

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“Empleo de polidioxanona, polipropileno o seda como materiales de sutura en anastomosis termino-terminal en arterias musculares, elásticas y venas”**

Por

M.C.P. Rodrigo E Elizondo Omaña

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN  
TERMINAL EN MORFOLOGÍA.**

Diciembre, 2007

# **Empleo de polidioxanona, polipropileno o seda como materiales de sutura en anastomosis termino-terminal en arterias musculares, elásticas y venas.**

Aprobación de la Tesis:

---

Dr. med. Santos Guzmán López  
Director de Tesis

---

Dr. PhD. Julio Sepúlveda Saavedra.  
Co-Director de Tesis

---

Dra. C. Raquel Ballesteros Elizondo  
Comisión de Tesis

---

Dr. med. Oscar de la Garza Castro  
Comisión de Tesis

---

Dr. med. Norberto López Serna  
Comisión de Tesis

---

Dr. Dionisio Galarza Delgado  
Subdirector de Estudios de Posgrado

# **Empleo de polidioxanona, polipropileno o seda como materiales de sutura en anastomosis termino-terminal en arterias musculares, elásticas y venas.**

Presentado por  
Med. Rodrigo E. Elizondo Omaña

Este trabajo se realizó en el Departamento de Anatomía e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Dr. med. Santos Guzmán López y la Co-dirección del Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra.

Firmas

Director de Tesis

Co-Director de Tesis

Dr. med. Santos Guzmán López

M.C.P. y Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra

## DEDICATORIA

### **A mis padres:**

A mis Padres Lulú y José Juan por su apoyo y motivación.

### **A mi esposa:**

A mi esposa Ángeles por ser la razón y la sinrazón de mi pensamiento y mi alma.

## AGRADECIMIENTOS.

A mi padre José Juan Elizondo Elizondo por fomentarme la dedicación y persistencia en el estudio.

A mi madre Maria de Lourdes Omaña Garza por ser siempre un apoyo y heredarme el gusto por la docencia.

A mi esposa María de los Ángeles García Rodríguez por su crítica objetiva y siempre encaminada a lograr un mejor resultado final.

Al Dr. Santos Guzmán López por todo su apoyo, muchas gracias. Por su ejemplo de superación, ayuda y solidaridad con todas las personas.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por todos sus comentarios y tener siempre la disposición de escuchar. Por haber sido mí maestro.

A la Dra. Raquel Ballesteros Elizondo por su valioso tiempo que invirtió en mi capacitación.

Al Dr. Oscar de la Garza Castro por su instrucción y guía en este trabajo.

Al Dr. Norberto López Serna por ser un ejemplo de honestidad.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por su ejemplo como gran investigador, ser humano y amigo.

A Adolfo Soto y Luis Botello por su ayuda.

A mis compañeros y amigos.

Al CONACYT por la beca.

# TABLA DE CONTENIDO.

Abreviaturas .....	2
Lista de Tablas .....	3
Lista de Figuras .....	5
<b>Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	2
Arteria torácica interna .....	3
Vena safena mayor .....	4
Arteria radial .....	5
Arteria gastroepiploica derecha .....	5
Arterias intercostales .....	6
Arteria esplénica .....	6
Arteria epigástrica inferior .....	6
Antecedentes .....	7
<b>JUSTIFICACION</b> .....	11
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	13
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	13
<b>Capítulo 2. MATERIAL y METODOS</b> .....	14
<b>2.1 MATERIAL</b> .....	14
2.1.1 Material biológico .....	14
2.1.2 Grupos Experimentales .....	14
2.1.3 Reactivos.....	14
2.1.4 Equipo utilizado.....	15
<b>2.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	15
<b>2.3 METODOS</b> .....	16
2.3.1 Acto quirúrgico.....	16
2.3.2 Obtención de la muestra.....	19
2.3.3 Procesamiento de la muestra.....	19
2.3.4 Análisis histológico.....	19
2.3.4.1 Microscopía de luz.....	19
2.3.4.2 Morfometría.....	19
2.3.4.3 Análisis estadístico.....	19
2.3.4.4 Inmunohistoquímica .....	20
<b>Capítulo 3. RESULTADOS</b> .....	21
3.1 Análisis morfológico.....	21
3.1.1 Arteria elástica.....	21
3.1.1.1 Arteria elástica y polidioxanona.....	21
3.1.1.2 Arteria elástica y polipropileno.....	22
3.1.1.3 Arteria elástica y seda.....	24
3.1.2 Arteria muscular.....	24
3.1.2.1 Arteria muscular y polidioxanona.....	24
3.1.2.2 Arteria muscular y polipropileno.....	26
3.1.2.3 Arteria muscular y seda.....	27
3.1.3 Vena.....	27
3.1.3.1 Vena y polidioxanona.....	27
3.1.3.2 Vena y polipropileno.....	27
3.1.3.3 Vena y seda.....	28
3.2 Análisis inmunohistoquímico.....	30
3.2.1 Arteria elástica.....	30

3.2.2 Arteria muscular.....	30
3.2.3 Vena .....	30
3.3 Resumen de resultados.....	32
<b>Capítulo 4. DISCUSION.....</b>	<b>34</b>
<b>Capítulo 5. CONCLUSION y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>37</b>
5.1 Conclusiones.....	37
5.2 Perspectivas.....	37
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>APENDICE A.....</b>	<b>48</b>
<b>APENDICE B.....</b>	<b>51</b>

## NOMENCLATURA.

%	Porcentaje
*	Diferencia estadísticamente significativa
~	Aproximadamente
µm	Micrómetros
c/u	Cada uno
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
cols.	Colaboradores
D.E.	Desviación Estándar
DAB	Diaminobencidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's	Dinucleótido trifosfato
DPA	Difenilamina
dUTP	Diuracil Trifosfato
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
ej.	Ejemplo
fig.	Figura
g	Gravedades
grs	Gramos
H y E	Hematoxilina y Eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogeno
hrs	Horas
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilogramos
L	Litros
mg	Miligramos
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
min	Minuto
mL	Mililitro
N	Normalidad
nm	Nanómetros
°C	Centígrados
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de hidrogeno



Seg	Segundos
Strep	Estreptavidina
TBE	Amortiguador Tris- Borato-EDTA
TDT	Deoxinucleotidil Transferasa Terminal
TE	Tris-EDTA
µg	Microgramos
µL	Microlitro
ATI	Arteria torácica interna
VS	Vena safena
AR	Arteria radial
AGED	Arteria gastroepiploica derecha
AIs	Arterias intercostales
AE	Arteria esplénica
AEI	Arteria epigástrica inferior
PDS	Polidioxanona

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1	Estrategia experimental general .....	15
Figura 2	Anastomosis termino-terminal .....	18
Figura 3	Arteria elástica .....	22
Figura 4	Arteria muscular .....	24
Figura 5	Vena .....	28
Figura 6	TUNEL. Túnicas de la pared vascular .....	31
Figura 7	TUNEL. Endotelio .....	32

## LISTA DE TABLAS.

Tabla 1	Estudios en diferentes materiales de sutura .....	9
Tabla 2	Estudios con diferentes materiales de sutura en vasos sanguíneos	35

## LISTA DE GRAFICOS.

Gráfico 1	Micrometrías de arteria elástica con los diferentes materiales de sutura .....	23
Gráfico 2	Micrometrías de arteria muscular con los diferentes materiales de sutura .....	26
Gráfico 3	Micrometrías de vena con diferentes materiales de sutura .....	29

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.**

Rodrigo Enrique Elizondo Omaña.  
Monterrey, N.L., 23 de mayo de 1980.

Curse mis estudios de primaria, secundaria y preparatoria en escuelas públicas donde siempre mostré interés y dedicación al estudio. Posteriormente ingrese a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León donde obtuve el 3er Lugar de Generación y Mención Honorífica en el examen profesional.

Durante la carrera universitaria me desempeñe como becario del Departamento de Anatomía Humana, donde me involucre en proyectos de investigación llegando a publicar algunos en revistas de divulgación. Participe en el programa de intercambio académico en hospitales de Valladolid y Guadalajara en España y Messina en Italia. Posteriormente me desempeñe como Coordinador General de Becarios donde una mis principales aportaciones fue la creación el Grupo de Investigación en Anatomía (GIA) que tiene como fin promover, fomentar y desarrollar la investigación en anatomía y sus ciencias afines. Además, se logró la publicación de artículos científicos en revistas indexadas y reconocidas por el JCR. Al terminar la carrera decidí ingresar al programa de Doctorado en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología. En este tiempo realicé una estancia de investigación en el Departamento de Anatomía Humana de la Universidad de Graz en Austria con el Prof. Andreas Weiglein. Ingresé al Sistema Nacional de Investigadores como candidato y he publicado artículos relacionados con esta tesis. He participado en congresos nacionales e internacionales de anatomía y educación médica.

Otro de mis intereses principales es la docencia en la que he tomando cursos de capacitación en pedagogía impartidos dentro y fuera de la universidad. El primer contacto con un grupo ocurrió mientras fui becario del Departamento y desde entonces he tenido la oportunidad de hacerlo.

## **PUBLICACIONES.**

### **I. Libros.**

1. Participación en la elaboración de “Manual de Disecciones”. Guzmán López S, Tijerina de la Garza O, Hernández León I. Editorial: McGraw-Hill. 2002.
2. “Manual de disecciones anatómico-clínicas” No. Registro: 03-2004-092014201800-01 Guzmán López Santos, Elizondo-Omaña RE, y cols. Imprenta Universitaria. Agosto 2004.
3. Guzmán López S, Tijerina de la Garza, Hernández León I, Elizondo Omaña RE. Manual de disecciones. 2da edición. McGraw-Hill. 2006.

### **II. Revistas Científicas.**

1. Elizondo-Omaña RE, Herrera Correa JA, Leal Lira EM, Guzmán López S, y cols. Comparación anatómica de la arteria torácica interna con la arteria radial. Medicina Universitaria. 5 (19); 89 - 92, 2003.
2. Elizondo-Omaña RE, Morales-Gómez JA, Guzmán López S, et al. 2004. Traditional teaching supported by computer assisted learning for macroscopic anatomy. Anatomical Record (B); 278(2); 18-22, 2004.
3. Elizondo-Omaña RE, Guzmán López S, García Rodríguez MA. 2005. Dissection as a teaching tool: past, present and future. Anat Rec. 285B:11-15.
4. Elizondo-Omaña RE, García Rodríguez MA, Guzmán López S y cols. 2005. Conductos vasculares utilizados en la operación de revascularización miocárdica. Medicina Universitaria. 7(29):222-5.
5. Elizondo-Omaña RE, García Rodríguez MA, Guzmán López S y cols. 2006. El arte de la disección a través del tiempo. Medicina Universitaria. 8(33):217-21.
6. Elizondo-Omaña RE, Guzmán López S, García Rodríguez MA. 2006. The influence of histology and embryology courses on student achievement in gross human anatomy courses. Medical teacher. 28;1.
7. Maldonado-Zimbron VE, Elizondo-Omaña RE, Guzman López S, et al. 2006 An interactive tool for the human anatomy laboratory. Int. J. Morphol. 24(3):377-382.
8. Elizondo-Omaña RE, García Rodríguez MA, Guzmán López S, et al. 2006. Study Pace as a Factor that influences achievement in a human anatomy course. Anat Rec. 289B:134-138.
9. Elizondo-Omaña RE, García Rodríguez MA, Guzmán López S, y cols. 2006. El arte de la disección a través del tiempo. Medicina Universitaria 2006;8(33): 254-258.

10. Elizondo-Omaña RE, García Rodríguez MA, Guzmán López S, y cols. 2007. Estudio Anatómico de los arcos arteriales palmares: diámetro y presentación. *Int. J. Morphol.* 25(1):55-60.

**Publicaciones relacionadas a la tesis.**

11. Elizondo-Omaña RE, Herrera Correa JA, Leal Lira EM, Guzmán López S, y cols. Comparación anatómica de la arteria torácica interna con la arteria radial. *Medicina Universitaria.* 5 (19); 89 - 92, 2003.
12. Elizondo-Omaña RE, García Rodríguez MA, Guzmán López S y cols. 2005. Conductos vasculares utilizados en la operación de revascularización miocárdica. *Medicina Universitaria.* 7(29):222-5.
13. Elizondo-Omaña RE, García Rodríguez MA, Guzmán López S, y cols. 2007. Estudio Anatómico de los arcos arteriales palmares: diámetro y presentación. *Int. J. Morphol.* 25(1):55-60.

## RESUMEN.

**Rodrigo Enrique Elizondo Omaña**

**Fecha de graduación: Diciembre de 2007**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del Estudio:**

**Empleo de polidioxanona, polipropileno o seda como materiales de sutura en anastomosis termino-terminal de arteria elástica, muscular o vena.**

**Número de páginas:**

**55**

**Área de estudio: Morfología.**

**Candidato a grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología.**

**Propósito y método del estudio.** Hasta hoy se han evaluado los efectos del material de sutura solo en arteria muscular y entre las suturas más estudiadas se encuentran: nylon, poliglactina, polipropileno y polidioxanona. No se ha estudiado la respuesta a la sutura en el resto de los conductos (es decir, arteria elástica y vena). En este trabajo se caracterizaron los efectos de las suturas en diferentes tipos de vasos sanguíneos. Se realizaron microanastomosis vasculares termino-terminal en aortas (elástica), arterias femorales (muscular) y venas cavas de ratas Wistar con polidioxanona, polipropileno y seda como materiales de sutura. Se encontró que la arteria elástica presenta un engrosamiento transitorio de la túnica media cuando se emplea cualquiera de los materiales de sutura. En la arteria muscular se observó un engrosamiento transitorio de la túnica media solo cuando se utilizó seda como material de sutura. En la vena no se encontraron cambios con ninguno de los materiales de sutura.

**Contribuciones y conclusiones.** Los resultados del presente estudio nos permiten descartar a estos materiales de sutura como un factor que pudiera estar involucrado en complicaciones tales como trombosis, restenosis o formación de placas ateromatosas. Inferimos que el material de sutura no está involucrado en las complicaciones (trombosis, restenosis y placas ateromatosas) de la cirugía de revascularización, por lo que se deben estudiar otros factores como los cambios de presión y el microambiente que pudieran explicar las variaciones en la evolución clínica.

**FIRMA DEL DIRECTOR:**

---

**Dr. med. Santos Guzmán López**



## **Capítulo 1.**

### **Introducción.**

Durante la década de los años 30 existió un gran interés por parte de los cirujanos para proveer un flujo arterial adecuado al corazón isquémico. La cirugía de revascularización al tejido miocárdico fue desarrollada por Gordon Murray en 1937, pero fue Vineberg en 1946, el primero en describir tres técnicas experimentales para realizar esta cirugía utilizando la arteria torácica interna. El objetivo de la cirugía de revascularización miocárdica es proveer un conducto que al ser colocado en las arterias coronarias tenga una larga permeabilidad y adecuada perfusión al tejido miocárdico, con la consecuente mejoría clínica del paciente (Canaver, 1995).

Existen una multitud de factores que intervienen en la elección de un hemoducto para la cirugía de revascularización. Estos factores podrían dividirse en 3 grupos: relacionados al paciente, a las características de los hemoductos y a la complejidad del acto quirúrgico. Entre los factores relacionados al paciente, el más importante es la sobrevida, la edad, las condiciones clínicas y la disponibilidad de los hemoductos. Las características de los hemoductos que influyen en la elección son su disponibilidad, la localización anatómica, la predisposición a cambios histopatológicos (trombosis, hiperplasia de la íntima, ateromas). La complejidad del acto quirúrgico en sí mismo y la experiencia del cirujano en la utilización de determinado hemoducto son factores que también pueden influir.

Las diferencias morfológicas existentes entre los conductos podrían explicar la superioridad de alguno de ellos (Del Campo C, 2003). Los hemoconductos que se han empleado en la cirugía de revascularización en la actualidad son (en orden por su frecuencia de

utilización): arteria torácica interna (ATI), vena safena mayor (VS), arteria radial (AR), arteria gastroepiploica derecha (AGED). También se han utilizado las arterias intercostales (AI), esplénica (AE), epigástrica inferior (AEI), cubital (AC) y la vena safena menor (VSm).

### **Arteria Torácica Interna (ATI).**

La ATI se origina de la primera porción de la arteria subclavia y tiene una trayectoria descendente, profundamente a la pared anterior del tórax hasta llegar al sexto espacio intercostal donde se divide en sus ramas terminales: musculofrénica y epigástrica superior (Moore, 2003). La ATI tiene una trayectoria paraesternal y es acompañada por un par de venas y el nervio frénico, se encuentra superficialmente al músculo transverso del tórax que la separa de la pleura. Esta arteria puede emitir algunos ramos a estructuras mediastínicas (para el timo) y la rama pericardicofrénica que acompaña al nervio frénico. La ATI es principalmente elástica y tiene un área de sección transversal (intraluminal) promedio de  $1.9 \text{ mm}^2$  en su parte proximal (Van Son JAM *et al.*, 1993).

Su uso en la cirugía de revascularización fue introducido por Effler (1965), quien demostró que el flujo de sangre hacia el miocardio mejoraba al utilizar implantes de ATI. En Febrero de 1968 se realizó por primera vez en Estados Unidos una anastomosis ITA-LAD (descendente anterior izquierda).

El estudio clásico del grupo CASS (Coronary Artery Surgery Study) se desarrolló para evaluar el beneficio clínico del uso de la ATI en la cirugía de revascularización. El seguimiento de los pacientes en este estudio multicéntrico tuvo una media de 16.8 años. Se

concluye que el uso de la ATI es un predictor favorable en el pronóstico y sobrevida del paciente.

La arteria torácica interna es hasta hoy el mejor injerto para revascularización miocárdica, debido a su alta resistencia a la aterosclerosis (Del Campo C, 2003).

### **Vena Safena Mayor (VS).**

La vena safena mayor, de mediano calibre, se origina por delante del maleolo interno de la tibia como una continuación del plexo venoso dorsal. Sigue la cara interna de la tibia hasta la rodilla donde cruza por detrás del cóndilo medial del fémur e ingresa al muslo donde termina atravesando la fascia cribiforme para drenar en la vena femoral. La vena safena menor recibe tributarias de la pierna y del muslo, comunica libremente con la vena safena menor.

En junio de 1968, Rene Favaloro utilizó por primera vez la vena safena en combinación con la ATI para una anastomosis con la arteria descendente anterior. Al año siguiente la vena safena ya era utilizada como injerto coronario en numerosos centros.

La vena safena constituye mas del 70% de los conductos empleados como injertos coronarios debido a su disponibilidad y facilidad técnica para su extracción (Golbasi I, 2005).

### **Arteria Radial (AR).**

La AR es una rama de la arteria braquial que tiene un trayecto distal hacia la mano, en su extremo proximal es cubierta por el músculo braquiorradial (supinador largo) y en su extremo distal es superficial hasta llegar a la muñeca donde cambia de dirección hacia la cara posterior de la muñeca (Moore, 2003). Es una arteria muscular, con una anchura de las tónicas íntima y media de 529  $\mu\text{m}$  ( $\sigma=52$ ) (Van Son JAM, et al. 1990). En 1973, Alain Carpentier introdujo el uso de la arteria radial.

### **Arteria gastroepiploica derecha (AGED).**

La AGED es una rama de la arteria gastroduodenal que se localiza en la curvatura mayor del estómago entre las hojas del omento mayor y termina anastomosándose con la arteria gastroepiploica izquierda, rama de la arteria esplénica (Moore, 2003). La AGED emite ramos para el píloro, el antro y cuerpo del estómago, así como para el omento mayor.

La AGED es principalmente muscular y el grosor de las tónicas íntima y media es de 291 ( $\sigma=109$ )  $\mu\text{m}$  en el segmento proximal (Tavilla G, et al., 1992).

John Pym fue el primero en describir el uso de la arteria gastroepiploica derecha en la cirugía de revascularización al anastomosarla con la porción distal de la arteria coronaria derecha.

### **Arterias intercostales (AIs).**

Las AIs se originan de la aorta torácica y siguen un curso paralelo a los espacios intercostales. Se han encontrado combinaciones de los tres patrones histológicos: elastomuscular, muscular, elástico.

### **Arteria esplénica (AE).**

La AE es la rama de mayor calibre del tronco celiaco, se dirige hacia la izquierda en el borde superior del páncreas hasta aproximarse al bazo donde se divide en sus ramos terminales. No existen reportes histológicos de su estructura. En 1973, Sterling Edwards utilizó la arteria esplénica para realizar un triple bypass.

### **Arteria epigástrica inferior (AEI).**

La AEI se origina como una rama de la arteria iliaca externa, tiene un trayecto ascendente, se introduce en la vaina del recto abdominal y termina anastomosándose con la arteria epigástrica superior, rama de la ATI (Moore, 2003). Es una arteria muscular con escasas fibras elásticas, la anchura de las tunicas intima y media es de 249  $\mu\text{m}$  ( $\sigma=87$ ) (Van Son JAM, et al., 1990).

La elección de un conducto es la decisión más importante que influye en la sobrevida de un paciente. Debido a la falta de estudios clínicos prospectivos que comparen la utilización de cada uno de los diferentes hemoductos con la sobrevida de los pacientes, es necesario recurrir a los estudios morfológicos que podrían predecir el desarrollo de cambios histopatológicos que condicionan la permeabilidad y latencia de los hemoductos.

## **Antecedentes.**

El sistema vascular forma una serie de conductos cerrados que llevan la sangre bombeada por el corazón hacia los tejidos y de regreso (Tortora GJ, 2000). Los componentes del sistema vascular son: arterias, capilares y venas. Estos vasos sanguíneos comparten algunas características, pero poseen otras que los hacen diferentes y que permiten clasificar los vasos sanguíneos en grupos identificables. Las características compartidas son la presencia de tres túnicas: íntima, media y adventicia. La túnica íntima está compuesta por un endotelio (epitelio escamoso simple) y tejido conectivo subendotelial. La túnica media, puede variar en sus componentes y grosor, dependiendo del tipo de vaso sanguíneo. La túnica adventicia es la capa más externa y se confunde con el tejido conectivo circundante. Las características de la túnica media permiten clasificar los vasos sanguíneos en base a sus componentes, de tal forma que existen arterias elásticas, musculares, arteriolas, capilares y venas de diferente calibre (Gartner LP, 2002).

Los vasos sanguíneos sufren cambios como parte del proceso de envejecimiento (Cook JJ, 1989) y también debido a ciertas patologías. Los cambios estructurales debidos al envejecimiento se observan predominantemente en la túnica media: 1) desorientación, fragmentación y degeneración de las fibras elásticas, 2) depósito de colágena y proteoglicanos en las paredes y 3) calcificación. Como resultado de esto las arterias se endurecen, cambio que se observa de forma principal en las arterias elásticas (Oskvig RM, 1999).

La aterosclerosis es la patología que mas frecuentemente causa la enfermedad arterial oclusiva. Los síntomas clínicos aparecen por estenosis progresiva, calcificación,

hemorragia en el interior de la placa, embolización distal y trombosis luminal (Tierney LM, 2005). La aterosclerosis se caracteriza por infiltraciones de material lípido blando, no celular en las paredes de la intima (Gartner LP, 2002).

El tratamiento quirúrgico de la enfermedad arterial oclusiva crónica debe encaminarse, por un lado hacia la corrección de factores de riesgo, y por otro se debe valorar al paciente de acuerdo al sitio de la lesión, su magnitud y condiciones del lecho distal para considerar el tratamiento quirúrgico. El procedimiento quirúrgico habitual implica la anastomosis de un segmento arterial proximal a la oclusión con uno distal a la misma, sea a través de injertos sintéticos o autólogos (Aguirre Rivero R, 2003). El objetivo de la cirugía de revascularización es proveer un conducto que al ser colocado en otra parte del sistema vascular pueda ser una vía adecuada para la irrigación de los tejidos isquémicos. Un avance en la cirugía vascular es la llamada cirugía endovascular (cateterismo) que puede utilizarse para la colocación de Stents, endoprotesis, etc.

En la realización de cirugías de revascularización se utilizan diversos materiales de sutura para realizar las anastomosis. La sutura ideal debe ser fuerte, de fácil manejo, identificable y debe producir una reacción tisular mínima. Existen estudios que comparan los efectos de la utilización de diferentes tipos de sutura en tejido muscular, cavidad abdominal, útero, vasos sanguíneos. Las suturas estudiadas en el sistema vascular son nylon, poliglactina, polipropileno (prolene), polidioxanona (PDS) y menos frecuentemente la seda. El polipropileno es la sutura no absorbible sintética mas utilizada en el sistema vascular. La polidioxanona (PDS) un material absorbible que se ha utilizado en otros tejidos como ligamentos, tendones, utero e intestino (tabla 1) (O'Brion ES, 1993). La seda es un material

no absorbible natural que se utiliza muy poco en cirugía vascular. Se han estudiado diferentes aspectos del empleo de materiales de sutura como la tensión, el manejo y cambios morfológicos. Hasta hoy se han descrito los cambios morfológicos observados secundarios al empleo de materiales de sutura solamente en arterias musculares y se caracterizaron por un infiltrado de células inflamatorias en los días 1 y 3, así como la túnica íntima completamente reendotelizada a los 7 días y no se reportó hiperplasia de la íntima (Chen LE, 1993). Sin embargo, falta evaluar la presencia de proliferación y muerte celular.

Autor	Modelo	Tejido	Material de sutura	Resultados
Wada A, y cols.	Perros	Tendón	Polidioxanona y poliéster	Proliferación celular (ambos). Se restablece la continuidad del tendón (ambos).
O'Broin ES, y cols.	Conejos	Tendón	Polidioxanona y polipropileno	Mínima reacción de cuerpo extraño. No se encontró diferencia significativa en la fuerza tensil.
Quesada G, y cols.	Ratas	Útero	Polidioxanona y polipropileno	Al usar polidioxanona se encontró una proliferación anormal del endotelio en 10%. El polipropileno desencadenó una reacción de cuerpo extraño.
Andersen E, y cols.	Ratas	Intestino	Polidioxanona y poliglactina	No hay diferencia en complicaciones y reacción tisular entre ambos materiales.

Tabla 1. Estudios en de diferentes materiales de sutura en algunos tejidos.

En la actualidad el uso de los conductos vasculares con fines diagnósticos o terapéuticos es muy frecuente (Sanmartin M, 2004). Para cualquiera que sea el fin del empleo de los conductos vasculares, estos pueden sufrir cambios en su morfología por factores internos y externos. Los factores internos que pueden producir cambios son la tensión en la pared, así como los niveles de saturación de oxígeno. Entre los factores externos se encuentran el material de sutura, la repetición de los procedimientos en un mismo vaso y la colocación de Stents. Además hay que considerar los diferentes tipos de vasos sanguíneos (arteria elástica, muscular, vena) y las características morfológicas que los distinguen. Por lo anterior



creemos que los cambios que puedan experimentar secundarios a los factores externos estén determinados por su estructura. Por lo que es necesario evaluar los efectos de cada factor de forma independiente sobre los diferentes tipos de vasos sanguíneos, para de esta manera establecer los cambios que son producidos por ellos. Esto permitirá proporcionar una base morfológica para su elección en la realización de procedimientos clínico-quirúrgicos.

## **Justificación.**

El presente trabajo forma parte de una línea de investigación general en la que se busca establecer criterios morfológicos para la elección de algún tipo de vasos sanguíneos (arteria muscular, elástica o vena) para la realización de procedimientos clínicos y quirúrgicos. En los procedimientos clínicos más comunes como la cateterización es necesario conocer los cambios morfológicos de un tipo determinado de vaso sanguíneo, así como las consecuencias estructurales de su uso repetitivo. El empleo de suturas en las cirugías de revascularización es un elemento que puede interferir en la viabilidad y sobrevida del injerto, por lo que su adecuada selección es importante. La colocación de Stents en los vasos sanguíneos y procedimientos quirúrgicos mas complejos como la cirugía de revascularización miocárdica requieren el conocimiento no solo de las reacciones ante estas condiciones, si no también los cambios debidos a los cambios en el ambiente, como la tensión y saturación de oxígeno. Por lo que para poder establecer un criterio en la realización de estos procedimientos es necesario establecer los cambios que son secundarios a cada uno de ellos. El primer punto que se desea estudiar es el efecto del material de sutura sobre la pared de los diferentes tipos de vasos sanguíneos.

Hasta hoy se han evaluado los efectos del material de sutura solo en arteria muscular y entre las suturas más estudiadas se encuentran: nylon, poliglactina, polipropileno y polidioxanona. No se ha estudiado la respuesta a la sutura en el resto de los conductos (es decir, arteria elástica y vena).

Puesto que existen variaciones importantes en la evolución clínica cuando se emplea un determinado tipo de vaso sanguíneo, nosotros suponemos que el material de sutura podría

influir en la evolución clínica por lo que es importante establecer los cambios morfológicos observados al emplear PDS, polipropileno o seda en anastomosis de arterias musculares, elásticas y venas ya que podrían relacionarse con la mejor o peor respuesta al tratamiento de revascularización.

**Objetivo General.**

Proporcionar una base morfológica para la elección del material de sutura en los diferentes tipos de vasos sanguíneos.

**Objetivos Específicos.**

1. Valorar la continuidad del endotelio secundario al empleo de PDS, polipropileno o seda como materiales de sutura en arterias musculares, elásticas y vena de mediano calibre.
2. Evaluar la presencia de alteraciones morfológicas en la pared vascular secundaria al empleo de PDS, polipropileno o seda como materiales de sutura en arterias musculares, elásticas y vena de mediano calibre.
3. Evaluar la presencia de apoptosis en la pared vascular secundaria al empleo de PDS, polipropileno o seda como materiales de sutura en arterias musculares, elásticas y vena de mediano calibre.

## **Capítulo 2.**

### **Material y métodos.**

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de microcirugía del Departamento de Anatomía Humana y en los laboratorios del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **2.1. Material.**

##### **2.1.1. Material Biológico.**

Para la realización de este proyecto se empleó un modelo animal: ratas Wistar de ambos sexos, con un peso entre 250 y 300 gramos (jóvenes). Las ratas fueron mantenidas con dieta estándar de laboratorio, las cuales 8 hrs previas a la realización del acto quirúrgico se mantuvieron en ayuno.

##### **2.1.2 Grupos Experimentales.**

Las ratas Wistar se dividieron al azar en tres grupos experimentales en los que se utilizó cada sutura (PDS, polipropileno, seda). Cada grupo se dividió en 3 subgrupos de acuerdo al tipo de vaso sanguíneo utilizado para la realización de la anastomosis termino-terminal. De cada subgrupo se obtuvo una muestra de 1 cm (considerando la sutura como punto medio) al tiempo 0, días 3, 7, 10, 14, 30 para su posterior procesamiento.

##### **2.1.3 Reactivos.**

Los reactivos utilizados en el estudio son de alta calidad analítica. Paraformaldehído, ácido bórico, glicerol y alcohol de Sigma Chemical Company (USA). Acido clorhídrico, acido acético glacial, eosina amarillenta, hematoxilina anhidra, acido fosfomolíbdico y fosfotúgnstico, metanol de Analytica Tecnología Industrial Química (México). Escarlata de

Biebrich de HYCEL de México, Fascina ácida de MCB Manufacturing Chemical, ácido pícrico de B&A Speciality Chemical Divisions.

#### 2.1.4 Equipo Utilizado.

- Microscopio Quirúrgico Carl Zeiss OpMi 6S
- Instrumental microquirúrgico (Dewimed).
- Foto Microscopio Nikon Eclipse 50i (software Nis Elements)
- Microscopio estereoscópico American Optimal
- Ultramicrotomo RMC modelo MTX
- Balanza analítica Mettler
- Centro de inclusión Tissue Tek

#### 2.2 Estrategia Experimental.

La estrategia experimental empleada se muestra en la figura 1.

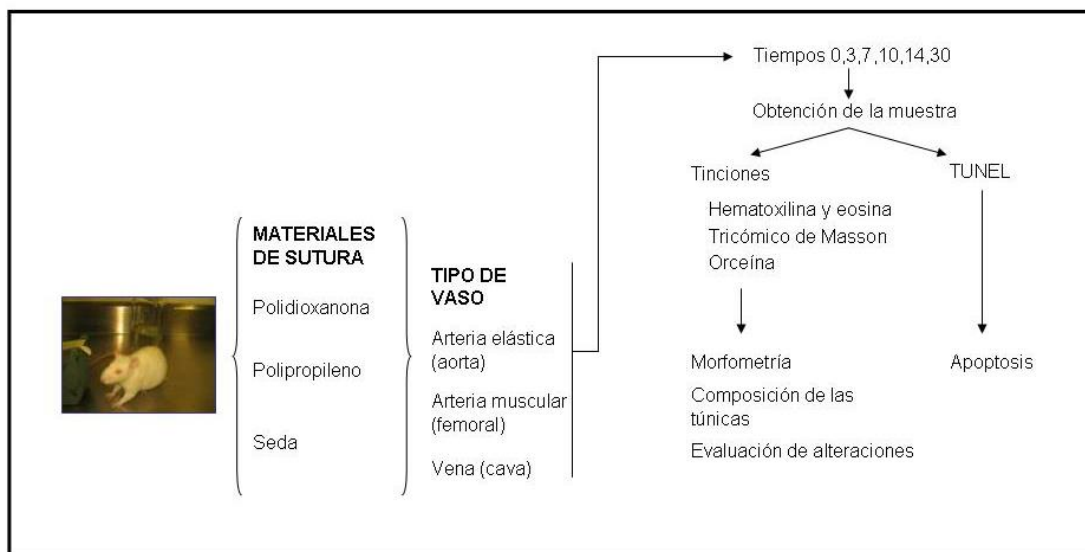


Figura 1. Estrategia experimental general. Se forman 3 grupos experimentales de acuerdo al tipo de material de sutura empleado. Estos grupos se subdividen en tres subgrupos en base al tipo de vaso sanguíneo en el que se realiza la cirugía. Se obtienen las muestras en diferentes tiempos

considerados a partir del momento de la cirugía, para su posterior procesamiento y análisis histológico.

## **2.3 Métodos.**

### **2.3.1 Acto Quirúrgico.**

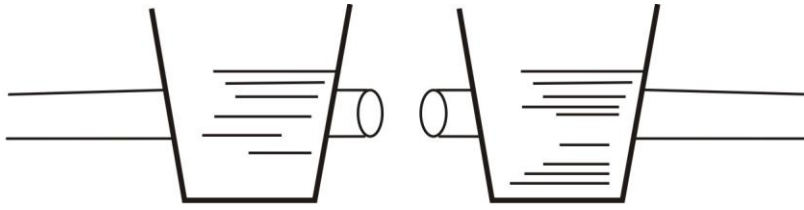
Cada animal se anestesió con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (40mg/kg). Previa asepsia y rasurado de la región abdominal o inguinal, se procedió a realizar disección de la aorta abdominal, arteria o vena cava bajo microscopio quirúrgico (zeiss OpMi 6S).

Para disecar la aorta se realizó un corte longitudinal medio en la cara anterior del abdomen. Se lateralizaron las vísceras hacia la izquierda y se mantuvieron húmedas al irrigar con suero fisiológico a 37 grados centígrados. Se colocaron los microclamps en los segmentos proximal y distal del área disecada y se procede a la sección transversal de la arteria (figura 2). Se procedió a la sección transversal de la aorta y se realizó la anastomosis termino-terminal (Chen YX y cols 2001.) con un material de sutura (el cual depende del grupo). Se comprobó la permeabilidad al vaciar el vaso en sentido proximal y liberar para observar el flujo y latido en la porción distal a la anastomosis. Después de la anastomosis la herida en piel se suturó con seda 6-0.

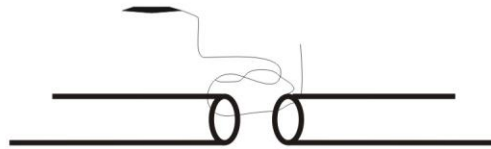
Para disecar la arteria femoral se realizó un corte longitudinal que sigue la dirección del eje mayor del miembro inferior. Las arterias femorales se disecaron una longitud aproximada de 2 cm. Se colocaron los microclamps en los segmentos proximal y distal del área disecada y se procedió a la sección transversal de la arteria a la mitad de la distancia entre la rama muscular profunda y el origen de la arteria epigástrica superficial. Una vez que se realizó la sección se irriga con solución salina heparinizada y si fue necesario se dilató un poco con las pinzas. Se realizó la anastomosis termino-terminal (Chen YX y cols. 2001)

entre los extremos seccionados, utilizando diferentes materiales como PDS (10-0), polipropileno (10-0) o seda (10-0) (dependiendo el grupo). Una vez hecho esto se evaluó la permeabilidad de la anastomosis vaciando el vaso en sentido proximal y liberando para observar llenado capilar en la extremidad inferior. Después de la anastomosis la herida en piel será suturada por seda 6-0.

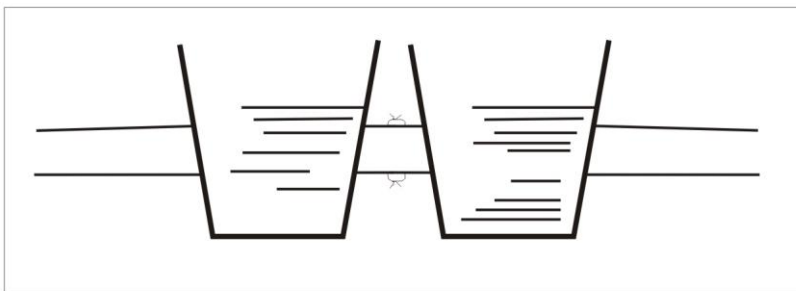




(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2. Se muestra la forma en que se realiza la anastomosis termino-terminal en los conductos vasculares.

### **2.3.2 Obtención de la muestra.**

Las ratas Wistar fueron sacrificadas por dislocación cervical a los tiempos 0,3,7,10,14,30 días posterior a realizar la cirugía donde se practicó una anastomosis termino-terminal de los diferentes vasos sanguíneos (aorta, femoral, cava). También se obtuvieron muestras de controles sanos (sin cirugía). Solo se incluyeron las muestras de las anastomosis que fueron técnicamente satisfactorias.

### **2.3.3 Procesamiento de la muestra.**

Después del sacrificio, se irrigó con formalina y se secciona el vaso sanguíneo considerando como centro el punto anastomótico. Estas muestras se procesaron por la técnica de inclusión en parafina para realizar tinciones con Hematoxilina y Eosina (H y E), Tricrómico de Masson, Orceína y TUNEL.

### **2.3.4 Análisis Histológico.**

#### **2.3.4.1 Evaluación mediante Microscopía de Luz.**

Se realizaron cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con H y E, Tricrómico de Masson y Orceína. Estas técnicas se describen en el Apéndice A.

#### **2.3.4.2 Morfometrías.**

En los cortes teñidos con tricrómico de Masson se realizaron las mediciones de las túnica media de los conductos vasculares. Esta técnica permitió identificar las tres túnicas de forma clara, considerando las láminas elásticas interna y externa en las arterias, mientras en la vena se consideró el grosor total de la pared vascular.

#### **2.3.4.3 Análisis estadístico.**

Las mediciones realizadas en las tunicas se comparan entre grupos e intragrupos con la prueba de ANOVA.

#### **2.3.5 Inmunohistoquímica para el análisis de la fragmentación de la cromatina utilizando TUNEL.**

La valoración de apoptosis por el método de marcaje in situ del DNA fragmentado o técnica TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling) tiene su fundamento en la detección de la rotura del DNA internucleosomal (típica de la apoptosis) en secciones de tejido embebidas en parafina. Presenta como ventaja la detección en estadios más tempranos que la hematoxilina y eosina.

Se pone de manifiesto los extremos 3'-OH libres que se generan en la fragmentación de DNA, incorporando nucleótidos marcados (dUTPs) a dichos extremos mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). Estos nucleótidos serán reconocidos por un anticuerpo antidigoxigenina unido a peroxidasa, la positividad se identifica con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diaminobencidina observando una coloración marrón oscuro en los núcleos positivos o bien verde claro (tinción de contraste) en los núcleos negativos para ésta técnica. (Se describe ampliamente en el apéndice A).

Para realizar la técnica de TUNEL se empleo el kit de Trevigen para muestras fijadas con formaldehído al 4%, embebidas en parafina y cortes de 6 µm.

## **Capítulo 3.**

### **Resultados.**

#### **3.1 Análisis histológico.**

Se realizaron un total de 216 (N=216) procedimientos microquirúrgicos en los que se práctico una anastomosis termino-terminal de los siguientes conductos: aorta (n=72), arteria femoral (n=72) y vena cava (n=72); en cada conducto se probaron de forma independiente los 3 materiales de sutura: polipropileno (n=24), polidioxanona (n=24) y seda (n=24). Además, los efectos del material de sutura fueron evaluados en los tiempos 0, días 3, 7, 10, 14, 30 (para cada tiempo, n=4). Las muestras fueron procesadas por la técnica histológica para su evaluación morfológica utilizando las siguientes tinciones: hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson y orceína, y otras fueron procesadas con la técnica TUNEL. Se realizaron micrometrías de la túnica media de los vasos sanguíneos.

Primero se muestran los resultados del estudio morfológico con las diferentes técnicas de tinción utilizadas y las micrometrías. Luego se reportan los resultados del análisis por la técnica TUNEL.

##### **3.1.1 Arteria elástica (aorta).**

Se realizaron un total de 72 procedimientos quirúrgicos en este conducto en el que se probaron los tres materiales de sutura y se evaluaron a los tiempos antes señalados (n=4, por tiempo y condición).

##### **3.1.1.1 Arteria elástica (aorta) y polidioxanona.**

Al realizar las anastomosis termino-terminal de arteria elástica (aorta) con polidioxanona como material de sutura se encontró (figura 3) que en todos los tiempos de evaluación existió continuidad del endotelio, así como un discreto engrosamiento transitorio de la túnica media en los días 3,7 y10 (grafico 1) con una recuperación en el día 14 y 30. No se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.

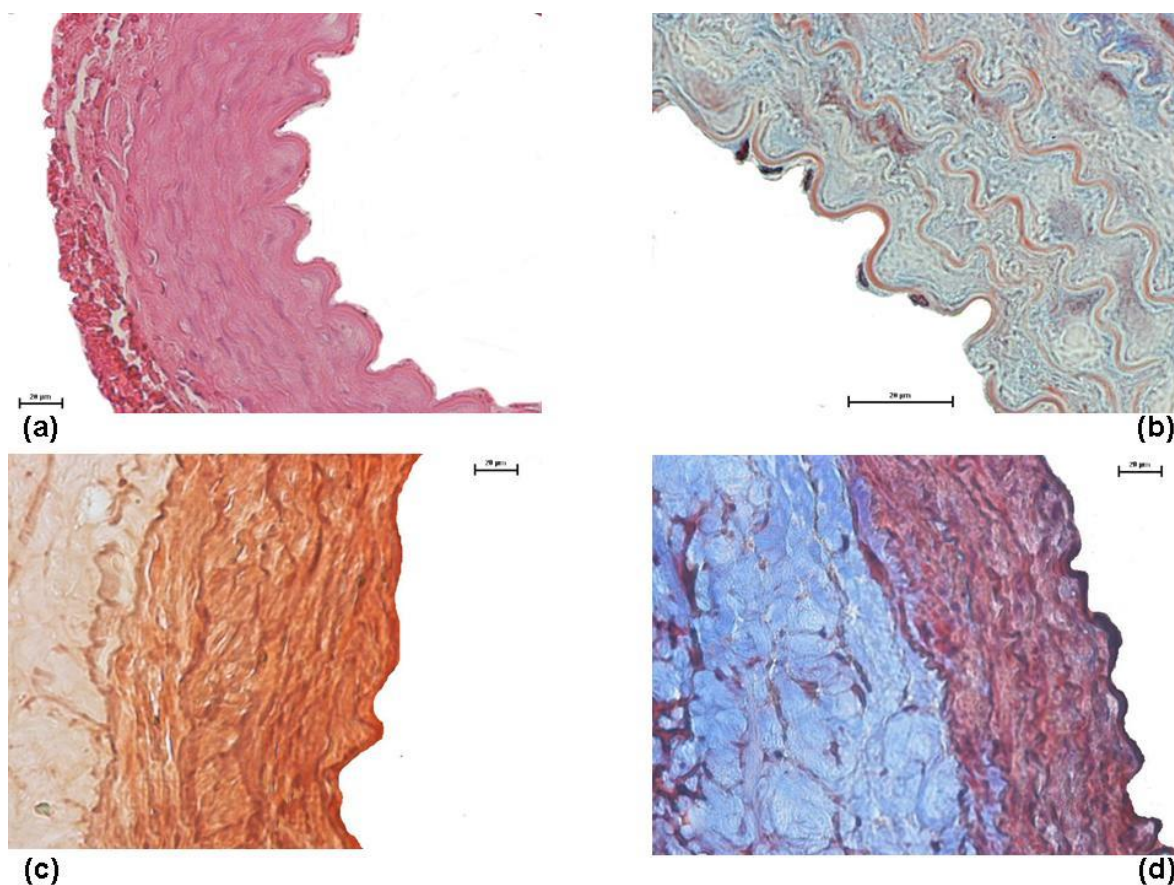
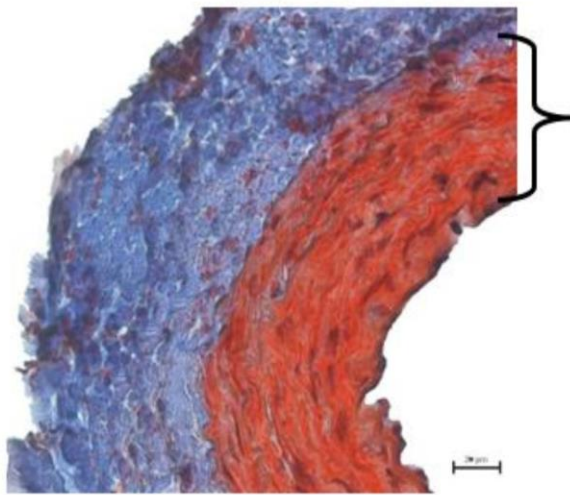


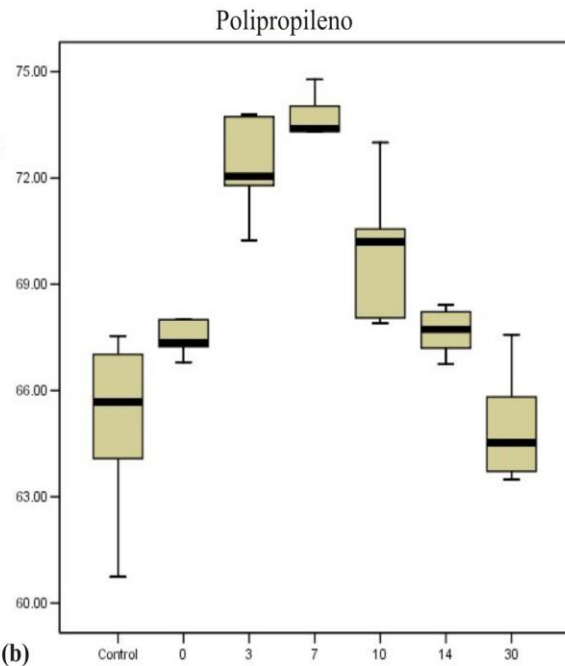
Figura 3. Arteria Elástica. Cortes transversales de aorta de rata. (a) Fotomicrografía de una muestra control, teñida con HyE en la que se observan las tres tunicas con su morfología normal. (b) Corte representativo de todo el grupo, que fue teñida con tricrómico de Masson en el que se aprecia la conservación de la continuidad del endotelio en todas las muestras. (c) Muestra en la que se utilizó seda como material de sutura que fue teñida con orceína y ocurrió una desorganización de las fibras elásticas y un aumento en el grosor de la túnica media en todos los tiempos. (d) Muestra del día 30 en la que se utilizó seda como material de sutura que fue teñida con tricrómico de Masson, en la que observa la reversión de los cambios antes mencionados.

### 3.1.1.2 Arteria elástica (aorta) y polipropileno.

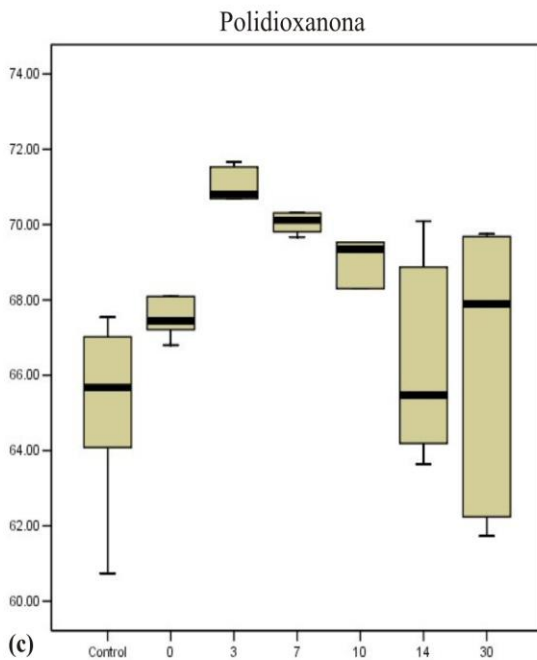
Al igual que lo ocurrido en el caso de polidioxanona, al emplear polipropileno como material de sutura en este mismo tipo de vaso sanguíneo se encontró (figura 3) que en todos los tiempos existió continuidad del endotelio, además de un engrosamiento transitorio de la túnica media en los días 3,7 y 10 (gráfico 1) con una recuperación en el día 14 y 30. No se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.



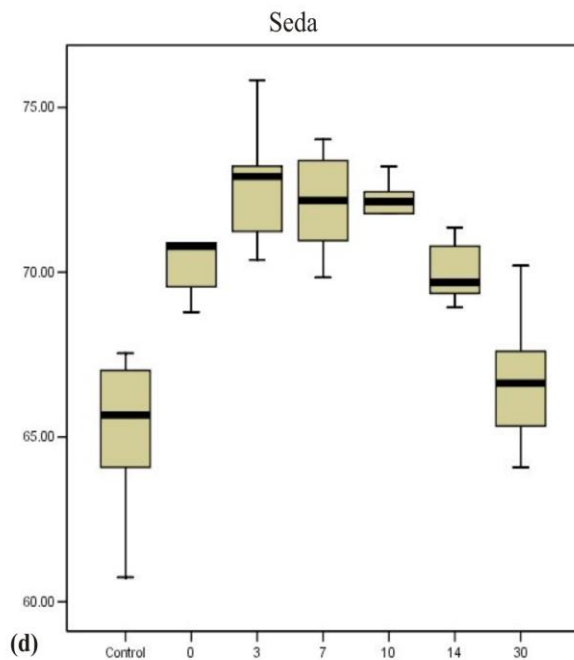
(a)



(b)



(c)



(d)

Gráfico 1. Micrometrías de arteria elástica con los diferentes materiales de sutura. (a) Se utilizó la tinción con tricrómico de Masson para realizar las mediciones considerando la túnica media delimitada entre la lámina elástica interna y externa. Se reporta la media del grosor de la túnica media ( $n=4$ , por condición) para cada conducto y material de sutura. (b) Con Polipropileno se observa un engrosamiento de la túnica media en los días 3-10 con una recuperación hacia el día 14-30. (c) Con Polidioxanona se aprecia un engrosamiento de la túnica media (al igual que en el polipropileno) en los días 3-10 con una recuperación hacia el día 14-30. (d) A diferencia de lo anterior al emplear seda se observa un engrosamiento desde el tiempo 0 que se mantiene hasta antes del día 14 con recuperación hacia el día 30.

### **3.1.1.3 Arteria elástica y seda**

Al diferencia de lo que sucedió en el caso de polidioxanona y polipropileno como materiales de sutura, al emplear seda se observó (figura 3) un engrosamiento mas prolongado de la túnica media en los días 3-14 (grafico 1) con una recuperación en el día 30. La continuidad del endotelio se conservó en todos los tiempos. No se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.

### **3.1.2 Arteria muscular (arteria femoral).**

Se realizaron un total de 72 procedimientos quirúrgicos en este conducto en el que se probaron los tres materiales de sutura y se evaluaron a los tiempos 0, días 3,7,10,14 y 30 (n=4, por tiempo y condición).

#### **3.1.2.1 Arteria muscular y polidioxanona.**

Al realizar las anastomosis termino-terminal de arteria muscular (arteria femoral) con polidioxanona como material de sutura se encontraron (figura 4) características morfológicas normales en las tres tunicas. La continuidad del endotelio fue una característica común en todos los tiempos de evaluación. No se encontró (grafico 2) engrosamiento de la túnica media en ningún tiempo y tampoco se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.



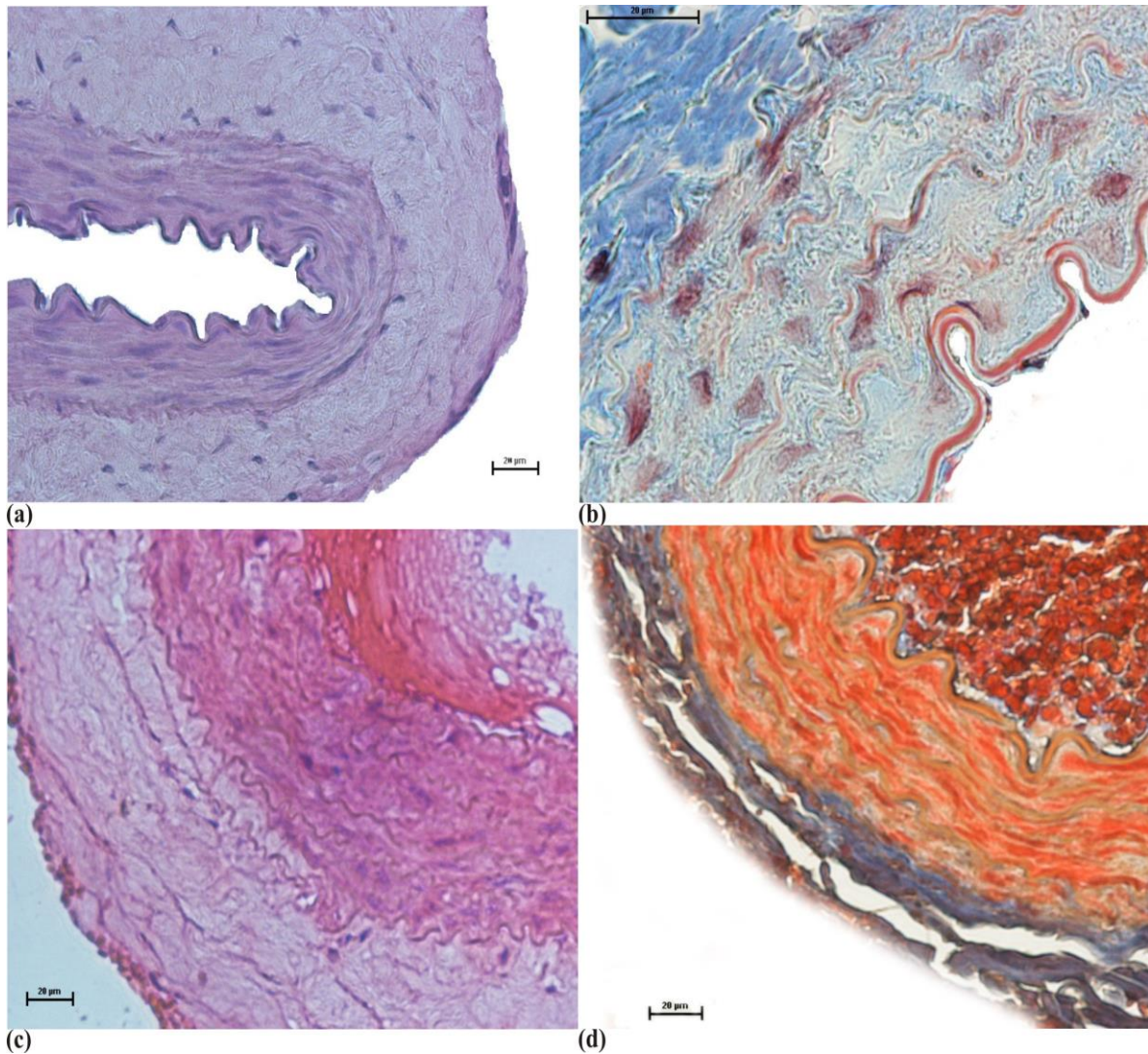


Figura 4. Arteria muscular. Cortes transversales de arteria femoral de rata. (a) Fotomicrografía de una muestra control (no suturada), que fue teñida con HyE en la que se identifican las tres tunicas con su morfología normal. (b) Corte representativo de todo el grupo, que fue teñida con tricrómico de Masson en la que se observa el endotelio de forma continuo preservado después de la sutura. (c) Muestra en la que se utilizó seda como material de sutura que fue teñida con HyE en la que ocurrió un engrosamiento de la túnica media. (d) Corte representativo teñido con tricrómico de Masson en la que no se observan alteraciones morfológicas al emplear polipropileno o polidioxanona como material de sutura.



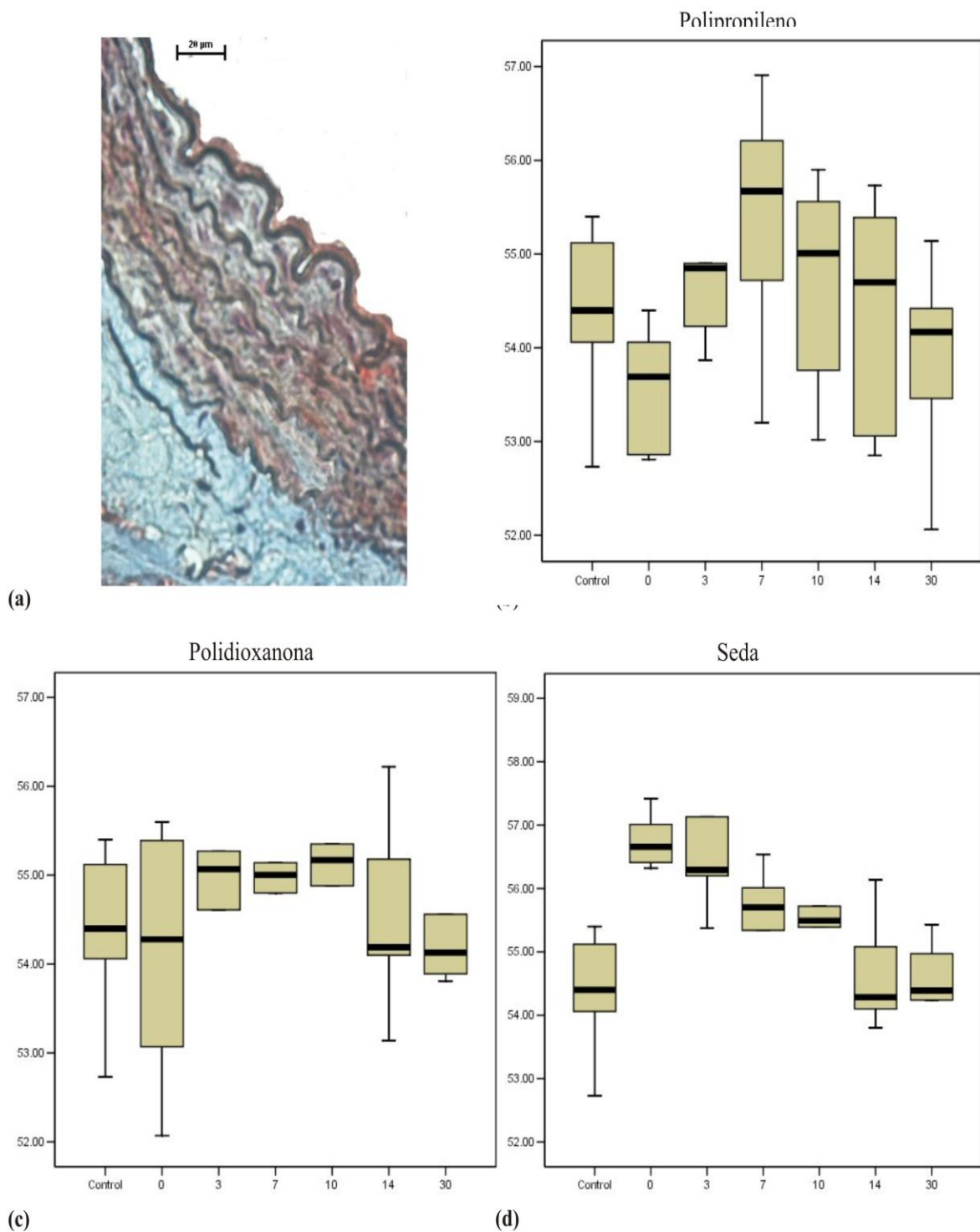


Gráfico 2. Micrometrías de arteria muscular con los diferentes materiales de sutura. (a) Se utilizó la tinción con tricrómico de Masson para realizar las mediciones considerando las laminas elásticas interna y externa para delimitar la túnica media. (b) Con Polipropileno se observó que existen ligeras variaciones en el grosor de la túnica media a lo largo del tiempo pero no hay diferencia significativa. (c) Con Polidioxanona se apreció una ligera variación en los grosores de las túnicas medias pero sin ser importantes. (d) Con Seda se observó una aumento en el grosor de la túnica media en el tiempo 0-10 y luego una recuperación.

### **3.1.2.2 Arteria muscular y polipropileno.**

Al realizar las anastomosis termino-terminal de arteria muscular (arteria femoral) con polipropileno como material de sutura se encontraron (figura 4), al igual que con la polidioxanona, características morfológicas normales en las tres tunicas. La continuidad del endotelio fue una característica común en todos los tiempos de evaluación. No se encontró (grafico 2) engrosamiento de la túnica media en ningún tiempo y tampoco se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.

### **3.1.2.3 Arteria muscular y seda**

Al diferencia de lo que sucedió en el caso de polidioxanona y polipropileno como materiales de sutura, al emplear seda se observó (figura 4) un engrosamiento transitorio de la pared en los días 0-3 (grafico 2) con una recuperación del día 7 en adelante. La continuidad del endotelio se conservó en todos los tiempos. No se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.

### **3.1.3 Vena cava.**

Se realizaron un total de 72 procedimientos quirúrgicos en este conducto en el que se probaron los tres materiales de sutura y se evaluaron a los tiempos 0, días 3,7,10,14 y 30 (n=4, por tiempo y condición).

#### **3.1.3.1 Vena (cava) y polidioxanona.**

Al realizar las anastomosis termino-terminal de vena (cava) con polidioxanona como material de sutura se encontró (figura 5) una morfología normal en las tres tunicas. La continuidad del endotelio fue una característica común en todos los tiempos de evaluación. No se encontró (grafico 3) engrosamiento de la pared en ningún tiempo y tampoco se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.

#### **3.1.3.2 Vena (cava) y Polipropileno.**

Al realizar las anastomosis termino-terminal de vena (cava) con polidioxanona como material de sutura se encontró (figura 5) una morfología normal en las tres tunicas. La continuidad del endotelio fue una característica común en todos los tiempos de evaluación.

No se encontró (grafico 3) engrosamiento de la pared en ningún tiempo y tampoco se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.

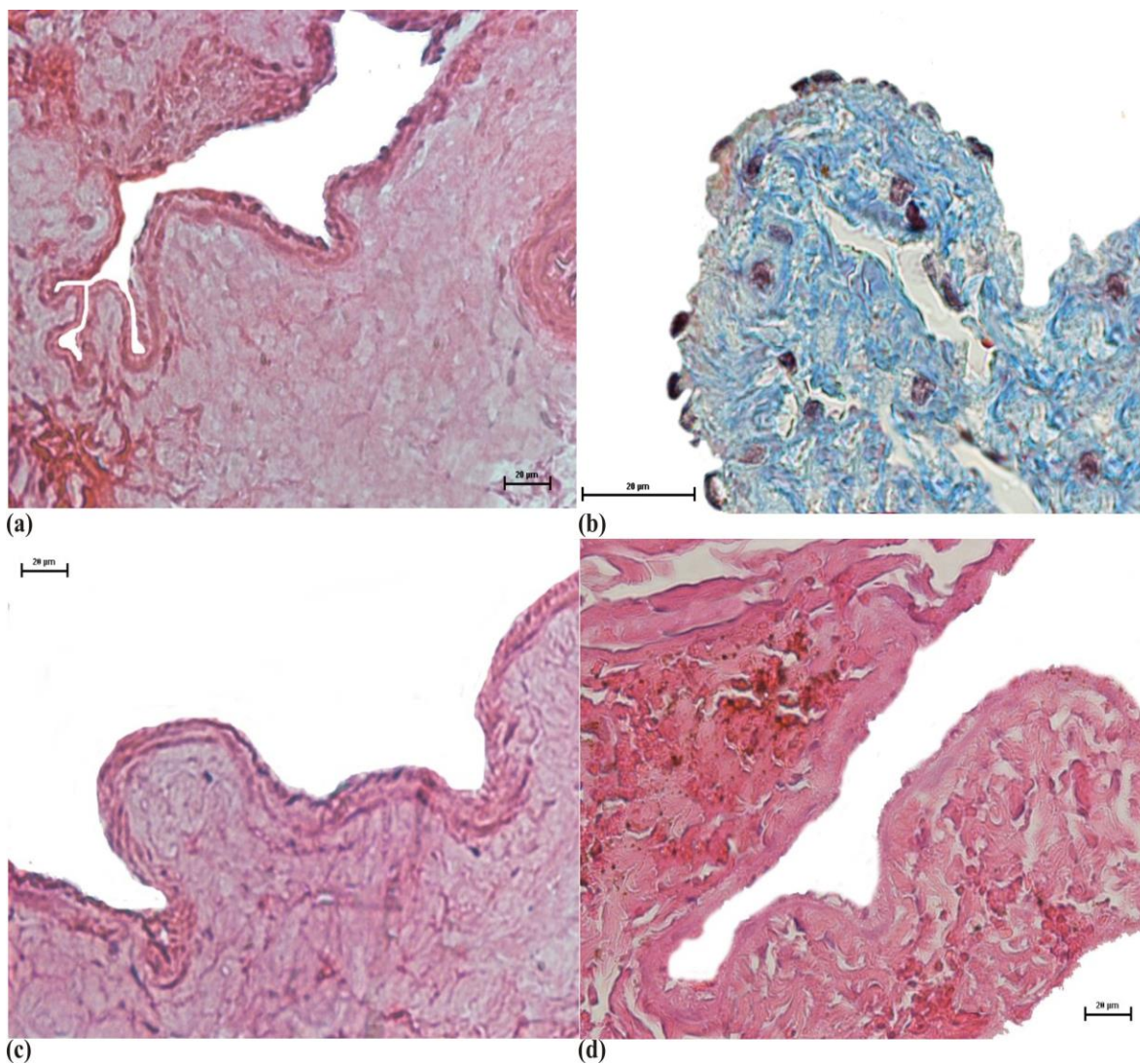


Figura 5. Vena. Cortes transversales de vena cava de rata. (a) Fotomicrografía de una muestra control (no suturada), teñida con HyE en la que se identifican las tres tunicas con su morfología normal. (b) Corte representativo de todo el grupo, teñida con tricrómico de Masson en la que se observa la continuidad del endotelio. (c) y (d) Muestras en representativa de cuando se empleó polipropileno, polidioxanona o seda como material de sutura en la que no se observan alteraciones.

### 3.1.3.3 Cava Seda

Al realizar las anastomosis termino-terminal de vena (cava) con seda como material de sutura se encontró (figura 5) una morfología normal en las tres tunicas. La continuidad del

endotelio fue una característica común en todos los tiempos de evaluación. No se encontró (grafico 3) engrosamiento de la pared en ningún tiempo y tampoco se observaron signos de necrosis y fibrosis en ninguna de las tunicas.

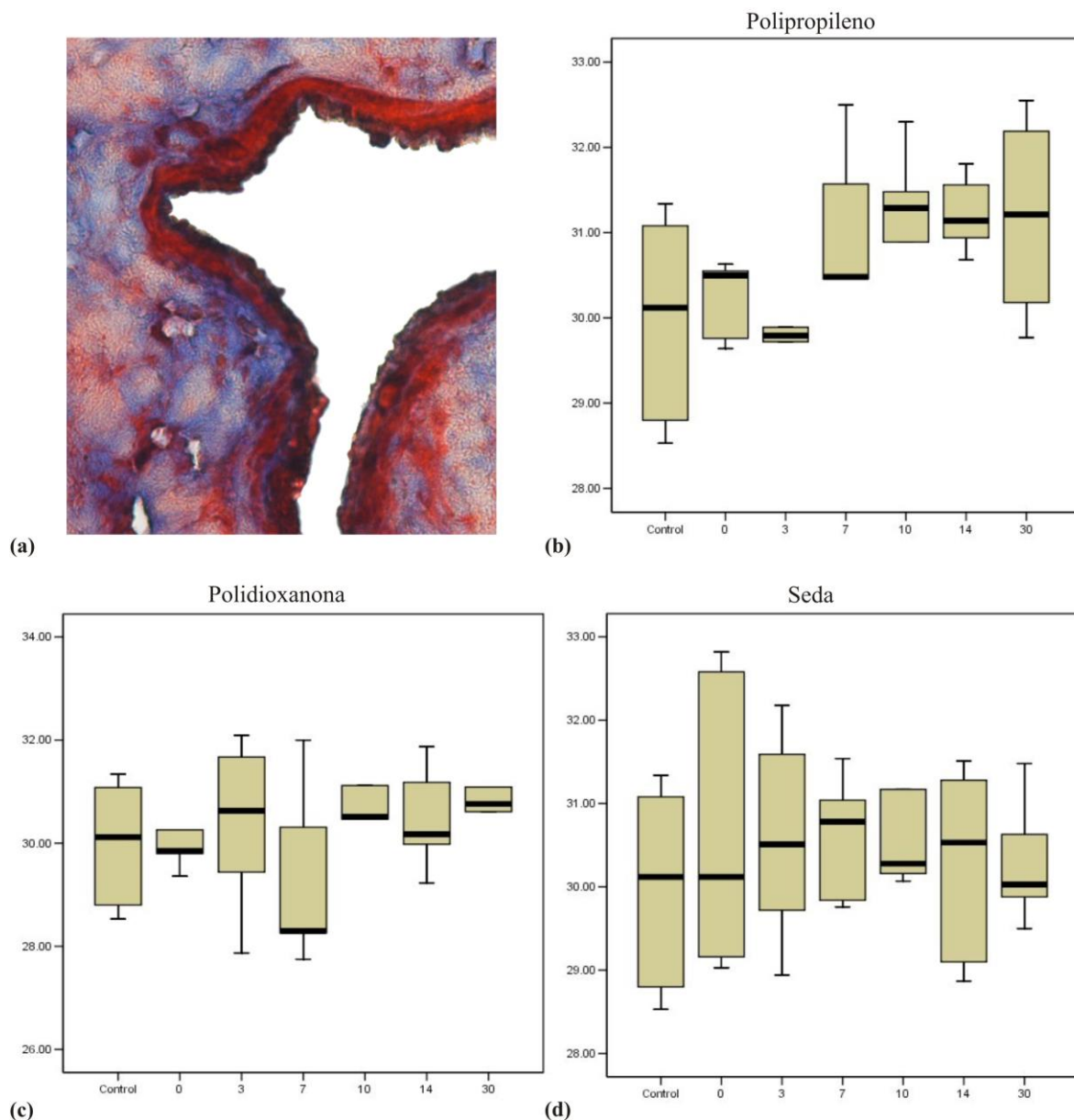


Grafico 3. Micrometrías de vena con diferentes materiales de sutura. (a) Se utilizó la tinción de tricrómico de Masson para realizar las mediciones de la pared vascular. (b), (c) y (d) Con polipropileno, Polidioxanona y Seda (respectivamente) se observa una ligera variación en el grosor de la pared a lo largo del tiempo, en la que siempre existió superposición de los rangos y desviaciones estándares.

### **3.2 Análisis Inmunohistoquímico.**

Se realizó la técnica TUNEL para la detección de apoptosis en los diferentes conductos (arterias elástica y muscular, y vena) en los diferentes tiempos. Se utilizó como control positivo una sección de hígado que fue tratada con una nucleasa para inducir la fragmentación del ADN.

#### **3.2.1 Arteria elástica.**

Se procesaron las muestras de arteria elástica con los diversos materiales de sutura y en ninguna de las condiciones y tiempos no se encontró positividad a la técnica (figuras 6 y 7). Así mismo, no se encontraron signos de apoptosis en los cortes procesados con la técnica histológica y teñidos con tricrómico de Masson.

#### **3.2.2 Femoral.**

Se procesaron las muestras de arteria muscular con los 3 materiales de sutura en los diferentes tiempos y no se encontró positividad a la técnica (figuras 6 y 7). Así mismo, no se encontraron signos de apoptosis en los cortes procesados con la técnica histológica y teñidos con tricrómico de Masson.

#### **3.2.3 Cava**

Se procesaron las muestras de cava con los 3 materiales de sutura en los diferentes tiempos y no se encontró positividad a la técnica (figuras 6 y 7). Así mismo, no se encontraron signos de apoptosis en los cortes procesados con la técnica histológica y teñidos con tricrómico de Masson.



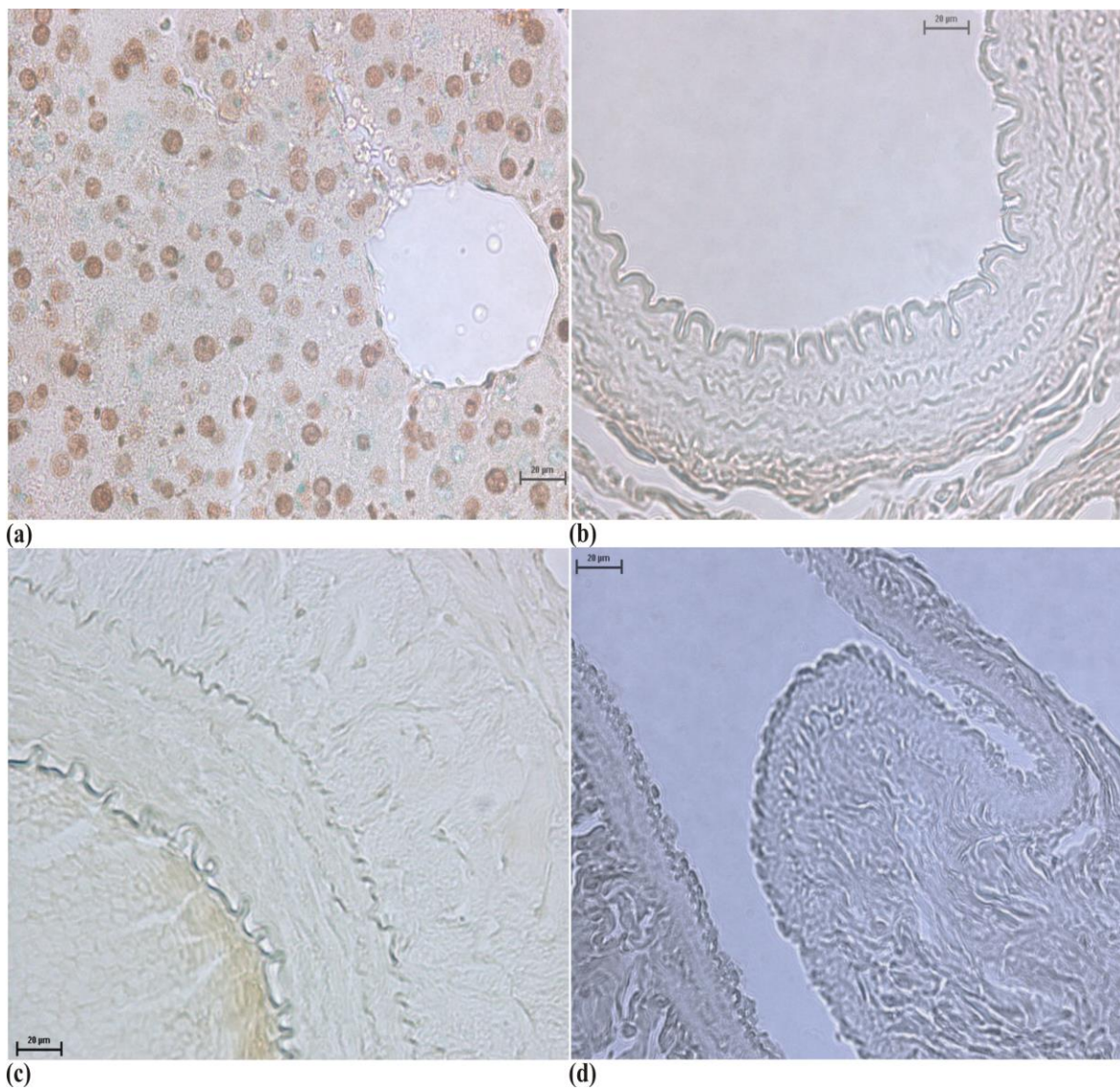


Figura 6. TUNEL. Cortes representativos de cada grupo. (a) Fotomicrografía de hígado que fue el control positivo procesado con la técnica TUNEL. La positividad consiste en la coloración café parduzca de los núcleos de los hepatocitos. Corte representativo de los grupos en que se utilizó arteria elástica (b), arteria muscular (c) y vena (d) en el que se observa negatividad para la técnica en cualquiera de las tunicas de la pared vascular.

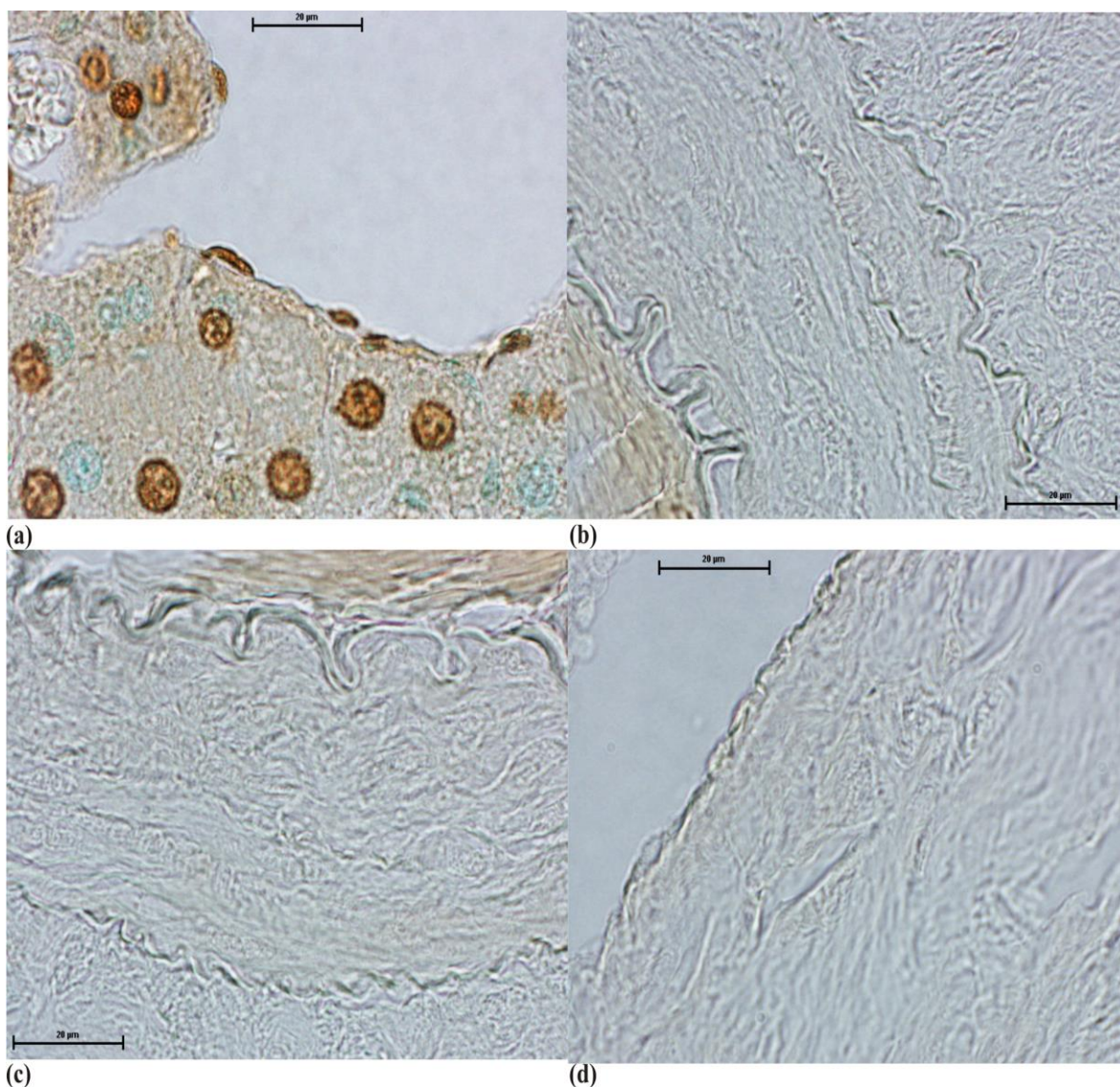


Figura 7. TUNEL. Endotelio. (a) Control, fotomicrografía de hígado en el que se observa una vena central y se identifican las células endoteliales positivas para apoptosis. (b), (c) y (d) Arteria elástica, muscular y vena (respectivamente) en el que se observa como las células endoteliales son negativas para la técnica.

### 3.3 Resumen de resultados.

Al evaluar la reacción de la arteria elástica a los 3 materiales de sutura se encontró que el polipropileno y la polidioxanona se comportan igual en cuanto no se observó una reacción de cuerpo extraño y producen un engrosamiento transitorio de la túnica media en el periodo entre los 3-10 días. Al emplear seda, en cambio, se identificó el engrosamiento por todo el periodo de evaluación.

Al evaluar la reacción de la arteria muscular a los 3 materiales de sutura se encontró que solo al utilizar la seda se observó un engrosamiento de la túnica media, mientras el polipropileno y la polidioxanona se comportan de igual forma al no observarse cambios en las paredes y tampoco reacción de cuerpo extraño.

Al evaluar la reacción de la vena a los 3 materiales de sutura se encontró que con ninguno se observó un incremento significativo en el grosor total de la pared vascular.

En la literatura existen solo estudios con la arteria muscular. En los que al igual que en nuestro estudio encuentran un engrosamiento de pared vascular y ausencia de reacción inflamatoria. No se observó fibrosis ni muerte celular en ninguna de las tunicas vasculares al emplear alguno de estos materiales de sutura.



## **Capítulo 4.**

### **Discusión.**

Se evaluó la histología de las arterias elásticas y musculares, así como de la vena tras la utilización de tres materiales de sutura (polidioxanona, polipropileno o seda). En la actualidad solo existen estudios de los materiales de sutura en arterias musculares en diferentes modelos animales, pero no hay reportes en arterias elásticas y venas. Si bien, los reportes incluyen suturas absorbibles y no absorbibles, se han utilizado mas las suturas sintéticas. En este estudio se agrega un material no absorbible natural como es la seda, la cual es una de las más utilizadas en las diferentes especialidades medias (Uff CR, 1995).

Al estudiar la polidioxanona como material de sutura en arteria elástica y muscular se observa un comportamiento similar caracterizado por un engrosamiento transitorio de la túnica media que ocurre en tiempos tempranos. A diferencia de loa anterior, este material no produce cambios al ser utilizado en conductos venosos. Esto coincide con los hallazgos de Thompson (1995), que probó este material en arterias musculares y observo un engrosamiento de la pared vascular y necrosis de la túnica media. Aarnio y cols. (1988) reportan que la polidioxanona produce un engrosamiento de la pared vascular con hiperplasia de la túnica intima (tabla 2).

Al evaluar el polipropileno como material de sutura en arteria elástica se observo un aumento de grosor de la túnica media. A diferencia de cuando se utiliza en arteria muscular y vena en los que se comporta de igual forma y se caracteriza por no producir modificaciones significativas en el grosor de la túnica media y continuidad del endotelio. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Chen (ano) en arterias musculares en las que no existen cambios en el grosor de las tunicas. Sin embargo, en un estudio similar realizado por Aarnio y colaboradores (1988) reportaron un engrosamiento de la pared vascular al utilizar este material de sutura.

Al emplear seda como material de sutura en arterias elásticas, musculares se observo un incremento en el grosor de la túnica media mayor al observado por los otros materiales de sutura. Al utilizar seda no se observaron cambios en las paredes vasculares del conducto

venoso. Hasta hoy, no existen reportes en la literatura de los cambios en la morfología en este conducto vascular.

Los resultados de este estudio muestran que el conducto venoso no sufre modificaciones morfológicas cuando se utiliza polidioxanona, polipropileno o seda como materiales de sutura en anastomosis termino-terminal. No hay estudios que evalúen las suturas en conductos venosos. Sin embargo, esto es muy importante porque en cirugías de revascularización miocárdica la vena safena es la primera elección y es el conducto mas utilizado (Willman VL, 1996).

Autor	Conducto vascular	Modelo	Tipo de sutura	Principales hallazgos
Claude O y cols.	Arteria femoral	Rata	Nylon Poliglactina	No hay diferencia entre las suturas absorbibles (poliglactina) y no absorbibles (nylon). Hiperplasia de la íntima. Respuesta inflamatoria. Necrosis en la media.
Thomson SR y cols.	Arterias femorales	Ratas	Nylon Polidioxanona	Engrosamiento de la adventicia
Chen LE y cols.	Arterias femorales	Ratas	Nylon y polipropileno	No reacción inflamatoria en tiempos tempranos (hrs) pero si a partir del día 3. No se observó hiperplasia de la túnica íntima.
Chen LE y cols.	Arterias femorales	Ratas	Nylon y polipropileno	No reacción inflamatoria en tiempos tempranos (hrs) pero si a partir del día 3. No se observó hiperplasia de la túnica íntima.
Aarnio P y cols.	Arterias femorales	perro	Polidioxanona y polipropileno	Polipropileno – Reacción de cuerpo extraño. Polidioxanona es superior. En ambos se observo un engrosamiento de la túnica íntima.

Tabla 2. Materiales de sutura utilizados en vasos sanguíneos.

Los resultados del presente estudio nos permiten descartar a estos materiales de sutura como un factor que pudiera estar involucrado en complicaciones tales como la trombosis, restenosis o formación de placas ateromatosas. En este trabajo se caracterizaron los efectos de las suturas en diferentes tipos de vasos sanguíneos, por lo que es posible iniciar la segunda etapa de la línea de investigación que consistirá en realizar estudios dirigidos a

determinar el efecto de factores como los cambios de presión y microambiente que pudieran participar en las complicaciones posteriores a la cirugía de revascularización.

## **Capítulo 5.**

### **Conclusiones y Perspectivas.**

#### **5.1 Conclusiones.**

1. La vena es conducto vascular donde se observaron las menores alteraciones morfológicas, independientemente del tipo de sutura.
2. El uso de polidioxanona y el polipropileno como material de sutura en anastomosis termino-terminal de arterias elásticas y musculares, y venas no produce alteraciones morfológicas permanentes.
3. Inferimos que el material de sutura no parece estar involucrado en las complicaciones (trombosis, restenosis y placas ateromatosas) de la cirugía de revascularización, por lo que se deben estudiar otros factores como los cambios de presión y el microambiente que pudieran explicar las variaciones en la evolución clínica.
4. No se observa fibrosis ni muerte celular en ninguna de las tunicas de las paredes de los vasos sanguíneos estudiados. El endotelio conserva su integridad tras el empleo de cualquiera de los tipos de sutura.

#### **5.2 Perspectivas.**

1. Realizar cirugías de derivación utilizando injertos venosos con estos materiales de sutura (PDS, polipropileno o seda) y analizar otros factores como los cambios de presión y el microambiente que pudieran estar involucrados en las complicaciones de este tipo de cirugía en la clínica.
2. Realizar estudios de medición la fuerza tensil de las suturas en cirugía vascular a través del tiempo, con el objetivo de proporcionar una base mas amplia para la selección mas adecuada del material de sutura en cirugía vascular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. **Aarnio P y cols.** 1988. Polydioxanone and polypropylene suture material in free internal mammary artery graft anastomoses. *JThorac Cardiovasc Surg.* 96:741-5.
2. **Aguirre Rivero R.** Tratado de Cirugía General. Manual Moderno. Primera Edición. 2003.
3. **Ahn CY, Borud LJ, Shaw WW.** 1994. Analysis of suturing techniques in the microvascular anastomosis of vessels of unequal diameter. *Ann Plast Surg.* 33 (5): 571.
4. **Alp NJ, West NEJ, Arnold N, et al.** 2002. Increased intimal hyperplasia in experimental vein graft stenting compared to arterial stenting: comparisons in a new rabbit model of stent injury. *Cardiovascular Research.* 56:164-172.
5. **Andersen E, Sondenaa K, Holter J.** 1989. A comparative study of polydioxanone (PDS) and polyglactin 910 (vicryl) in colonic anastomoses in rats. *Int J Colorectal Dis.* 4(4):251-4.
6. **Bakkum EA, Dalmeijer RAJ, Verdel MJC, et al.** 1995. Quantitative analysis of the inflammatory reaction surrounding sutures commonly used in operative procedures and the relation to postsurgical adhesion formation. *Biomaterials.* 16 (17): 1283-9.
7. **Bayes-Genis A, Birgit K, Keelan PC, et al.** 2000. Restenosis and hyperplasia: animal models. *Current Interventional Cardiology Reports.* 2:303-308.
8. **Boehm TD, Werner A, Radtke S, et al.** 1960. The effect of suture material and techniques on the outcome of repair of the rotator cuff. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 38: 111 – 5.

9. **Canver CC.** 1995. Conduit options in coronary artery bypass surgery. *Chest.* 108:1150-1155
10. **Casha JN, Hadden WA.** 1996. Suture reaction following skin closure with subcuticular polydioxanone in total knee arthroplasty. *The journal of arthroplasty.* 11(7):859-861.
11. **Chávez Domínguez R, Ramírez Hernandez J, Casanova Garces JM.** 2003. La cardiopatía coronaria en México y su importancia clínica, epidemiológica y preventiva. *Archivos de Cardiología de México.* 73:105-114.
12. **Chen L, Seaber A, Urbaniak JR.** 1993. Comparison of 10-0 polypropylene and 10-0 nylon sutures in rat arterial anastomosis. *Microsurgery.* 14:328-333.
13. **Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR.** 1993. Microvascular anastomoses in growing vessels: a long-term evaluation of nonabsorbable suture materials. *J Reconstr Microsurg.* 9(3):183-9.
14. **Chen Yi-Xi, Chen Long-En, Seaber A, Urbaniak JR.** 2001. Comparison of continuous and interrupted suture technique in microvascular anastomosis. *J Hand Surg* 26A:530-539.
15. **Claude O, Gregory T, Montemagno S, et al.** 2007. Vascular microanastomosis in rat femoral arteries: experimental study comparing non-absorbable and absorbable sutures. *J Reconstr Microsurg.* 23:87-92.
16. **Cook JJ.** Age-related alterations in the microvasculature of rat skeletal muscle. Temple University. Doctoral Thesis. Pennsylvania, USA. 1989.
17. **Croix de Ravignan D, Creusy C, Chevalier J, et al.** 2005. Chronological changes in morphometry and histology in the rabbit vascular wall after external radiation for the prevention of intimal hyperplasia. *Journal of Surgical Research.* 128:120-125.

18. **Cundiff DK.** 2002. Coronary artery bypass grafting (CABG): Reassessing efficacy, safety, and cost. *Medscape General Medicine.* 4(2)
19. **Dallan LA, Alameida de Oliveira S, Lisboa LA, et al.** 2001. Complete myocardial revascularization using arterial grafts. *The Heart Surgery Forum.* 4(2):179-183.
20. **Ducase E, Creusy C, Mazurier J, et al.** 2004. Morphometric and histological changes in the vascular wall after external radiation for the prevention of intimal hyperplasia. *Journal of Surgical Research.* 117: 316-322.
21. **Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, et al.** 2004. Guideline update for coronary artery bypass graft surgery: summary article. *Circulation.* 110:1168-1176.
22. **Gartner LP, Hiatt JL.** Texto y atlas de histología. McGraw-Hill. Segunda edición. 2002.
23. **Gersak B.** 1990. Fibrous changes and presence of calcium in the vessels walls six months after end-to-end arterial anastomoses in growing dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 99(2):379-80.
24. **Gregorius FK, Rand RW.** 1976. In vivo evaluation of nylon suture material by the scanning electron microscope. *Surg Gynecol Obstet.* 143(3):429-32.
25. **Gu YD, Li JF, Jiang JF, et al.** 1989. Scanning electron microscopic observations on the endothelial healing mechanism of vessels. *J Reconstr Microsurg.* 5(4): 327-30.
26. **Hansson GK.** 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352(16):1685-1695.

27. **Hawkins JA, Minich LL, Tani LY.** 1995. Absorbable polydioxanone suture and results in total anomalous pulmonary venous connection. *Ann Thorac. Surg.* 60: 55-59.
28. **Höer J, Anurov M, Titkova S, et al.** 2000. Influence of suture material and suture technique on collagen fibril diameters in midline laparotomies. *Eur Surg Res.* 32:359-367.
29. **Holmes Jr.** 2001. Debate: PCI vs CAGB: a moving target, but we are gaining. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2:263-265
30. **Infanger M, Shakibaei M, Kossmehl P, et al.** 2005. Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model. *J Vasc Res.* 42:202-213.
31. **Isogai N, Kamiishi H, Chichibu S.** 1988. Re-endothelialization stages at the microvascular anastomosis. *Microsurgery.* 9(2):87-94.
32. **Jiang Z, Wu L, Miller BL, et al.** 2004. A novel vein graft model: adaptation to differential flow environments. *AJP-Heart.* 286:240-245.
33. **Joshi AS, Janjanin S, Tanna N, et al.** 2007. Does suture material and technique really matter? Lessons learned from 800 consecutive blepharoplasties. *Laryngoscope.* 117:981-984.
34. **Kanellaki-Kyparissi M, et al.** 2005. Histological study of arterial and venous grafos before their use in aortocoronary bypass surgery. *Hellenic J Cardiol.* 46:21-30.
35. **Kalra M, Miller VM.** 2000. Early remodeling of saphenous vein grafts: proliferation, migration and apoptosis of adventitial and medial cells occur



- simultaneously with changes in graft diameter and blood flow. *J Vasc Res.* 37:576-584.
36. **Kwei S, Stavrakis G, Garcia-Cardena G, et al.** 2004. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *American Journal of Pathology.* 164:81-89.
  37. **Laflamme K, Roberge CJ, Labonté J, et al.** 2004. Tissue-engineered human vascular media with a functional endothelin system. *Circulation.* 111:459-464.
  38. **Lam JJ, Poon AKC, Ko PPS, et al.** 2001. Modified cross-pin femoral fixation using long needles, polydioxanone suture, and traction suture for Hamstring anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy.* 17(3):324-328.
  39. **Légaré JF, MacLean A, Buth KJ, et al.** 2005. Assessing the risk of waiting for coronary artery bypass graft surgery among patients with stenosis of the left main coronary artery. *CMAJ.* 173(4):371-375.
  40. **Lidman D, Daniel RK.** 1981. The normal healing process of microvascular anastomoses. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 15(2):103-110.
  41. **Llacer Perez M, González Jiménez JM, Jiménez Ruiz A.** 2006. Pseudoaneurysm in the radial artery after catheterization. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 53:119-121.
  42. **Lytle BW.** 2004. Prolonging patency – choosing coronary bypass grafts. *N Engl J Med.* 351(22):2262-2264.
  43. **Mahoney Jr. WM, Schwartz SM.** 2005. Defining smooth muscle cells and smooth muscle injury. *J Clin Invest.* 115:221-224.
  44. **Merrell SW, Lawrence PF.** 1991. Initial evaluation of absorbable polydioxanone suture for peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg.* 14(4):452-7; discussion 457-9.

45. **Miller VM, Reigel MM, Hollier LH, et al.** 1987. Endothelium-dependent responses in autogenous femoral veins grafted into the arterial circulation of the dog. *J Clin Invest.* 80: 1350-57.
46. **Motwani JG, Topol EJ.** 1998. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition and prevention. *Circulation.* 97:916-931.
47. **Naik MJ, Abu-Omar Y, Wright N, et al.** 2003. Total arterial revascularisation as a primary strategy for coronary artery bypass grafting. *Postgraduate Medical Journal.* 79:43-6.
48. **Nary Filho H, Matsumoto MA, Batista AC, et al.** 2002. Comparative study of tissue response to polyglecaprone 25, polyglactin 910 and polytetrafluorethylene suture materials in rats. *Braz Dent J.* 13(2)86-91
49. **Neligan PC.** 2006. Bioactive sutures. *Plast Reconstr Surg.* 118:1645-1647.
50. **O'Brien JE, Ormont ML, Yi Shi, et al.** 1998. Early injury to the media after saphenous vein grafting. *Ann Thorac Surg.* 65:1273-8.
51. **O'Brion ES, Earley MJ, Smyth H, Hooper CB.** 1993. Absorbable sutures in tendon repair. *Journal of Hand Surgery.* 20B;4:505-508.
52. **O'Donnell MA.** Coronary artery bypass graft surgery, principles and choice of conduit. *HeartWise.* 7-10
53. **Oskvig RM.** 1999. Special problems in the elderly. *CHEST;* 115;158-164.
54. **Pitsis AA, Mezilis NE, Dardas PS, et al.** 2002. Coronary artery bypass grafting for multi-vessel coronary disease on the beating heart: comparative study of 500 patients. *Hellenic J Cardiol.* 43:26-31.

55. **Quesada G, Diago V, Redondo L, et al.** 1995. Histologic effects of different suture materials in microsurgical anastomosis of the rat uterine horn. *J Reprod Med.* 40(8):579-84.
56. **Reed WA.** 1981. Cardiac surgery: past, present, and a look at the future. *Midcontinent Perspectives.*
57. **Rey J, Probst H, Mazzolai L, et al.** 2004. Comparative assesment of intimal hyperplasia development after 14 days in two different experimental settings: tissue culture versus ex vivo continuous perfusion of human saphenous vein. *Journal of Surgical Research.* 121:42-49.
58. **Ruengsakulrach P, Sinclair R, Buxton B, et al.** 1999. Comparative histopathology of radial artery versus internal thoracic artery and risk factors for development of intimal hyperplasia and atherosclerosis. *Circulation.* 100(Suppl II):II-139-II-144.
59. **Salud Publica de México.** 2002. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2000. *Salud Pública de México.* 44(3):266-282.
60. **Sanmartin M, Cuevas D, Goicolea J, et al.** 2004. Vascular complications associated with radial artery access for cardiac catheterization. *Rev. Esp. Cardiol.* 57(6):581-4.
61. **Schmitz-Rixen T, Storck M, Erasmi H, et al.** 1991. Vascular anastomoses with absorbable suture material: an experimental study. *Ann Vasc Surg.* 5(3):257-64.
62. **Serruys PW, Unger F, Sousa E, et al.** 2001. Comparison of coronary-artery bypass surgery and stenting for the treatment of multivessel disease. *N Engl J Med.* 344(15):1117-1124.

63. **Smith KM, Lamy A, Arthur HM, et al.** 2001. Outcomes and costs of coronary artery bypass grafting: comparison between octogenarians and septuagenarians at a tertiary care centre. *CMAJ*. 165(6):759-764.
64. **Takeishi M, Hirase Y, Kojima T.** 1992. Microsurgical use of polydioxanone (PDS) suture: an experimental report. *Microsurgery*. 13(5):268-72.
65. **Thomson SR, Gregory MA, Baker LW.** 1995. Morphological aspects of microarterial anastomoses: a comparison of nylon with polydioxanone. *Br. J. Plast. Surg.* 48(3): 165-71.
66. **Thomson SR, Gregory MA, Mars M, et al.** 1995. Morphological aspects of microarterial anastomoses: a comparison of nylon with polydioxanone. *Br J Plast Surg.* 48(3):165-71.
67. **Tierney LM, McPhee SJ, Papadakis MA.** Diagnostico clinico y tratamiento. Cuadragésima edición. Manual Moderno. 2005.
68. **Topalan M, Bilgin SS, Ip WY, et al.** 2004. Effect of torsion on microarterial anastomosis patency. *Microsurgery*. 24(5):416-7.
69. **Tortora GJ, Grabowski SR.** Principios de anatomía y fisiología. Oxford University Press. Novena edición. 2000.
70. **Turan T, Ozelik D, Kuran I, et al.** 2001. Eversion with four sutures: an easy, fast, and reliable technique for microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg.* 107(2):463-70.
71. **Uff CR, Scott AD, Graham A, et al.** 1999. Influence of soluble suture factors on in vitro macrophage function. *Biomaterials*. 16 355-360.

72. **Ünlü Y, Keles P, keles S, et al.** 2003. An evaluation of histomorphometric properties of coronary arteries, saphenous vein and various arterial conduits for coronary artery bypass grafting. *Surg Today*. 33:725-730.
73. **Van Andel CJ, Pistecky PV, Gründeman PF, et al.** 2003. Permanent wall stretching in porcine coronary and internal mammary arteries. *Ann Thorac Surg*. 76:805-10.
74. **Wada A, Kubota H, Akimaya T, et al.** 2001. Effect of Absorbable polydioxanone Flexor tendon repair and restricted active mobilization in a canine model. *J Hand Surg*. 26A:398-406.
75. **Wang ZG, Pu LQ, LiGD, et al.** 1994. Polydioxanone absorbable sutures in vascular anastomoses: experimental and preliminary clinical studies. *Cardiovasc Surg*. 2(4):508-13.
76. **Wai-Man R.** 2006. Training model for end-to-side microvascular anastomosis in rat. *Surgical Technique*. 10:114-116.
77. **Willman VL.** 1996. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft. *JAMA*. 276(18):1521-1525.
78. **Yang JP, Glickman AM, Edwards V, et al.** 1998. An ultrastructural study of the intimal hyperplasia in healing microarterial anastomoses. *Microsurgery*. 18(7):391-6.
79. **Yock CA, Boothroyd DB, Owens DK, et al.** 2003. Cost-effectiveness of bypass surgery versus stenting in patients with multivessel coronary artery disease. *Am J Med*. 115:382-389.
80. **Zimmerman L, Barnason S, Brey BA, et al.** 2002. Comparison of recovery patterns for patients undergoing coronary artery bypass grafting and minimally

invasive direct coronary artery bypass in the early discharge period. *Prog Cardiovasc Nurs.* 17(3):132-141.

## **APENDICE A**

### **A.1 Técnica Histológica para muestras embebidas en parafina.**

1. Obtención de la muestra.
2. Fijación con formaldehído al 4%.
3. Lavado en agua corriente.
4. Deshidratación en alcoholes graduales 60 – 100%
5. Aclaración con xilol.
6. Preinclusión (impregnación en parafina).
7. Inclusión definitiva para la formación del bloque.
8. Microtomía.
9. Adhesión de los cortes en baño de flotación.
10. Desparafinar e hidratar.
11. Coloración o tinción.
12. Deshidratación y aclaración.
13. Montaje con resina sintética.

### **A.2 Tinción con Hematoxilina y eosina (H y E).**

1. Desparafinar con xilol 5 min.
2. Etanol-Xilol 5 min.
3. Etanol absoluto 2 min.
4. Alcohol etílico 96° 2 min.
5. Agua destilada, enjuague lento.
6. Hematoxilina de Gill, 2 min.
7. Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
8. Alcohol Acido, 1 inmersión rápida.
9. Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
10. Agua amoniaca 2 inmersiones rápidas.
11. Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
12. Agua destilada, enjuague lento.
13. Eosina 6 inmersiones.
14. Alcohol etílico 96° enjuague breve.
15. Alcohol etílico 96° 1 min.
16. Etanol absoluto (2 cambios) 2 min.
17. Etanol-Xilol 3 min.
18. Xilol 2 min.
19. Xilol 3 min.
20. Montaje con resina sintética o Entellan.

### **A.3 Orceína.**

1. Desparafinar los cortes de la manera habitual y rehidratar (pasos 1-5 de HyE).
2. Enjuagar en agua destilada 1 min.
3. Teñir en solución de orceína 30 min.

4. Enjuagar en etanol del 70%
5. Enjuagar en agua destilada
6. Enjuagar en agua destilada
7. 2 x etanol del 95% (mover en la solución)
9. 2 x etanol del 100 %
10. aclarar en xileno y montar con
11. Montaje con resina sintética o Entellan.

#### **A.4 Tricrómico de Massón.**

Fijación.- Formaldehído al 4%.

Inclusión.- En parafina y cortes de 5 µm de espesor.

1. Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol y agua destilada.
2. Usar como “mordente” el fijador de Bouin por 30 – 60 min. a 56° C, o toda la noche a temperatura ambiente.
3. Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
4. Enjuagar los cortes en agua destilada.
5. Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
6. Lavar en agua corriente, 5 min. o hacer 3 cambios de 15 seg.
7. Enjuagar en agua destilada.
8. Teñir con la solución de Fucsina-Escarlata por 5 seg. (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
9. Lavar varias veces en agua destilada hasta que esta deje de teñirse.
10. Pasar los cortes a la solución de ácidos Fosfomolibdico-Fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
11. Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 seg. (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
12. Lavar con agua destilada varias veces hasta eliminar el exceso del colorante.
13. Pasar al acético acuoso por 1 – min.
14. Deshidratar en alcohol de 96° por unos seg. (cuidar que no se decolore).
15. Continuar con el alcohol absoluto hasta acabar en xilol y montar en resina.

#### **A.5 Método inmunohistoquímico para detectar la fragmentación de la cromatina utilizando tunel.**

Para cortes fijados con formaldehído al 4% y embebidos en parafina y cortes de 6 µm.

##### **I. Desparafinar**

1. Colocar los cortes en estufa a 57° C, 5 min.
2. Pasar cortes a 2 cambios de xilol 5 min. c/u.
3. Hidratar en alcoholes graduales 100%, 95% y 70%, 5 min. c/u.
4. Sumergir en PBS 1 X, 2 cambios 5 min. c/u.

NO PERMITA QUE LOS CORTES SE SEQUEN.

##### **II. Protocolo del Kit.**



1. Sumergir las muestras n PBS 1 X 10 min. a temperatura ambiente (TA). \*  
Secar cuidadosamente alrededor de la muestra.
2. Cubrir con 50 µl/muestra de solución de proteinasa K, incubar de 15 a 30 min. a 37° C.
3. Lavar 2 veces en agua desionizada 2 min. c/u.
4. Sumergir las muestras en solución bloqueadora por 5 min. (NO mas) a TA.
5. Lavar las muestras en PBS 1 X, 1 min.
6. Sumergir en Buffer TdT 1 X, 5 min.
7. Cubrir la muestra con 50 µl de mezcla de reacción de marcaje e incubar de 30 a 60 min. a 37° C en cámara húmeda.
8. Sumergir en Buffer Stop TdT 1 X, 5 min. a temperatura ambiente.
9. Lavar 2 veces en PBS 1 X, 2 min. c/u.
10. Cubrir la muestra con 50 µl de solución Strep-HRP e incubar 10 min. a 37° C
11. Lavar 2 veces en PBS 1X 2 min. c/u.
12. Sumergir en solución DAB de 2 a 7 min.
13. Lavar en varios cambios de agua desionizada 2 min. c/u.

### **III. Contratación**

1. Sumergir las muestras en agua desionizada por 2 min.
2. Sumergir las muestras de 5 seg. a 5 min. en verde de metilo.
3. Lavar las muestras subsecuentemente sumergiéndolas 10 veces n cada uno:
  - a. Agua desionizada.
  - b. Etanol 70%, 2 cambios.
  - c. Etanol 95%, 2 cambios.
  - d. Etanol 100%, 2 cambios.
  - e. Xilol 2 cambios.
4. Limpie el exceso de xilol.
5. Montar y almacenar en oscuridad.

## APENDICE B

### Soluciones

#### B.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

##### B.1.1 Formaldehído 4%

\*Para preparar 500 ml

Paraformaldehído

20 grs.

Agua destilada

450 ml.

\*Calentar a 60° C. por 30 minutos

PBS 10X

50 ml

Ajustar pH a 7.2

Almacenar a 4° C.

##### B.1.2 PBS 10 X

NaCl

8 grs.

KCl

0.2 grs.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.44 grs.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.24 grs.

##### B.1.3 Hematoxilina de Gill

Agua destilada

730 ml

Etilenglicol

250 ml

Hematoxilina anhidra (polvo)

2.0 grs.

\* Si esta en cristales pesar

2.36 grs.

Yodato de sodio

0.2 grs

Sulfato de aluminio

17.6 grs.

Acido acético glacial

2.0 ml.

\* Para la preparación se debe seguir el orden, en agitación, a temperatura ambiente por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

##### B.1.4 Eosina

###### Solución stock (concentrada)

Eosina amarillenta

1.0 grs.

Agua destilada	20 ml.
Alcohol del 96°	80 ml

### **Solución de trabajo**

Tomar una parte de la solución stock y agregarla en tres partes de alcohol de 80°. Antes de usar agregar 0.5 mL. de ácido acético glacial, por cada 100 mL. de colorante preparado y agitar.

### **B.1.5 Solución de Alcohol-Acido (Diferenciador o decolorante)**

Alcohol de 70ª	99 mL.
Acido clorhídrico (HCl)	1 mL.

### **B.1.6 Solución de Agua amoniacal (Virador)**

Agua destilada	99 mL.
Hidróxido de amonio	1 mL.

### **B.1.7 Hematoxilina Férrica de Weigert**

#### **Solución A**

Hematoxilina (anhidra)	1 gr.
Alcohol 96°	100 mL.

#### **Solución B**

Cloruro férrico acuoso al 29%	4 mL.
Água destilada	95 mL.
Acido clorhídrico conc.	1 mL.

### **Solución de trabajo**

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y de consistencia, con el tiempo suele precipitarse).

#### **\* Solución acuosa de cloruro férrico**

Cloruro férrico	14.5 grs.
Agua destilada	50 mL.

### **B.1.8 Solución de Fucsina ácida y Escarlata de Biebrich.**

Escarlata de Biebrich acuosa al 1%	90 mL.
Fucsina ácida acuosa al 1%	10 mL.
Ácido acético glacial	1 mL.

#### **\* Solución acuosa de escarlata de Biebrich**

Escarlata de Biebrich	1 gr.
-----------------------	-------

Agua destilada	100 mL.
----------------	---------

**\* Solución acuosa de Fucsina ácida**

Fucsina ácida	1 gr.
Agua destilada	100 mL.

**B.1.9 Solución de Ácidos Fosfomolíbdico y Fosfotúngstico**

Ácido fosfomolíbdico	5 grs.
Ácido fosfotúngstico	5 grs.
Agua destilada	200 mL.

**B.1.10 Solución de Azul de Anilina**

Azul de anilina	2.5 grs.
Agua destilada	100 mL.
Ácido acético glacial	2 mL.

**B.1.11 Solución acuosa de Ácido acético al 1%**

Ácido acético glacial	1 mL.
Agua destilada	99 mL.

**B.1.12 Solución fijadora de Bouin**

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 mL.
Formaldehído (36-38%)	25 mL.
Ácido acético glacial	5 mL.

**B.2 INMUNOHISTOQUÍMICA (TUNEL)**

La técnica de TUNEL se determinó utilizando 1 kit de Trevigen®, las soluciones marcadas con \* se deben preparar no mas de 30 minutos antes de usarse.

**\*B.2.1 Solución de proteinasa K.**

	<b>2 muestras</b>	<b>4 muestras</b>	<b>10 muestras</b>
Agua desionizada	100 µL.	200 µL.	500 µL.
Proteinasa K	2 µL.	4 µL.	10 µL.

**\*B.2.2 Solución bloqueadora**

Metanol	45 mL.
Peróxido de hidrógeno 30%	5 mL.

### **B.2.3 Solución de Buffer de marcaje TdT 1X**

- Diluir el buffer TdT 10X utilizando agua destilada.
- Use 50 mL. de buffer TdT 1X para procesar de 1 a 10 muestras.
- Separe una alícuota de 50 µL. por muestra para preparar la mezcla de reacción de marcaje (paso 7), y almacenar en hielo.

### **\*B.2.4 Mezcla de reacción de marcaje.**

- Descongele la mezcla de TdT y dNTP a TA, colóquela en hielo.
- Para mantener la actividad óptima de la enzima saque del refrigerador 1 tubo de la enzima solo el tiempo necesario para tomar el volumen.
- Mantenga la mezcla en hielo.
- Prepare 50 µL. por muestra de la manera siguiente:

	<b>2 muestras</b>	<b>4 muestras</b>	<b>10 muestras</b>
Mezcla de TdT dNTP	2 µL.	4 µL.	10 µL.
Stock cationica 50X	2 µL.	4 µL.	10 µL.
Enzima TdT	2 µL.	4 µL.	10 µL.
Buffer de marcaje TdT 1 X	100 µL.	200 µL.	500 µL.

### **B.2.5 Buffer Stop TdT 1X**

- Diluir el buffer stop TdT 10X utilizando agua destilada, almacenar a temperatura ambiente.
- Use 50 mL. de buffer stop TdT 1X para procesar de 1 a 10 muestras.

Buffer stop TdT 1X	5 mL.
Agua desionizada	45 mL.

### **\*B.2.6 Solución Strep-HRP.**

- Use 50 µL. solución Strep-HRP por muestra.
- Almacene la solución a temperatura ambiente.
- Para preparar añada:

	<b>2 muestras</b>	<b>4 muestras</b>	<b>10 muestras</b>
PBS 1X	100 µL.	200 µL.	500 µL.
Strep-HRP	2 µL.	4 µL.	10 µL.

### **\*B.2.7 Solución de DAB.**

- Descongele DAB a 37° C. almacene a temperatura ambiente NO en hielo, precipita la solución DAB.
- Prepare la solución no más de 30 minutos antes de usarla.
- Use 50 mL. de solución DAB para procesar de 1 a 10 muestras.
- Para preparar añada:

PBS 1X	50 mL.
DAB	250 µL.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	50 µL.

**B.2.6 Verde de metilo 1%.**

- Esta listo para usarse, puede re-usarse, almacene en recipiente cerrado, si precipita filtre.

**B.2.9 Control positivo.****TACS-Nucleasa y Buffer**

Buffer de marcaje TdT 1X	50 µL.
Mezcla de TdT dNTP	1 µL.
Stock Catiónica 50X	1 µL.
Enzima TdT	2 µL.
TACS-Nucleasa	1 µL.

**B.2.10 Control negativo.**

- Sustituir la enzima TdT de la mezcla por agua milliq.