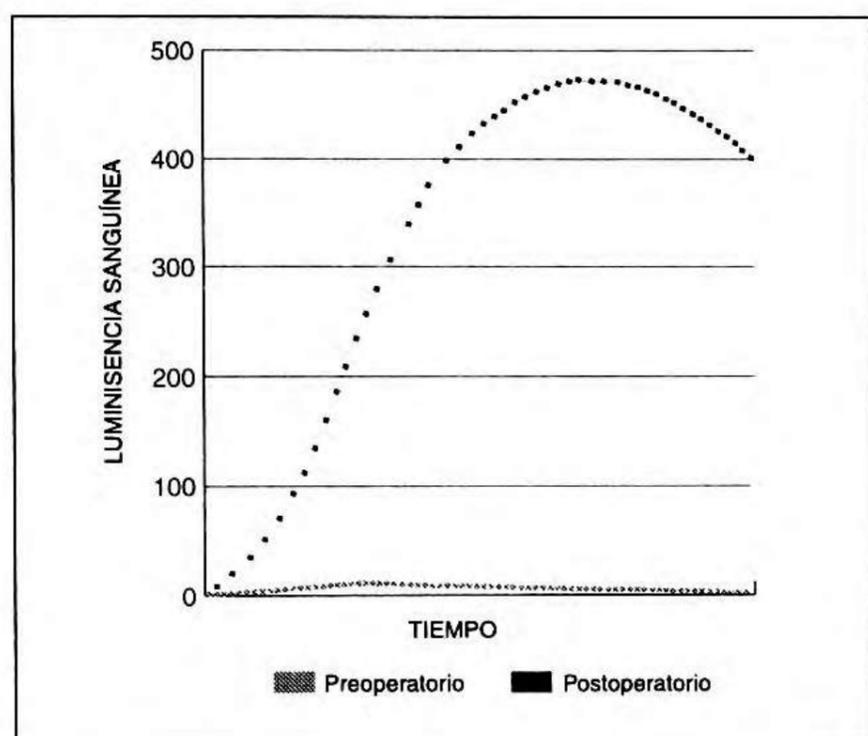
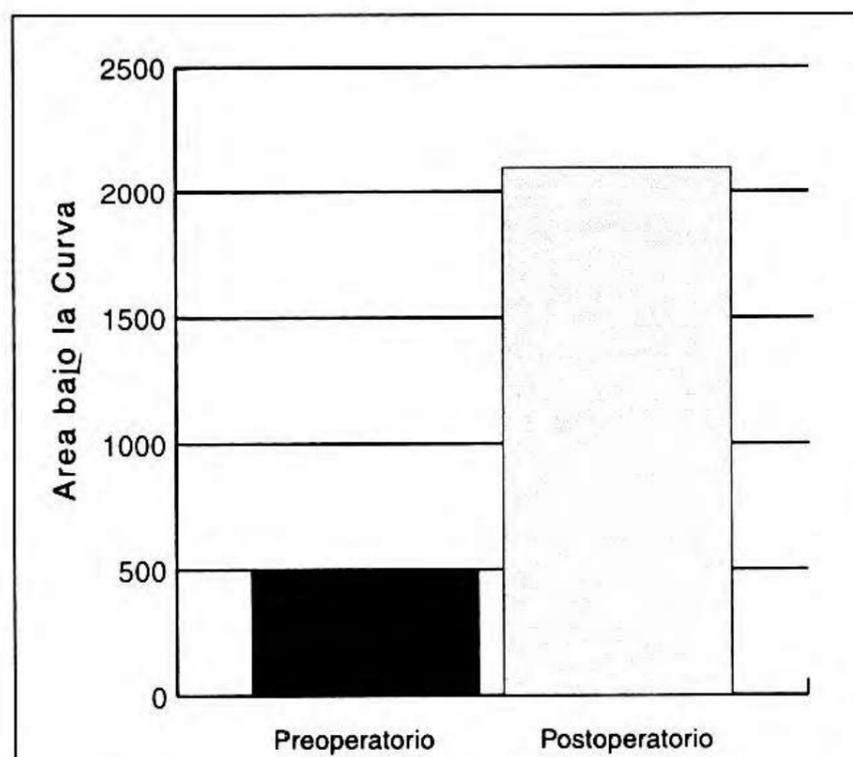


Figura 2

Áreas bajo la curva de la figura 1.



un leve peak de 19, 37 cpm (cuentas por minuto) a los 15 minutos y que la curva postoperatoria muestra un ascenso rápido de la luminiscencia, alcanzando un peak de 448 cpm a los 24 minutos para luego descender, dando lugar a la clásica forma sigmoidea de estas reacciones.

La figura 2 muestra las áreas bajo la curva de la figura anterior, se destaca que la medición preoperatoria arrojó 435 UR (unidades relativas) y la postoperatoria 21072 UR, lo que corresponde a un aumento de 48 veces.

Discusión

La reconstrucción con colgajos libres ha sido ampliamente desarrollada a partir de la década de los 80. Sin embargo el índice de falla vascular, es decir de fracaso de la revascularización del tejido, oscila entre el 5 y el 10%^(9, 10). La tasa de fracaso en cirugía vascular de urgencia al intentar recuperar una extremidad con isquemia aguda o al revascularizar un tejido (colgajo) autotransplantado, puede estar relacionada con el daño post reperfusión del tejido muscular esquelético. Este daño determina un deterioro

progresivo de la microcirculación, exponiendo al tejido transplantado a sufrir un infarto posterior a una isquemia prolongada y a la correspondiente revascularización.

Aunque la etiología precisa del daño post reperfusión aún no está dilucidado, hay evidencias que los radicales libres jugarían un rol protagónico. Estas moléculas, altamente reactivas, son capaces de alterar la microcirculación del tejido por distintos mecanismos en los que destacan: aumento de la permeabilidad capilar, daño estructural a las células endoteliales⁽¹¹⁾, y quimiotaxis de neutrófilos⁽¹²⁾. Los radicales superóxidos son normalmente metabolizados por las enzimas superóxido dismutasa y catalasa intracelulares para producir agua. Es probable que si estas enzimas se administraran exógenamente, podrían contribuir a la disminución del daño orgánico por radicales libres.

Si bien es cierto que existen muchas técnicas convencionales para monitorizar la permeabilidad de las anastomosis y secundariamente la perfusión de un colgajo libre o de un reimplante, como la simple observación del color de la piel, la temperatura, el llene

capilar o el sangramiento característico del tejido^(13,14). No obstante, muchos de estos métodos son subjetivos y no permiten cuantificar la disfunción vascular o daño post reperfusión si éste existe. Una variedad de técnicas diagnósticas, entre las que se incluyen el test de perfusión con fluoresceína⁽¹⁵⁾, la oximetría transcutánea⁽¹⁶⁾, fotopleetismografía, flujo metría-doppler⁽¹⁷⁾, potenciales evocados y resonancia magnética han sido investigados para este propósito. Como se ha señalado que los radicales libres derivados de oxígeno jugarían en parte un rol específico en el compromiso vascular después de anastomosis microvasculares⁽¹⁸⁾. La elevación plasmática de estos radicales post isquemia pudo ser objetivada, en nuestro caso, obteniendo muestras venosas directamente del tejido reperfundido, lo que permite asegurar que los altos niveles de radicales libres provienen exclusivamente del tejido reperfundido. Al lograr monitorizar estos radicales, podrían servir de marcadores indirectos de una falla vascular tardía del tejido transplantado o de la magnitud del daño post isquemia. También puede enfocarse el problema desde la óptica de la protección del tejido u órgano transplantado, al estudiar el posible efecto protector del uso de diversos antioxidantes intraoperatorios. Todo lo anterior hace necesario continuar con una serie prospectiva para determinar la utilidad de nuestro modelo y dimensionar la relevancia de demostrar el aumento de radicales libres exclusivamente en sangre venosa de un tejido humano revascularizado.

Conclusión

Un colgajo libre nos parece ser un modelo clínico muy depurado de estudio in vivo de producción de radicales libres y sus niveles elevados puede representar un evento determinante en la lesión tisular post isquemia aguda.

Se hace indispensable completar una serie clínica para evaluar con mayor confianza estos resultados preliminares.

Referencias

1. **Mc Cord JM.**
Oxygen-derived free radicals in post-ischaemic tissue injury. New Engl J Med 1985; 312: 159-63.
2. **Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE.**
The role of oxygen derived free radicals in ischaemia induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. Cir Res 1985; 57: 599-609.
3. **Sacs T, Moldow CF, Craddock PR, Bowes TK, Jacob HS:**
Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. J Clin Invest 1978; 61: 1161-7.
4. **Carrol WR, Esclamado RM.**
Ischemia-reperfusion injury in microvascular surgery. Head Neck 2000; 22: 700-13
5. **Mc Cord JM, Roy RS.**
The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. Can J Physiol Pharmacol 1982; 60:1346-52.
6. **Hardy SC, Homer-Vanniasinkam S and Gough MJ:**
Effect of free radical scavenging on skeletal muscle blood flow during postischaemic reperfusion. Br J Surg 1992; 79: 289-92.
7. **González AP, Sepúlveda S, Massberg S, Baumeister R, Menger MD.**
In vivo fluorescence microscopy for the assesment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats. Transplantation 1994; 58: 403-8
8. **Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE.**
The role of oxygen derived free radicals in ischaemia induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. Circ Res 1985; 57: 599 – 609
9. **Khouri RK, Shaw WW.**
Reconstruction of the lower extremity with microvascular free flaps: A 10 year experience with 304 consecutive cases. J Trauma 1989; 29: 29-36
10. **Melissinos EG, Parks DH.**
Post trauma reconstruction with free tissue transfer: analysis of 442 consecutive cases. J Trauma 1989; 29: 1095-9
11. **Mc Cord JM, Roy RS.**
The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. Can J Physiol Pharmacol 1982; 60: 1346-52

12. Sacs T, Moldow CF, Craddock PR, Bowes TK, Jacob HS.

Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. J Clin Invest 1978; 61: 1161-7

13. Jones BM.

Monitors for the cutaneous microcirculation. Plast Reconstr Surg 1984; 73: 843-47

14. Khouri RK, Shaw WW.

Monitoring of the free flaps with surface temperature recording: Is it reliable? Plast Reconstr Surg 1992; 89: 495-9

15. Silverman DG, Larossa DD, Barlow CH.

Quantification of tissue fluorescein delivery and prediction of flap viability with the fiberoptic dermo-fluorometer. Plast Reconstr Surg 1980; 66: 545-50

16. Smith Ar, Sonnenfeld GJ, Kort WJ, van der Meulen JC.

Clinical application of transcutaneous oxygen measurements in replantation surgery and free tissue transfer. J Hand Surg 1983; 8: 139-44

17. Swartz WM, Jones NF, Cherup L, Klein A.

Direct monitoring of microvascular anastomoses with 20-MHz ultrasonic Doppler probe. An experimental and clinical study. Plast Reconstr Surg 1988; 81: 149-52

18. Yokoyama K; Nakamura K; Itoman M; Kimura M; Ohyatsu Y; Ui K; Wakita R.

Do superoxide radicals in blood indicate anastomotic patency after microvascular tissue reperfusion?. J Reconstructive Microsurgery 1995; 11: 467-71.