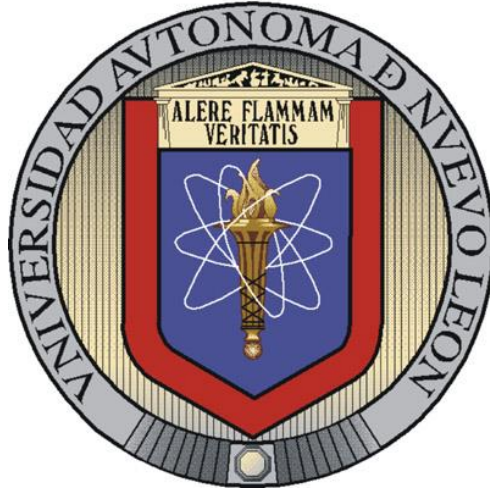


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**MODELO MICROQUIRÚRGICO PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA
MORFOLÓGICA ADAPTATIVA DE LA PARED VASCULAR EN
SEGMENTOS VENOSOS INJERTADOS EN CONDUCTOS ARTERIALES EN
RATAS WISTAR.**

POR

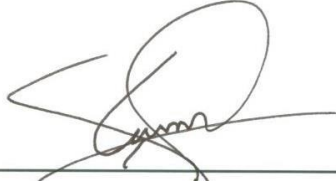
M.C. SERGIO EVERARDO VELÁZQUEZ GAUNA.

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

Julio, 2013

MODELO MICROQUIRÚRGICO PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA MORFOLÓGICA ADAPTATIVA DE LA PARED VASCULAR EN SEGMENTOS VENOSOS INJERTADOS EN CONDUCTOS ARTERIALES EN RATAS WISTAR.

Aprobación de la tesis:



Dr med. Santos Guzmán López.
Director de Tesis.



Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña.
Co-director de Tesis.



Dr. C. Arturo Chávez Reyes.
Co-director de Tesis.



Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra.
Comisión de Tesis.



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna.
Comisión de Tesis.



Dr. med. Gerardo E. Muñoz Maldonado.
Subdirector de Estudios de Posgrado.

MODELO MICROQUIRÚRGICO PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA MORFOLÓGICA ADAPTATIVA DE LA PARED VASCULAR EN SEGMENTOS VENOSOS INJERTADOS EN CONDUCTOS ARTERIALES EN RATAS WISTAR.

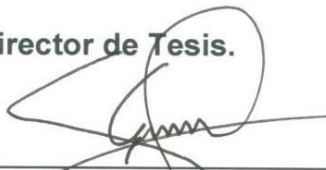
Presentado por:

M.C. Sergio Everardo Velázquez Gauna.

Este trabajo se realizó en los departamentos de Anatomía Humana 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 Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña y el Dr. C. Arturo Chávez Reyes.

Firmas

Director de Tesis.



Dr. med. Santos Guzmán López.

Co-Director de Tesis.



Dr. C. Rodrigo E. Elizondo
Omaña.

Co-Director de Tesis.



Dr. C. Arturo Chávez Reyes.

DEDICATORIA.

A **Dios**, por tus grandes enseñanzas a lo largo de este gran recorrido; por dejarme claro que tus pensamientos no son mis pensamientos, ni tus caminos son mis caminos, sin embargo, a pesar de todos mis errores has permanecido fiel y me has permitido llegar a este día y entregar este trabajo. A ti sea la honra y la gloria, este logro es tuyo.

A mi madre **Maricruz**, por ser ejemplo de amor incondicional, por no desistir y dar todo por los tuyos, tal vez no te lo digo mucho ni muy seguido, pero eres mi SUPER MAMÁ, y te amo por eso. Este logro también te pertenece.

A mi padre **Germán** (Q.E.P.D.) por tu cariño muy a tu manera, porque me enseñaste, tal vez inconscientemente, el gusto por el autoaprendizaje, por querer saber la razón de las cosas. Estés donde estés, celebra conmigo papá, este logro va dedicado a ti.

A mis hermanos **Germán, Jorge, Verónica** y a sus familias por el apoyo moral, las palabras de aliento que he recibido de ustedes durante tanto tiempo, muchas gracias. A veces también terminamos peleados o disgustados por tonterías, pero sabemos que en el fondo el amor fraternal es interminable, los quiero.

AGRADECIMIENTOS.

A **Dios** por darme vida, salud, por cuidar de mi familia y, en general, por cuidarnos durante este tiempo y por permitirme llegar a la finalización de este doctorado.

A mis padres **Germán (Q.E.P.D.), Maricruz**, a mis hermanos **Germán, Jorge, Vero** por sus cuidados y palabras de aliento, el apoyo moral brindado fue muy importante para mí.

Al **Dr. Santos Guzmán López** por abrirme las puertas de su Departamento de Anatomía Humana y permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Su calidad humana y sencillez son ejemplo a seguir.

Al **Dr. Rodrigo E. Elizondo Omaña** por el apoyo y la paciencia brindados para realizar esta tesis, por creer que un “no médico” podía encajar en el departamento, te agradezco la confianza.

Al **Dr. Arturo Chávez Reyes**, como siempre un gusto contar con tu experiencia, tu crítica objetiva, apoyo moral y amistad. Tu ayuda contribuyó a mejorar este trabajo.

Al **Ph.D. Julio Sepúlveda Saavedra**, por su interés y apoyo constante en el desarrollo de esta tesis, por brindarme parte de su enorme experiencia en las ciencias morfológicas para interpretar resultados, por su comprensión en los momentos difíciles y porque su ayuda fue más allá de lo que era necesario, le estoy muy agradecido doctor.

Al **Dr. Roberto Montes de Oca Luna**, por haberme regalado un poco de su gran experiencia, por sus atinados comentarios para la realización de esta tesis y su calidad humana, muchas gracias.

Al **Dr. Adolfo Soto Domínguez**, en verdad no tengo palabras para agradecerte todo el apoyo y tiempo que invertiste en mí cuando más lo necesitaba, tu ayuda fue invaluable. Le doy muchas gracias a Dios por tu amistad, espero que no sea la última vez que trabajemos juntos.

A mis compañeros y amigos de Morfología: **Arnulfo, Laura, Katia, Nelly, Marichú, Jaime, Salomón, Iván, Rubén, Paolo, Mony, Yessi, los Juanes**, por los buenos momentos y los buenos consejos que intercambiamos.

Al **personal docente, administrativo y técnico del departamento de Anatomía Humana**, por las enseñanzas, ayuda y consejos recibidos.

Al personal del **Departamento de Embriología** por las atenciones brindadas, permitírnos usar sus instalaciones y por proveernos de las ratas utilizadas en esta tesis.

A los compañeros y amigos de Anatomía: **Quiroga, Juanjo, Hinojosa, Eliud, Claudia, Dany, Mel, Carmona, Poncho, Pato, Daryl, Jimmy, Soto, Miriam, Cynthia, Rodo, Leyva, Bonilla, Marce, Ángel**, y muchos más (disculpen si se me escapa alguno), gracias por su amistad y los buenos momentos.

A la congregación de la **Iglesia Bautista del Norte (IBN)** por las porras, las oraciones, y el apoyo.

TABLA DE CONTENIDO.

CAPÍTULO	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN -----	1
1.1 Sistema cardiovascular -----	1
1.2 Cardiopatía isquémica -----	2
1.3 Cirugía de revascularización -----	3
1.3.1 Conductos vasculares empleados en revascularización miocárdica -----	4
1.3.2 Injertos venosos -----	6
1.4 Respuesta morfológica adaptativa -----	6
1.4.1 Hiperplasia de la túnica íntima -----	6
1.4.1.1 Proliferación celular -----	8
1.4.1.2 Migración celular -----	9
1.4.1.3 Apoptosis -----	9
1.4.1.4 Producción de componentes de la matriz extracelular -----	9
1.5 Modelos animales de experimentación -----	10
1.6 JUSTIFICACIÓN -----	11
1.7 HIPÓTESIS DE TRABAJO -----	11
1.8 OBJETIVO GENERAL -----	12
1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	12
 2. MATERIAL Y MÉTODOS -----	 13
2.1 Material -----	13
2.1.1 Material biológico -----	13
2.1.2 Equipos e infraestructura utilizada -----	13
2.1.3 Reactivos -----	14
2.1.4 Material consumible utilizado -----	15
2.2 Métodos -----	16
2.2.1 Grupos experimentales -----	16

CAPÍTULO	PÁGINA
2.2.2 Estrategia experimental -----	16
2.2.3 Modelo microquirúrgico de injerto venoso -----	17
2.2.3.1 Procedimiento quirúrgico -----	17
2.2.3.2 Obtención de la muestra -----	18
2.2.3.3 Procesamiento de la muestra -----	18
2.2.4 Análisis histológico -----	18
2.2.4.1 Evaluación mediante microscopia de luz -----	18
2.2.4.2 Morfometrías -----	18
2.2.5 Análisis inmunohistoquímico para identificar poblaciones de células en proliferación y células musculares -----	19
2.2.6 Método inmunohistoquímico de TUNEL para la demostración de la fragmentación de la cromatina -----	19
3. RESULTADOS -----	20
3.1 Procedimiento quirúrgico -----	20
3.2 Análisis histológico -----	21
3.2.1 Hematoxilina y eosina -----	22
3.2.2 Tricrómico de Masson -----	23
3.2.3 Morfometrías -----	26
3.3 Análisis inmunohistoquímico para identificar poblaciones de células en proliferación y células musculares -----	27
3.3.1 Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) -----	27
3.3.2 Actina específica de músculo -----	29
3.4 Método inmunohistoquímico de TUNEL para la demostración de la fragmentación de la cromatina ---	29
4. DISCUSIÓN -----	32

CAPÍTULO	PÁGINA
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS -----	38
5.1 Conclusiones -----	38
5.2 Perspectivas -----	39
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	 40
 APÉNDICES -----	 46

LISTA DE FIGURAS.

FIGURA	PÁGINA
1. Características histológicas de arterias y venas -----	2
2. Sección transversal de una arteria coronaria -----	7
3. Factores que contribuyen al desarrollo de hiperplasia de la túnica íntima -----	8
4. Instrumental microquirúrgico utilizado en la cirugía de injerto venoso -----	14
5. Esquema que ilustra la estrategia experimental utilizada para este estudio -----	17
6. Esquema de las etapas de una cirugía de un segmento venoso femoral injertado en arteria femoral en una rata Wistar -----	22
7. Estructura general de injertos venosos femorales -----	24
8. Líquido extracelular -----	24
9. Disposición de túnicas de injertos venosos femorales ---	25
10. Proliferación celular en injertos venosos -----	28
11. Células musculares lisas en injertos venosos -----	30
12. Apoptosis en injertos venosos -----	31

LISTA DE TABLAS.

TABLA	PÁGINA
1. Morfometrías de la pared del injerto venoso a los días 0 (control), 1, 3, y 5 -----	27
2. Algunos de los modelos animales utilizados para el estudio de la respuesta adaptativa de conductos vasculares -----	33

APÉNDICES.

	PÁGINA
A. PERFUSIÓN DE TEJIDOS POR GRAVEDAD -----	46
B. TÉCNICA HISTOLÓGICA -----	48
C. TINCIONES -----	49
D. MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR CÉLULAS MUSCULARES O CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN -----	51
E. MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA MEDIANTE LA TÉCNICA TUNEL -----	53
F. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES -----	55
G. RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO -----	62

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

DNA	Ácido Desoxirribonucleico (siglas en inglés)
ACTP	Angioplastia Coronaria Transluminal Percutanea
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (siglas en inglés)
PBS	buffer de fosfatos en solución salina (siglas en inglés)
c/u	cada uno
CML	células de músculo liso
cm	centímetro
CR	Cirugía de Revascularización
DE	desviación estándar
bFGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (siglas en inglés)
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (siglas en inglés)
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulínico 1 (siglas en inglés)
TGF- β 1	Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (siglas en inglés)
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa (siglas en inglés)
°	grados
°C	grados Celsius
g	gramos
H y E	hematoxilina y eosina
h	hora
IL-1 β	Interleucina 1 beta
i.p.	intraperitoneal
LTB ₄	Leucotrieno B4
M ϕ	macrófago
μ L	microlitros
μ m	micrómetros
mg	miligramos
mm	milímetros
min	minutos
# cat	número de catálogo
HRP	peroxidasa de rábano (siglas en inglés)
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno

%	porcentaje
s	segundos
TRS	Target Retrieval Solution
T _a	temperatura ambiente
TUNEL	Terminal dUTP Nick End Labeling
T M	tricómico de Masson
TBST	Tris-buffer salino + Tween 20
UI	Unidades Internacionales
USA	United States of America

RESÚMEN

Sergio Everardo Velázquez Gauna.

Fecha de graduación: Julio de 2013.

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.

Título del Estudio:

MODELO MICROQUIRÚRGICO PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA MORFOLÓGICA ADAPTATIVA DE LA PARED VASCULAR EN SEGMENTOS VENOSOS INJERTADOS EN CONDUCTOS ARTERIALES EN RATAS WISTAR.

Número de páginas: 76.

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología.

Área de estudio: Morfología.

Propósito y Método de Estudio: Los conductos venosos autólogos son una opción importante y conveniente para las cirugías de revascularización debido a la facilidad en la obtención de estos, y a la abundante circulación colateral que presenta el sistema venoso. Sin embargo, cuando un segmento venoso es injertado en un lecho arterial actúan en él fuerzas biomecánicas que estimulan la modificación de su estructura (principalmente en las túnicas íntima y media), con el propósito de adaptarse y semejar al segmento arterial que fue ocluido previamente. Esta respuesta morfológica adaptativa es progresiva y a mediano o largo plazo ocluye la luz vascular, conduciendo al fracaso del injerto. El fracaso (oclusión) del injerto venoso es atribuido principalmente al desarrollo de hiperplasia de la túnica íntima en su pared vascular.

En este trabajo se caracterizó un modelo microquirúrgico para el estudio de la respuesta morfológica adaptativa de la pared vascular de un segmento de vena femoral injertado en la arteria homónima contralateral en ratas Wistar. Se implementó y estandarizó la técnica microquirúrgica de anastomosis término-terminal en los injertos. Estos se procesaron por la técnica histológica para analizar su estructura general por hematoxilina y eosina, se estudió la composición de la pared vascular por la técnica de tricrómico de Massón. Se detectaron células en proliferación y musculares lisas por medios inmunohistoquímicos. Y finalmente se observó la inducción de apoptosis por la técnica TUNEL.

Contribuciones y conclusiones: En este modelo de estudio se presentan cambios morfológicos adaptativos a los tiempos de 1, 3 y 5 días posoperatorios. Estos cambios ocurren principalmente en las túnicas media y adventicia. Se observó un aumento gradual del grosor de estas túnicas, así como aumento en la presencia de infiltrado celular y edema en los injertos a los diferentes tiempos analizados. Hay presencia de células en proliferación desde el día 1 posoperatorio y al día 3 estas ya están dispersas en la túnica media. No se observó la inducción de apoptosis en este modelo de estudio, a los tiempos analizados. Se propone analizar el efecto del silenciamiento de genes relacionados con el desarrollo de la hiperplasia de la túnica íntima sobre los cambios adaptativos del injerto venoso.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS.



Dr. med. Santos Guzmán López.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN.

1.1 Sistema cardiovascular.

El sistema cardiovascular está formado por el corazón, el cual es un órgano que bombea la sangre por medio de una serie de vasos eferentes (arterias), que se vuelven cada vez más pequeños conforme se ramifican. Las arterias conducen la sangre con nutrientes y oxígeno hacia una compleja red de pequeños túbulos que se anastomosan profusamente (capilares) y, a través de sus paredes, ocurre el intercambio de la sangre con los tejidos. Asimismo los capilares convergen en un sistema de canales dando lugar a las venas, estas se vuelven más grandes conforme se aproximan al corazón; las venas conducen la sangre desoxigenada y escasa de nutrientes de regreso al corazón y de aquí a los pulmones donde se oxigena, posteriormente regresa al corazón y es bombeada nuevamente al resto del cuerpo (Junqueira LC, 2005).

La mayoría de los vasos sanguíneos presentan características similares entre sí, aunque también poseen características que los hacen diferentes y permiten clasificarlos en grupos identificables. Los vasos sanguíneos, en general, poseen tres capas o tunicas: íntima, media y adventicia. La túnica íntima, situada en el plano más profundo del vaso sanguíneo, está formada por una capa de células endoteliales (epitelio plano simple) y tejido conectivo subendotelial (tejido conectivo laxo). En un plano intermedio está situada la túnica media, formada por células de músculo liso orientadas de manera concéntrica alrededor de la luz vascular, así como tejido conectivo fibroelástico, aunque estos componentes pueden variar en cantidad según el tipo de vaso sanguíneo. En el plano más superficial, la túnica adventicia es una capa compuesta principalmente de tejido fibroelástico dispuesto de manera longitudinal con presencia de fibroblastos (Gartner LP, 2002). Las características de la túnica media se utilizan como criterios para clasificar a las

arterias en elásticas o musculares, así como para distinguir los conductos venosos (Figura 1).

Si bien la función de los vasos sanguíneos es conducir la sangre, los diferentes tipos de conductos ejecutan funciones un poco diferentes e importantes a las cuales está adaptada particularmente su estructura.

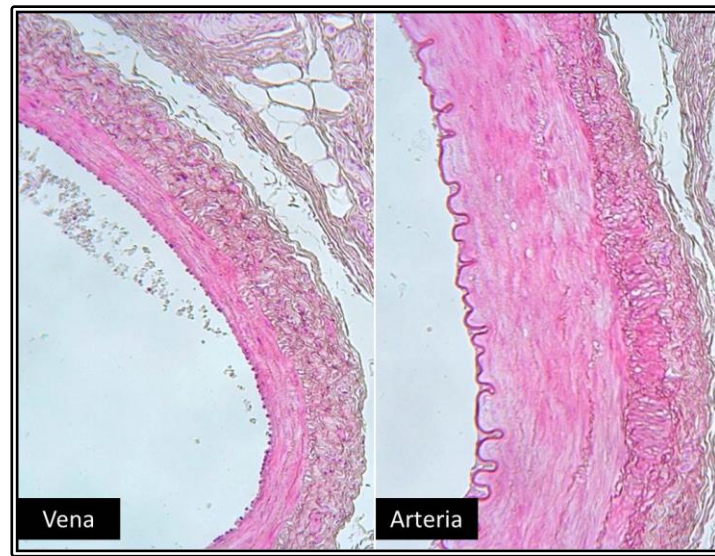


Figura 1. Características histológicas de arterias y venas. Las diferencias más notables entre ellas están dadas por la composición y grosor de la túnica media.

1.2 Cardiopatía isquémica.

En un evento isquémico ocurre una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo en una zona del organismo, con la consecuente disminución del aporte de oxígeno, nutrientes y eliminación de productos del metabolismo de esa región, produciendo estrés celular, que puede ser suficientemente intenso como para causar apoptosis o necrosis. (Cotran RS, 1995).

En la sociedad occidental moderna, la aterosclerosis es la patología arterial más frecuente y causa más de la mitad de todas las muertes, puesto que es la principal causa de cardiopatía isquémica. Las modificaciones ateroscleróticas en los vasos comienzan en la túnica íntima y se caracterizan por la presencia

de engrosamientos o placas originadas por la proliferación de células musculares lisas, acumulación de lípidos en estas células y en macrófagos, con fibrosis a consecuencia del depósito de fibras de colágeno (Geneser F, 2000). La aterosclerosis se caracteriza por la presencia de infiltraciones de material lípido blando y acelular en las paredes de la íntima (Gartner LP, 2002).

Para el año 2000 se estimaba que en Estados Unidos había 12 millones de personas con cardiopatía isquémica, y que, de 1.1 millones de personas que se esperaba que desarrollaran algún evento de cardiopatía isquémica durante 2001, aproximadamente 650 mil serían primeros eventos y 450 mil serían recurrencias (Cooper R, 2000). En 2002 tan solo en Estados Unidos hubo 494,392 casos reportados de muertes a causa de esta enfermedad, esto es aproximadamente el 71 % de las muertes por enfermedad cardíaca que se reportaron en ese año (Kochanek KD, 2004).

Los pacientes con cardiopatía isquémica pueden ser sometidos a tratamiento médico o quirúrgico. El tratamiento médico incluye la modificación de actividades de rutina, reducción de factores de riesgo, eliminación de enfermedades coexistentes y tratamiento farmacológico (Isselbacher KJ, 1994). El tratamiento quirúrgico puede ser una angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) o una cirugía de revascularización (CR) (Schwartz SI, 1995).

1.3 Cirugía de revascularización.

El objetivo de la cirugía de revascularización es proveer un conducto que al ser injertado en otra parte del sistema vascular pueda ser una vía adecuada para la irrigación de los tejidos isquémicos circundantes. Este procedimiento implica la anastomosis de un segmento arterial proximal a la región isquémica con un segmento arterial distal a ésta (Aguirre-Rivero R, 2003). Esta técnica quirúrgica es empleada en el tratamiento de la insuficiencia coronaria (cardiopatía isquémica) y arterial periférica (como el pie diabético) así como en

pacientes con pérdida extensa de tejido (Rienstra H, 2008; Campeau L, 1983; Cooper GJ, 1996).

Los injertos vasculares autólogos son los más utilizados en cirugías de revascularización, estos consisten en injertar un conducto vascular del mismo paciente en una región o zona isquémica de su organismo. Así mismo, estos injertos se pueden subclasificar en arteriales o venosos.

Las características ideales de estos conductos son que tengan una larga permeabilidad y que puedan perfundir adecuadamente los tejidos isquémicos. Sin embargo, existen múltiples factores que intervienen en la elección de un conducto vascular. Estos factores pueden estar relacionados al paciente, como su sobrevivencia, edad, condiciones clínicas o disponibilidad de los conductos vasculares. Las características de los conductos que influyen en su elección son su disponibilidad, localización anatómica, predisposición a cambios histopatológicos (trombosis, hiperplasia de la íntima, ateromas). La complejidad de la cirugía o la experiencia del cirujano también pueden influir en la elección del conducto vascular (Elizondo-Omaña, 2008).

1.3.1 Conductos vasculares empleados en revascularización miocárdica.

Los conductos vasculares más utilizados en la cirugía de revascularización miocárdica son, en orden de importancia: arteria torácica interna, vena safena interna (Pistavos CE, 2002), arteria radial (Pola P, 1996), arteria gastroepiploica derecha (Mills NL, 1989), arteria cubital (Riekkinen HV, 2003) y en menor proporción la arteria esplénica (Mueller CF, 1973) y la epigástrica inferior (Riekkinen HV, 2003; Elizondo-Omaña RE, 2005; Hinojosa-Amaya JM, 2010).

Se ha reportado que la arteria torácica interna tiene una permeabilidad del 90 al 95 % a los 15 años después de realizada la cirugía. Se utiliza cuando la coronaria afectada es la arteria descendente anterior. La arteria torácica interna izquierda se utiliza más que la derecha, la cual tiene una permeabilidad del 80 al 90 % a los 10 años y se utiliza cuando hay afectación de la arteria marginal

(Swartz SI, 1995). Actualmente, la arteria torácica interna es la primera opción para la revascularización miocárdica (Dallan LA, 2001).

La vena safena interna también se presenta como una opción para las cirugías de revascularización miocárdica ya que tiene suficiente longitud, diámetro y está libre de ateroma (O'Donnell A, 1999), además de ser adaptable y fácil de manejar (González-Santos JM, 2005).

La arteria radial se usa como injerto al afectarse la arteria descendente posterior. En las cirugías de revascularización donde se utiliza este conducto como injerto el 86 % de los pacientes se encuentran libres de angina a los 5 años. Acar y cols. reportaron que el índice de permeabilidad de la arteria radial a un año fue del 92 %, aparentemente más elevado que para los injertos venosos bajo las mismas condiciones (Acar C, 1998). La arteria radial es una alternativa al injerto de vena safena para revascularización puesto que posee altos índices de permeabilidad y mejor corriente de flujo (Dumanian GA, 1998).

Se ha reportado el uso de la arteria gastroepiploica derecha para revascularizar la arteria marginal posterior y a la coronaria derecha (Lytle BW, 1989; Pym J, 1987). Mills y cols. reportaron que la permeabilidad de esta arteria a los 13 meses de realizada la cirugía de revascularización era del 97 %; a los 5 años la tasa de supervivencia era del 92.9 %. Esta arteria se utiliza cuando los demás conductos vasculares no son suficientes (Mills NL, 1989).

El uso de la arteria cubital como injerto no es muy común debido a una convicción en la anatomía clásica que ha establecido a esta arteria como dominante del antebrazo, por lo que su extracción podría afectar la funcionalidad de la mano (Buxton B, 1998). Sin embargo, un estudio realizado por Hinojosa-Amaya y cols en 2005 afirma que la arteria cubital no es dominante en el antebrazo, por lo que podría ser usada en cirugías de revascularización (Hinojosa-Amaya JM, 2005). La arteria esplénica se ha utilizado con injerto *in situ* para la arteria coronaria derecha, sin embargo, el uso de este conducto no es común debido a las dificultades técnicas para su extracción, así como una longitud y diámetro inadecuados (Mueller CF, 1973).

1.3.2 Injertos venosos.

A pesar del uso abundante de los injertos arteriales, los conductos venosos autólogos siguen siendo una opción importante y conveniente para las cirugías de revascularización debido a la facilidad en la obtención de estos segmentos así como a la abundante circulación colateral que presenta el sistema venoso (Jiang Z, 2004; Petrofsky JA, 2004). Sin embargo, estos conductos suelen presentar complicaciones a mediano y largo plazo. Después del primer año de realizada la cirugía de revascularización, del 12 al 20% de los injertos están ocluidos. Entre 5 a 7 años posteriores a la cirugía, se han ocluido entre 25 y 35% de estos injertos. Y hacia los 10 años después de la cirugía, más del 50% de los injertos están ocluidos (Cooper GJ, 1996).

1.4 Respuesta morfológica adaptativa.

Cuando un segmento venoso es injertado en un lecho arterial actúan fuerzas biomecánicas que estimulan la modificación de su estructura (principalmente en las túnicas íntima y media), con el propósito de adaptarse y semejar al segmento arterial que fue ocluido previamente. Sin embargo, a mediano y largo plazo esta respuesta morfológica adaptativa progresa hasta ocluir la luz del injerto vascular, conduciendo al fracaso del injerto (Kwei S, 2004). La respuesta morfológica adaptativa también se presenta en injertos arteriales, aunque es más evidente en los injertos venosos.

1.4.1 Hiperplasia de la túnica íntima.

El fracaso del injerto venoso (oclusión) es atribuido principalmente al desarrollo de la hiperplasia de la túnica íntima en la pared vascular del conducto (Cooper GJ, 1996).

La hiperplasia de la túnica íntima es la respuesta de los vasos (arteria o vena) ante una lesión. Es una lesión estructural de la pared vascular, la cual se caracteriza por el desarrollo de una lámina elástica interna prominente, así como un aumento en la producción de componentes de la matriz extracelular y, principalmente, un aumento en la migración, proliferación y apoptosis de células musculares lisas (Figura 2) (Bäck M, 2005; Friedl R, 2004; Petrofski JA, 2004).

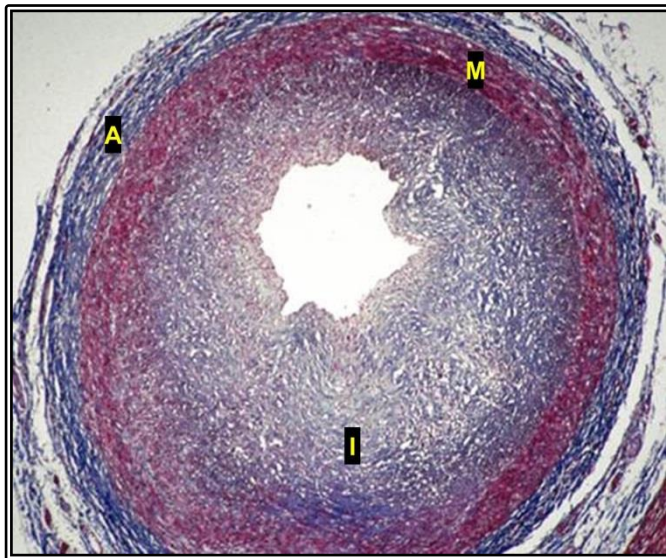


Figura 2. Sección transversal de una arteria coronaria. Se aprecia la túnica adventicia (A), túnica media (M) e hiperplasia de la túnica íntima.

El proceso de la hiperplasia de la túnica íntima ocurre debido a la conjunción de una serie de eventos en la pared vascular del injerto: En la luz vascular ocurre daño endotelial por trauma mecánico, isquemia-reperfusión e hipoxia, producidos por la manipulación del conducto vascular durante la cirugía de revascularización, también hay migración de monocitos y agregación plaquetaria, así como un incremento del estrés debido a las fuerzas biomecánicas que actúan sobre la pared vascular. Los monocitos se diferencian a macrófagos en la túnica íntima, y estos, junto con las plaquetas producen una serie de factores de crecimiento, entre los cuales se encuentran el Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF- β 1) y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), estas moléculas promueven la proliferación y quimiotaxis de células musculares lisas desde la túnica media y adventicia, también promueven la producción de componentes de la matriz extracelular (como colágeno, elastina y proteoglicanos). Por otra parte, en la

túnica media y adventicia hay diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y esta diferenciación puede llegar hasta células musculares lisas. También puede haber apoptosis temprana como parte de la remodelación tisular y edema de ambas túnicas (Figura 3) (Shachner T, 2006).

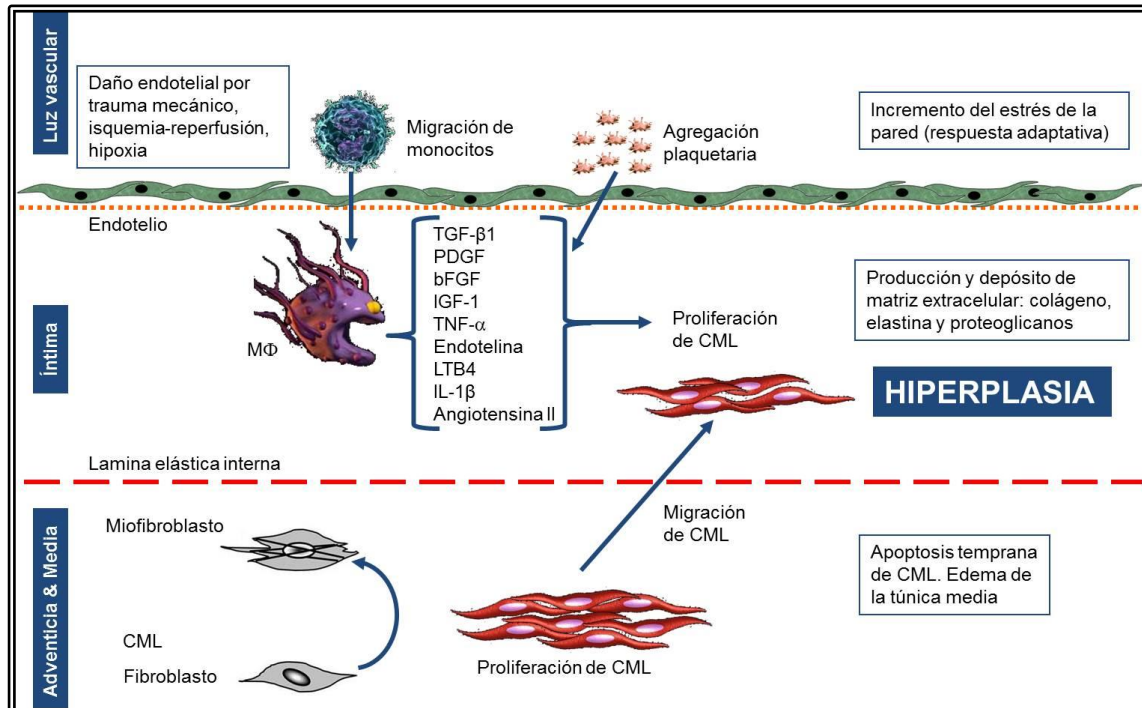


Figura 3. Factores que contribuyen al desarrollo de hiperplasia de la túnica íntima. Células de músculo liso (CML), macrófago (M ϕ), Factor de Crecimiento Transformante beta 1 (TGF- β 1), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF), Factor de Crecimiento Insulínico 1 (IGF-1), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Leucotrieno B4 (LTB4), Interleucina 1 beta (IL-1 β).

1.4.1.1 Proliferación celular.

La proliferación celular depende de la disponibilidad de factores de crecimiento tejido-específicos. Algunos estudios reportan proliferación de células musculares lisas en los injertos venosos dentro de las primeras 24-36 horas posteriores a la cirugía de revascularización, aumentando hacia los 3 a 5 días, con posterior disminución en los días 7 a 14 (Kalra M, 2000; Kwei S, 2004). El origen de las nuevas células musculares lisas de la pared del injerto no se conoce con exactitud. En un estudio realizado por Diao y cols. en 2008 se demostró que aproximadamente el 20 % de estas células derivan de precursores originarios de la médula ósea (Diao Y, 2008). Por otra parte, Hu y

cols. demostraron que aproximadamente el 60 % de las células musculares lisas tiene su origen en la propia vena injertada (Hu Y, 1999). Se cree que las plaquetas y/o tejidos circundantes pueden liberar algunas citocinas y factores de crecimiento involucrados en la proliferación celular.

1.4.1.2 Migración celular.

La migración celular es un fenómeno que ocurre en el desarrollo y remodelación tisular. Se ha documentado que ocurre migración celular como parte de la respuesta morfológica adaptativa de los injertos venosos. Algunas células de la túnica adventicia migran hacia la túnica íntima y media, participando en la hiperplasia (Kalra M, 2000).

1.4.1.3 Apoptosis.

Al igual que la migración celular, la apoptosis es un mecanismo presente en el desarrollo y remodelación tisular. La apoptosis se ha implicado en la regulación del engrosamiento de la túnica íntima en modelos experimentales de hiperplasia. Se ha reportado que ocurre a partir de los días 1 a 3, y su mayor expresión es en el día 5 postoperatorio (Bochaton-Piallat ML, 1995; Kwei S, 2004).

1.4.1.4 Producción de componentes de la matriz extracelular.

Estudios previos han demostrado que la proliferación y migración de células musculares lisas, así como la remodelación tisular general que experimentan los injertos venosos se relacionan con la actividad de enzimas llamadas metaloproteinasas 2 y 9, conocidas también como gelatinasas A y B. Estas enzimas pertenecen a la familia de endopeptidasas dependientes de zinc y son capaces de degradar colágeno y elastina (Lessner SM, 2004); se cree que esta función de las metaloproteinasas favorece el movimiento de células a

través de la matriz extracelular y permiten la remodelación tisular (Mavromatis K, 2000).

1.5 Modelos animales de experimentación.

Un modelo animal de experimentación implica el uso de varios animales de la misma especie. Estos grupos de animales se usan para reproducir una enfermedad o parte de ésta (como la osteoporosis, daño hepático, obesidad inducida, cáncer) o se les puede aplicar algún tratamiento farmacológico (análisis de biodisponibilidad, determinación de ventanas terapéuticas, toxicidad de nuevos medicamentos) o tratamientos quirúrgicos (inducción de isquemia cerebral focal o global, así como cirugías de revascularización para analizar la respuesta adaptativa de injertos vasculares). Finalmente, la evolución de las enfermedades o tratamientos aplicados a estos animales deben ser similares y extrapolables a los humanos (Clause BT, 1998; De Juan-Herráez V, 2004; Sata M, 2004).

En un estudio realizado por Elizondo-Omaña y cols. se reportó que no existen alteraciones significativas de la respuesta morfológica adaptativa al usar polidioxanona o polipropileno como material de sutura en anastomosis término-terminales en arterias musculares, elásticas y venas de ratas Wistar (Elizondo-Omaña RE, 2008). Por otra parte, Hifny y cols. evaluaron la histopatología de anastomosis microvasculares término-terminales en arteria femoral de ratas Sprague-Dawley, utilizando diferentes técnicas de sutura (simple interrumpida, continua, en manga). Concluyeron que la técnica de sutura simple interrumpida obtuvo mejor permeabilidad para anastomosis vasculares con un diámetro menor a 1 mm (Hifny M, 2007). Habiendo descartado el efecto de estos factores externos, ahora se ha propuesto caracterizar un modelo microquirúrgico para el estudio de la respuesta morfológica adaptativa de la pared vascular de un segmento de vena femoral injertado en la arteria homónima contralateral en ratas Wistar.

1.6 JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad el uso de segmentos venosos como injertos en cirugías de revascularización de tejidos isquémicos posee importantes implicaciones clínicas, esto gracias a la facilidad de obtención de dichos conductos vasculares y a la abundante circulación colateral del sistema venoso. Sin embargo, estos injertos se ocluyen a corto o mediano plazo debido principalmente al desarrollo de hiperplasia de la túnica íntima en su pared vascular.

Desde principios del siglo XX se han utilizado distintos modelos animales para estudiar el proceso de adaptación de un segmento venoso en la circulación arterial, sin embargo, estos modelos solo han caracterizado procesos biológicos o fisiológicos de dicha adaptación. Un mejor entendimiento del proceso adaptativo en el injerto venoso permitiría conocer las características, mecanismos y moléculas participantes, a fin de establecer posibles blancos terapéuticos adecuados para tratar este padecimiento.

Por lo que se considera de gran importancia caracterizar los cambios morfológicos adaptativos que se presentan en un modelo murino de injerto venoso.

1.7 HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Se presentan cambios morfológicos adaptativos en la pared vascular de un segmento venoso femoral cuando se injerta en el lecho arterial femoral contralateral en ratas Wistar.

1.8 OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar un modelo microquirúrgico para el estudio de la respuesta morfológica adaptativa en la pared vascular de un segmento venoso injertado en un conducto arterial en ratas Wistar.

1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Implementar y estandarizar la técnica microquirúrgica de un segmento venoso femoral injertado en el conducto arterial homónimo contralateral.
2. Analizar los cambios morfológicos adaptativos presentes en el segmento venoso femoral injertado, a distintos tiempos.
3. Evaluar la presencia de proliferación celular en los elementos presentes y cambios en el músculo liso de la túnica media en el segmento venoso femoral injertado.
4. Evaluar la presencia de inducción de apoptosis en las muestras del segmento venoso femoral injertado, a distintos tiempos.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 Material.

2.1.1 Material biológico.

Para la realización de este proyecto se utilizaron ratas albinas de la cepa Wistar, adultos jóvenes, machos, con un peso entre 250 y 350 g. Las ratas fueron mantenidas en condiciones estándar de laboratorio, a 25 °C y ciclos de luz/oscuridad de 12 h c/u. Estos animales fueron proporcionados por el bioterio del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.1.2 Equipos e infraestructura utilizada.

- Microscopio quirúrgico Carl Zeiss OPMI pico 6S.
- Mesa de disección con drenaje e irrigación.
- Autoclave M7 SpeedClave (Midmark).
- Instrumental microquirúrgico (Fine Science Tools y Roboz) (Figura 4).
- Refrigerador Marvel Scientific modelo: 6CRF7100.
- Balanza EJ-1500 (AND).
- Lámpara de iluminación directa (tipo quirófano).
- Centro de inclusión Tissue Tek II.
- Microtomo Leica RM2235.
- Baño de flotación Fisher Scientific 26103 FS.
- Foto microscopio Nikon Eclipse 50i con cámara Nikon Digital Sight DS-2Mv y software NIS Elements.

- Sistema Millipore; desionizador y purificador de agua milli-Q modelo CDO F01205, con cartuchos de intercambio iónico de carbón y filtros de ésteres de celulosa (poro 0.22 μm) biológicamente inertes.
- Juego de pipetas semiautomáticas de 10, 20, 200 y 1000 μL Biopette A (Labnet International, Inc).
- Refrigerador Sanyo Medicoool, modelo MPR-414F.
- Estufa eléctrica Equiphos S.A.



Figura 4. Instrumental microquirúrgico utilizado en la cirugía de injerto venoso.

2.1.3 Reactivos.

Para los procedimientos quirúrgicos se utilizó: solución CS (cloruro de sodio, 0.9 %), Inhepar (heparina sódica, 1000 UI / mL), Anesket (ketamina, 100 mg / mL) y Penbacort (penicilina G procaínica, 200000 UI / mL; dihidroestreptomina, 250 mg / mL; flumetasona, 0.125 mg / mL) de marca PiSA. Sedaject (xilacina, 20 mg / mL) de Vedilab. Meliseptol[®] rapid y Softasept[®] N de B|Braun.

Los reactivos utilizados en este estudio fueron de alta calidad analítica. Paraformaldehído, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato monobásico y dibásico de sodio, fosfato monobásico de potasio y Tween 20 se adquirieron de Sigma Chemical Company (USA).

Ácido clorhídrico, yodato de sodio, sulfato de aluminio, ácido acético glacial, eosina amarillenta, hidróxido de amonio, hematoxilina anhidra, cloruro férrico, ácido fosfomolibdico, ácido fosfotúngstico e hidróxido de sodio se obtuvieron de Analytyka Tecnología Industrial Química (México).

Parafina, éter etílico, etanol, xilol, etilenglicol, metanol y peróxido de hidrógeno fueron de marca CTR Scientific (México). Escarlata de Biebrich de HYCEL de México (México). Fuscina ácida de MCB Manufacturing Chemical Inc. (USA). Azul de anilina de Eastman Kodak (USA). Ácido pícrico de B&A Specialty Chemical Divisions (USA). Resina sintética (Entellan) de Merck.

Para determinar la presencia de células en proliferación se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti PCNA (Dako, # cat: M 0879). Para demostrar la ubicación de células musculares se usó un anticuerpo monoclonal de ratón anti actina específica de músculo (Dako, # cat: M 0635). Se utilizó el kit de detección Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC (abcam, #cat: ab64264). Para evaluar la presencia de apoptosis se utilizó el kit TACS.XL[®] DAB *In Situ* Apoptosis Detection (Trevigen, # cat: 4828-30-DK).

2.1.4 Material consumible utilizado.

Guantes de látex, cubrebocas, batas quirúrgicas, jeringas de 1 y 5 mL, agujas, hojas de bisturí # 24, torundas de algodón, gasas e hisopos estériles, suturas Dafilon de 6-0 y 10-0 (B|Braun Aesculap), tubos Eppendorf de 0.7 y 1.5 mL, sistemas de venoclisis, portaobjetos y cubreobjetos.

2.2 Métodos.

2.2.1 Grupos experimentales.

Para este trabajo se utilizaron 20 ratas machos, adultos jóvenes de la cepa Wistar, con un peso entre 250 y 350 g las cuales se mantuvieron en una dieta estándar de laboratorio con agua *ad libitum* y condiciones de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Estas ratas fueron divididas en 4 grupos de 5 ratas cada uno. Cada grupo tuvo un tiempo de recuperación postquirúrgico distinto.

Un grupo se utilizó como control absoluto y no se le realizó cirugía de injerto. Al siguiente grupo se asignó un tiempo postquirúrgico de 1 día. El tercer grupo se dejó en recuperación hasta el día 3 postquirúrgico. Finalmente, el último grupo se dejó en observación hasta el día 5 postquirúrgico.

2.2.2 Estrategia experimental.

Después de realizar la cirugía de injerto venoso y una vez alcanzado el tiempo postoperatorio establecido, cada rata fue anestesiada y operada para extraer el injerto venoso. De cada grupo se obtuvieron muestras con una longitud de 6 a 8 mm y posteriormente se procesaron por la técnica histológica hasta su inclusión en bloques de parafina. En seguida se realizaron cortes de 5 μm para analizar la estructura general de vaso por la técnica de hematoxilina y eosina (H y E); también se realizaron tinciones de tricrómico de Masson (T M) para distinguir fibras elásticas y distinguir las tunicas. Por otra parte, se realizaron cortes de 4 μm para hacer inmunohistoquímicas contra PCNA para detectar proliferación celular y contra actina específica de músculo para detectar músculo liso. Finalmente se realizaron cortes de 7 μm para realizar la técnica TUNEL, para detectar apoptosis. En la figura 5 se muestra un diagrama que representa la estrategia experimental de este trabajo.

2.2.3 Modelo microquirúrgico de injerto venoso.

2.2.3.1 Procedimiento quirúrgico.

Cada rata se anestesió por vía intraperitoneal con ketamina y xilacina. Previa asepsia y rasurado de la región abdominal e inguinal, se procedió a disecar la arteria y vena femorales de ambas regiones inguinales. Del lado izquierdo se obtuvo el segmento venoso que se utilizó como injerto en la arteria femoral del lado derecho. Una vez obtenido el segmento venoso izquierdo se sumergió en solución salina heparinizada. Posteriormente, se colocaron los aproximadores vasculares en la arteria femoral derecha y se realizó una sección transversal para anastomosar el injerto venoso utilizando nylon 10-0 (Quiroga-Garza A, 2011).

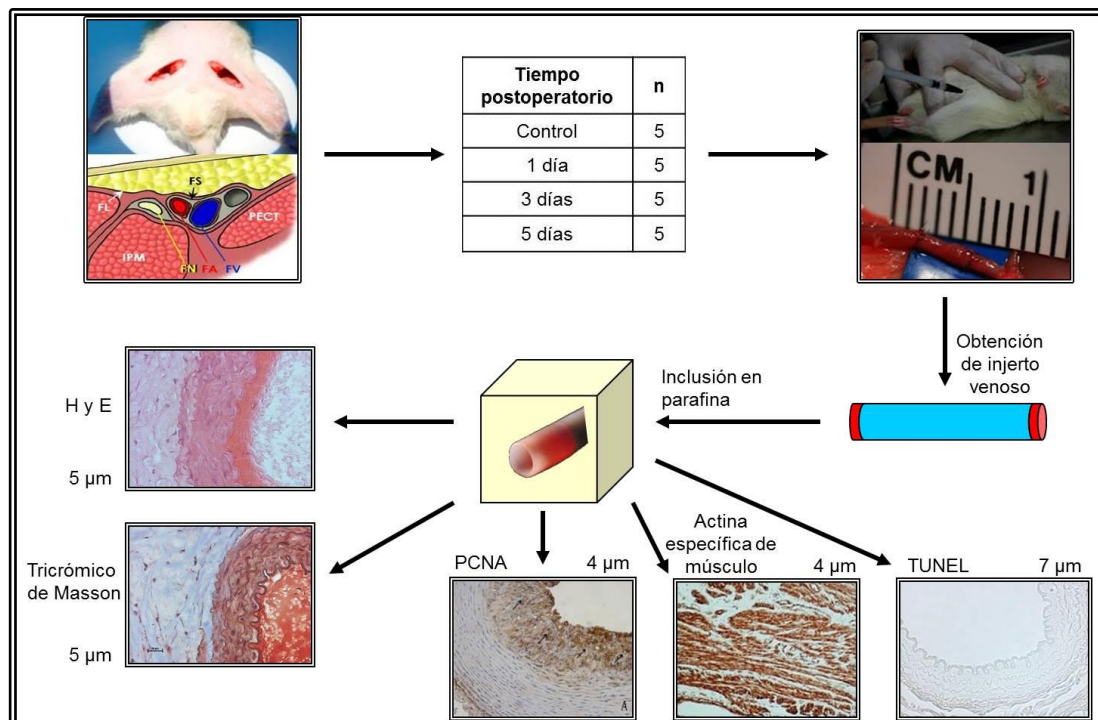


Figura 5. Esquema que ilustra la estrategia experimental utilizada para este estudio.

2.2.3.2 Obtención de la muestra.

Las ratas fueron operadas para extracción del injerto venoso a los días 1, 3 y 5 posquirúrgicos (5 ratas por grupo). También se obtuvieron muestras de segmentos venosos femorales (sin injertar). Solo se incluyeron las muestras de los injertos que fueron técnicamente satisfactorios. La técnica de obtención de muestras de injertos venosos se describe ampliamente en el Apéndice A.

2.2.3.3 Procesamiento de la muestra.

Después de obtener la muestra del segmento o injerto venoso femoral esta se sumergió en solución de formalina al 4 %. Posteriormente la muestra se procesó por la técnica histológica hasta incluirla en bloques de parafina. Esta técnica se detalla en el Apéndice B.

2.2.4 Análisis histológico.

2.2.4.1 Evaluación mediante microscopia de luz.

Después del procesamiento de las muestras mediante la técnica histológica y de ser incluidas en bloques de parafina, se obtuvieron cortes histológicos de 5 μ m y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) y con el método tricrómico de Masson (T M). Estas técnicas de tinción se describen con mayor detalle en el Apéndice C.

2.2.4.2 Morfometrías.

A los cortes teñidos con el método de tricrómico de Masson se les realizaron mediciones de las tunicas íntima y media. Esta técnica de tinción permite la identificación y diferenciación de las tunicas vasculares debido a la diferente tinción que adquiere de cada una de ellas.

2.2.5 Análisis inmunohistoquímico para identificar poblaciones de células en proliferación y células musculares.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales primarios específicos para la detección de células en proliferación, así como para la identificación de células musculares lisas. Se utilizó la tecnología LSAB+ System-HRP (Link-Streptavidin-Biotin+ System-Horseradish Peroxidase) de Dako® y los núcleos se contrastaron con hematoxilina. Se utilizaron como tejidos testigo cortes de colon para proliferación celular y cortes de lengua para células musculares. Como controles negativos se usaron cortes de cerebro para proliferación celular y cortes de hígado para células musculares. La técnica para la realización de este método inmunohistoquímico se detalla en el Apéndice D.

2.2.6 Método inmunohistoquímico de TUNEL para la demostración de la fragmentación de la cromatina.

Para realizar la técnica de TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling) (Gavrieli Y, 1992) se usó el kit TACS.XL® DAB *In Situ* Apoptosis Detection, de Trevigen®. Se incluyeron controles de técnica de acuerdo a las instrucciones del kit. Posteriormente estas muestras se analizaron mediante microscopía de luz. Los detalles para la realización de esta técnica se presentan en el Apéndice E.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS.

3.1 Procedimiento quirúrgico.

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (PISA, 82.5 mg/kg) y xilacina (Vedilab, 10 mg/kg) administradas por vía intraperitoneal; posteriormente se prepararon las zonas inguinales de la rata para cirugía, rasurando la región ventral y realizando lavado antiséptico con Softasept® N (B|Braun); se colocó a la rata y se sujetó en posición decúbito supino sobre una base previamente desinfectada con Meliseptol® rapid (B|Braun), colocando campos estériles a su alrededor.

Para evitar la formación de coágulos durante la cirugía las ratas fueron heparinizadas 30 min antes del procedimiento (PiSA, 250 UI/kg) (Sun J, 2012; Zhu ZT, 2011) por vía intraperitoneal.

Se realizó una incisión en cada región inguinal, en las extremidades caudales, siguiendo el eje mayor de la extremidad hasta 1 cm antes de alcanzar la zona poplítea; enseguida se disecó el tejido subcutáneo, por debajo de la piel, hasta alcanzar el paquete neurovascular femoral. En la extremidad caudal izquierda se identificó y se hicieron ligaduras en la vena femoral en un punto proximal a la vena circunfleja iliaca superficial, pero distal a la vena femoral profunda (Quiroga-Garza A, 2011) usando sutura de poliamida 6-0 (B|Braun Aesculap), dejando un segmento venoso de aproximadamente 8 mm, el cuál se seccionó y heparinizó, limpiando y retirando los coágulos e impurezas de la luz vascular.

En la extremidad caudal derecha se disecó el tejido subcutáneo y, en un plano más profundo, la arteria femoral. Una vez disecada la arteria se colocó 1 par de aproximadores vasculares para aislar su circulación en una pequeña zona, en donde se hizo una sección transversal de la arteria. Después se

procedió a injertar el segmento venoso femoral obtenido previamente en la arteria femoral de la extremidad derecha. Se realizaron 2 anastomosis termino-terminales (proximal y distal), para esto se colocó el extremo distal del segmento venoso en contacto con el extremo proximal de la arteria y viceversa. Las anastomosis se realizaron con sutura de poliamida 10-0 (B|Braun Aesculap) realizando 8 puntos de sutura simple dispuestos alrededor de la luz arterial. Una vez terminadas ambas anastomosis se retiraron los aproximadores vasculares para restablecer la circulación arterial, siempre había sangrado debido a la heparina administrada, pero este se controlaba presionando con un hisopo sobre las suturas durante un minuto. Después, se comprobaba que no persistiera fuga extensa de sangre entre los puntos de las anastomosis.

Enseguida se realizó una prueba de llenado para comprobar la permeabilidad del injerto. En esta prueba se pinzó a la arteria femoral en la porción proximal al injerto; después se drenó el injerto en dirección caudal, finalmente se liberó la circulación en el extremo proximal y se comprobó que hubiera llenado y pulso del injerto (prueba positiva). Por último, se suturó la piel de la rata con sutura de poliamida 6-0 (B|Braun Aesculap). Al final de la cirugía se monitoreó a la rata durante las siguientes 2 h para asegurar su completa recuperación de la anestesia, y en los días siguientes se le aplicaron dosis diarias de heparina (625 UI/kg) hasta el día de extracción del injerto.

En la figura 6 se presenta un esquema representativo de una cirugía de injerto venoso.

3.2 Análisis histológico.

Los resultados que se obtuvieron del análisis a microscopía de luz de los injertos venosos a los tiempos de 1, 3 y 5 días posquirúrgicos fueron comparados con los resultados obtenidos de los controles absolutos.

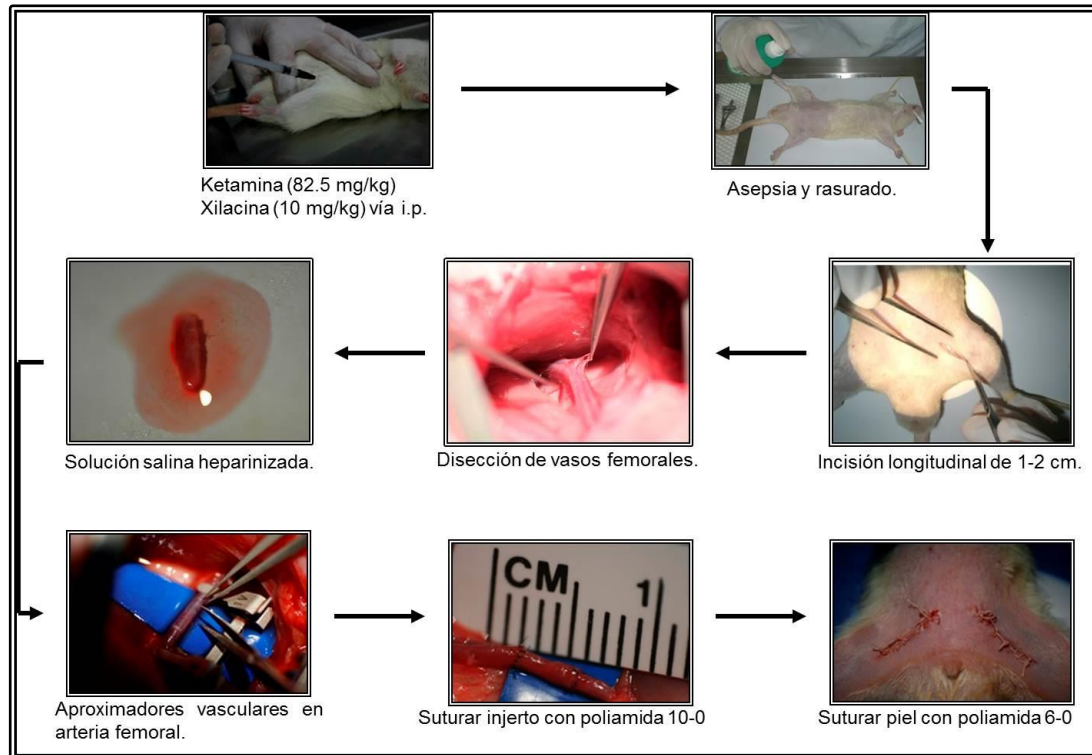


Figura 6. Esquema de las etapas de una cirugía de un segmento venoso femoral injertado en arteria femoral en una rata Wistar.

3.2.1 Hematoxilina y eosina.

Las muestras de segmentos venosos de ratas que no fueron sometidas a cirugías de injerto fueron utilizadas como controles absolutos para analizar la histología normal de los segmentos venosos femorales. En estas muestras pueden apreciarse algunas células endoteliales en contacto con la luz vascular, las cuales descansan sobre una lámina elástica interna bien definida. Se observa una túnica media delgada, típica de una vena, con presencia de células fusiformes y alargadas con núcleos ovalados, características de células musculares lisas, dispuestas alrededor de la luz vascular. La túnica adventicia en estas muestras se aprecia de grosor variable y desgarrada debido al proceso de disección que se hizo en cada una (Figura 7A).

Las muestras de los injertos venosos al tiempo de 1 día posquirúrgico presentaron un incremento notable en el grosor de sus túnicas, principalmente la media y la adventicia, comparadas con los controles. En estas muestras la

túnica íntima es difícil de percibir. En la túnica media se observan células musculares lisas, así como varias láminas elásticas bien definidas. La túnica adventicia muestra la presencia de infiltrado celular (Figura 7B).

Al tiempo de 3 días se observó un engrosamiento de las tunicas media y adventicia mayor que el tiempo de 1 día. Es difícil distinguir la túnica íntima. En la túnica media, las células musculares lisas parecen estar integras, sin embargo, las láminas elásticas en el interior de la túnica se muestran un poco desarregladas. En la túnica adventicia se observa un aumento en el número de células infiltrantes (Figura 7C).

Al día 5 posoperatorio las tunicas media y adventicia presentan un engrosamiento mayor que al tiempo de 3 días. No se distingue la túnica íntima. En la túnica media se observan pocos núcleos de células musculares lisas, las láminas elásticas han perdido su continuidad, se observan también células de infiltrado celular dispersas en esta túnica. Se observa un desarreglo general en la composición de ambas tunicas, los límites entre la túnica media y adventicia son difíciles de distinguir. En la túnica adventicia abunda la presencia de células infiltrantes (Figura 7D). En todos los tiempos analizados se detectó la presencia de líquido extracelular, encontrándose en mayor cantidad al día 5. Este líquido se observa como un agregado de tinción eosinófila, amorfo y acelular (Figura 8).

3.2.2 Tricrómico de Masson.

Las muestras de segmentos venosos femorales usados como controles se analizaron por la técnica de tricrómico de Massón, la cual permite distinguir fibras de colágeno. Estas muestras presentan sus tunicas media y adventicia bien definidas, observándose la túnica media con una coloración roja brillante debido a la presencia de células musculares lisas, por otra parte, la adventicia presenta una coloración azul, indicativa de la presencia de fibras de colágeno (Figura 9A).

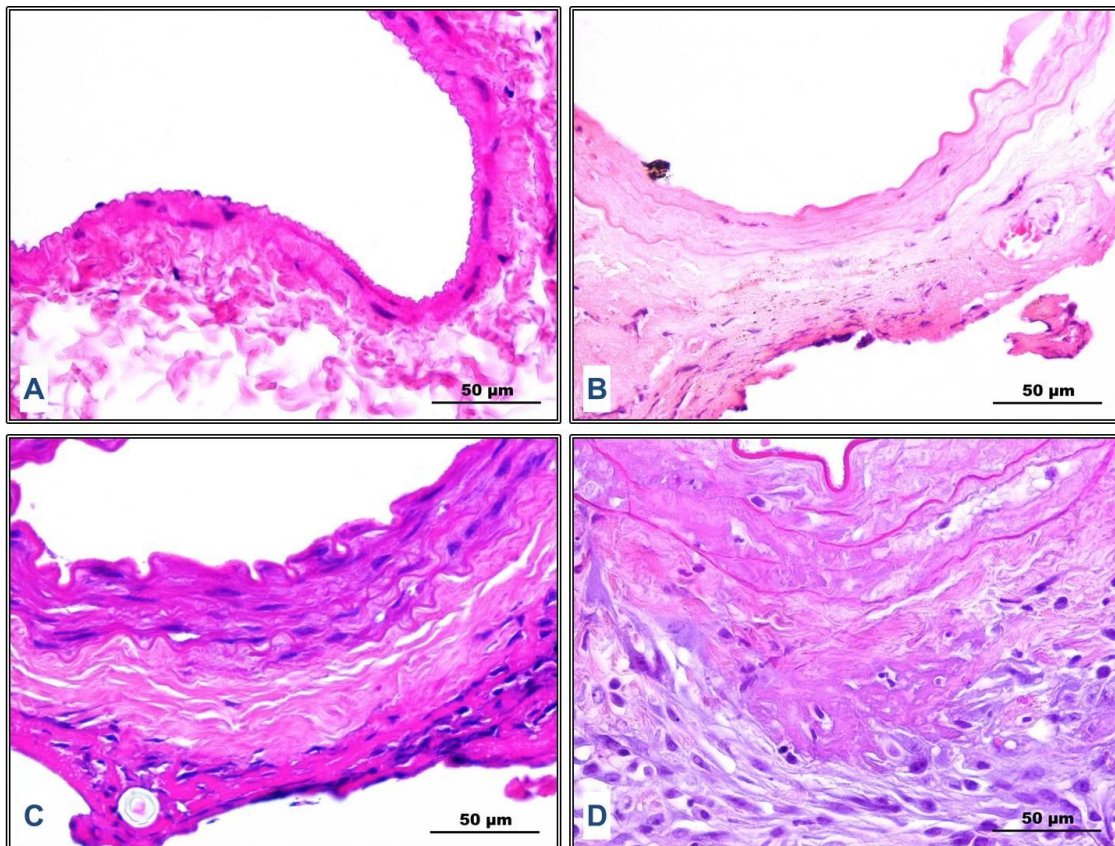


Figura 7. Estructura general de injertos venosos femorales. A) Control absoluto: células endoteliales apoyadas en una lámina elástica interna bien definida. Túnica media delgada con células fusiformes y alargadas con núcleos ovalados. Túnica adventicia de grosor variable y desgarrada. B) Injerto 1 día: incremento en grosor de la media y adventicia. Se observa infiltrado celular en la adventicia. C) Injerto 3 días: engrosamiento mayor que a 1 día. En la adventicia hay aumento en número de células infiltrantes. D) Injerto 5 días: La media y adventicia tienen engrosamiento mayor que a 1 y 3 días. En la media se observan células infiltrantes dispersas. Se observa un desarreglo general de la media y la adventicia. En ningún tiempo se puede distinguir la túnica íntima. Fotomicrografías de luz. H y E. 40x.

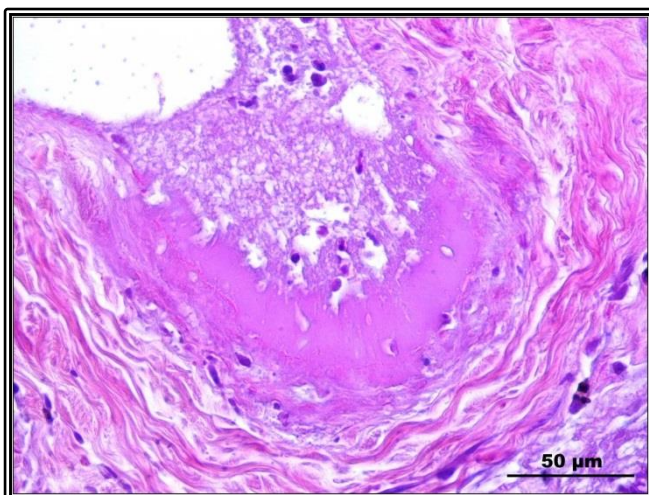


Figura 8. Líquido extracelular. Se observó en los cortes de injertos de 1, 3 y 5 días posquirúrgicos, aunque en mayor cantidad hacia el día 5. Se observan también células de infiltrado celular. Fotomicrografía de luz. H y E. 40x.

Al observar las muestras de injerto de 1 día posquirúrgico se pudo observar un desarreglo general en la composición de las tunicas, donde no se distinguen los límites entre estas. Se alcanzan a distinguir algunos núcleos de células infiltrantes en la zona que correspondería a la adventicia (Figura 9B).

Al tiempo de 3 días posquirúrgicos se mantiene desordenada la composición de las tunicas, y destaca el aumento de núcleos correspondientes a células infiltrantes en la adventicia (Figura 9C).

Hacia el tiempo de 5 días, las tunicas de la pared vascular del injerto están completamente desordenadas, los núcleos de células infiltrantes llegan ahora hasta la túnica media (Figura 9D).

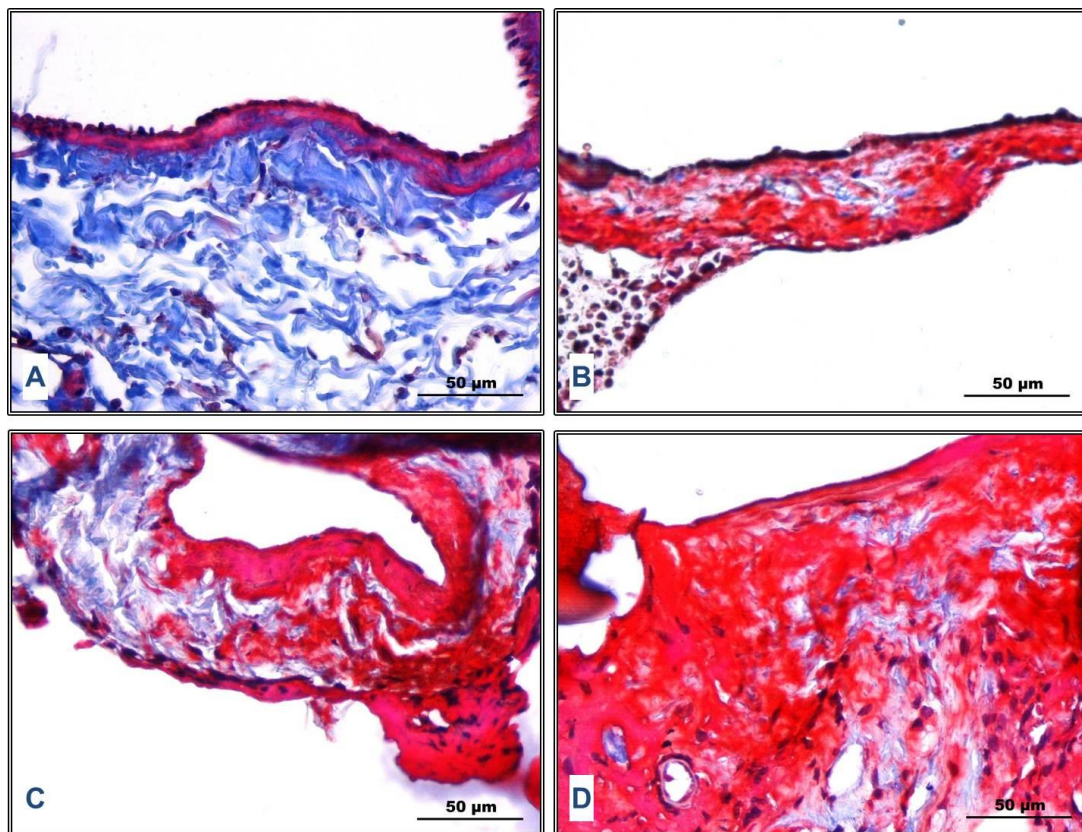


Figura 9. Disposición de tunicas de injertos venosos femorales. A) Control absoluto: tunicas media y adventicia bien definidas. La media es pequeña y se tiñe de color rojo brillante, la adventicia, más gruesa de color azul. B) Injerto 1 día: desarreglo en composición de las tunicas. Hay presencia de algunas células infiltrantes en la adventicia. C) Injerto 3 días: aumenta el desorden de las tunicas y el número de células infiltrantes. D) Injerto 5 días: aumenta el desarreglo de las tunicas, hay células infiltrantes en la túnica media. Fotomicrografía de luz. Tricrómico de Masson. 40x.

3.2.3 Morfometrías.

A los cortes teñidos con tricrómico de Masson se les realizaron morfometrías para medir las tunicas media y adventicia. En los controles absolutos la media del grosor de la túnica íntima fue de 16.52 μm (DE= 2.11 μm , rango= 14.16-19.59 μm), en la túnica media fue de 37.30 μm (DE= 4.53 μm , rango = 33.04-42.35 μm). El grosor total de la pared vascular incluyendo tunicas íntima y media fue de 49.90 μm (DE= 2.45, rango= 47.20-52.94 μm).

En las muestras de injertos venosos el grosor de la túnica íntima presentó una media de 19.13 μm (DE= 4.13 μm , rango= 18.49-23.87 μm), la túnica media presentó un promedio de 26.28 μm (DE= 7.48 μm , rango= 19.79- 38.80 μm). El grosor de la pared vascular incluyendo tunicas íntima y media fue de 51.18 μm (DE=14.53 μm , rango= 33.42-72.16 μm).

En el día 3 postoperatorio se encontró que la túnica íntima presentó un grosor promedio de 29.48 μm (DE= 12.79 μm , rango= 10.71- 48.78 μm), con una túnica media de 34.30 μm de grosor promedio (DE= 9.77 μm , rango= 22.32- 39.8 μm). El grosor de la pared vascular total, incluyendo tunicas íntima y media fue de 63.78 μm (DE= 21.04 μm , rango= 33.03-88.58 μm).

Al día 5 postoperatorio la media de grosor de la túnica íntima fue de 31.51 μm (DE= 10.09 μm , rango= 22.53-39.23 μm) el grosor de la túnica media fue de 43.43 μm (DE= 14.02 μm , rango=29.84- 71.11 μm). El grosor de la pared vascular total fue de 74.94 μm (DE= 24.47 μm , rango= 57.66-110.34 μm).

Los resultados de estas morfometrías se resumen en la Tabla 1.

Muestra	Túnica íntima	Túnica Media	Grosor Total
Control absoluto	16.52 ± 2.11	37.30 ± 4.53	49.90 ± 2.45
Injerto 1 día	19.13 ± 4.13	26.28 ± 7.48	51.18 ± 14.53
Injerto 3 días	29.48 ± 12.79	34.30 ± 9.77	63.78 ± 21.04
Injerto 5 días	31.51 ± 10.09	43.43 ± 14.02	74.94 ± 24.47

Tabla 1. Morfometrías de la pared del injerto venoso a los días 0 (control), 1, 3, y 5. Los valores presentados corresponden a la media de un grupo de 5 injertos venosos más su desviación estándar. Estos resultados se presentan en micrómetros.

3.3 Análisis inmunohistoquímico para identificar poblaciones de células en proliferación y células musculares.

3.3.1 Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA).

A los injertos venosos así como a los controles se les realizaron métodos inmunohistoquímicos para detectar la presencia del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (o PCNA, por sus siglas en inglés) el cual es indicativo de células en proliferación.

Se utilizaron como testigos positivos de proliferación celular cortes de colon de rata, en los cuales se puede apreciar el marcaje positivo en los núcleos color marrón en las células de las criptas de Lieberkühn (Figura 10A). Como control negativo de la técnica inmunohistoquímica se usaron cortes de cerebro, en los cuales no se encontraron indicios de proliferación celular (Figura 10B).

Al analizar los controles absolutos de segmentos venosos femorales (no injertos) no se encontraron indicios de proliferación celular (Figura 10C). Sin embargo, en los injertos venosos de 1 día posquirúrgico se encontraron escasas células positivas para esta prueba en la región correspondiente a la túnica adventicia (Figura 10D). El número de células en proliferación aumentó

notablemente hacia el día 3 posquirúrgico, encontrándose células positivas tanto en la túnica adventicia, como en la media (Figura 10E). Hacia el día 5 posquirúrgico aparentemente disminuyó el número de células positivas para proliferación, ya que solo se encontraron algunas de estas en la región de la adventicia (Figura 10F).

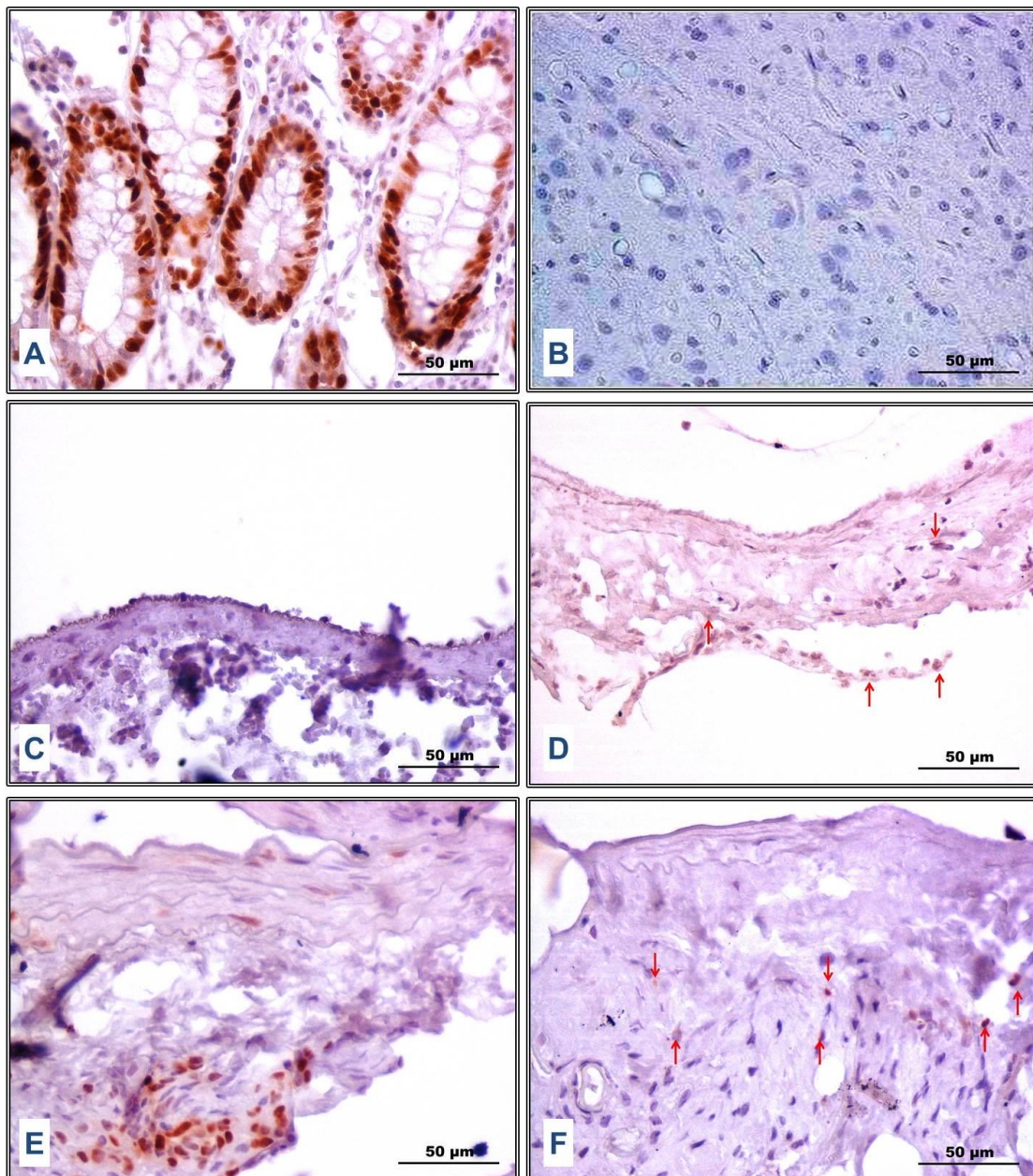


Figura 10. Proliferación celular en injertos venosos. A) Testigo positivo: colon. B) Control negativo: Cerebro. C) Control absoluto (segmento venoso femoral): negativo. D) Injerto 1 día: escasas células positivas en región de la adventicia. E) Injerto 3 días: aumento de células en proliferación en íntima y adventicia. F) Injerto 5 días: disminución de células en proliferación, algunas células presentes en la adventicia. Fotomicrografías de luz. Inmunohistoquímica PCNA. 40x.

3.3.2 Actina específica de músculo.

Se realizaron técnicas inmunohistoquímicas para la detección de actina específica de músculo, la cual es indicativa de células musculares, de tipo liso en el caso de los injertos venosos.

Como testigos positivos se utilizaron cortes de lengua de rata en donde se puede distinguir la positividad de esta prueba al observar el citoplasma de las células con una coloración marrón (Figura 11A). Como control negativo se usaron cortes de hígado, no se encontró la presencia de células musculares en el parénquima hepático (Figura 11B).

Los controles absolutos de los segmentos venosos femorales mostraron positividad a esta prueba inmunohistoquímica observándose una franja delgada, distribuida homogéneamente en la pared vascular, correspondiente a la zona de la túnica media (Figura 11C).

En los injertos venosos de 1, 3 y 5 días se demostró positividad para células musculares en la zona de la túnica media, sin embargo, en esta misma zona también se encontraron zonas desprovistas de actina. Cabe mencionar que en sitios cercanos a las regiones desprovistas de actina se encontró la presencia de células infiltrantes (Figuras 11D, E, F).

3.4 Método inmunohistoquímico de TUNEL para la demostración de la fragmentación de la cromatina.

Como control positivo se utilizaron cortes de hígado tratados con nucleasa para inducir la fragmentación del DNA. Se puede distinguir la positividad de esta prueba al observar una coloración marrón en los núcleos de las células (Figura 12A). Como control negativo se utilizaron cortes de hígado a los cuales se les sustituyó la enzima TdT por agua destilada (Figura 12B).

Al analizar los controles absolutos, así como las muestras de injertos venosos a los días 1, 3, y 5 con la técnica de TUNEL, no se observó positividad a la fragmentación de la cromatina, que es un fenómeno que ocurre durante la apoptosis (Figuras 12C, D, E, F).

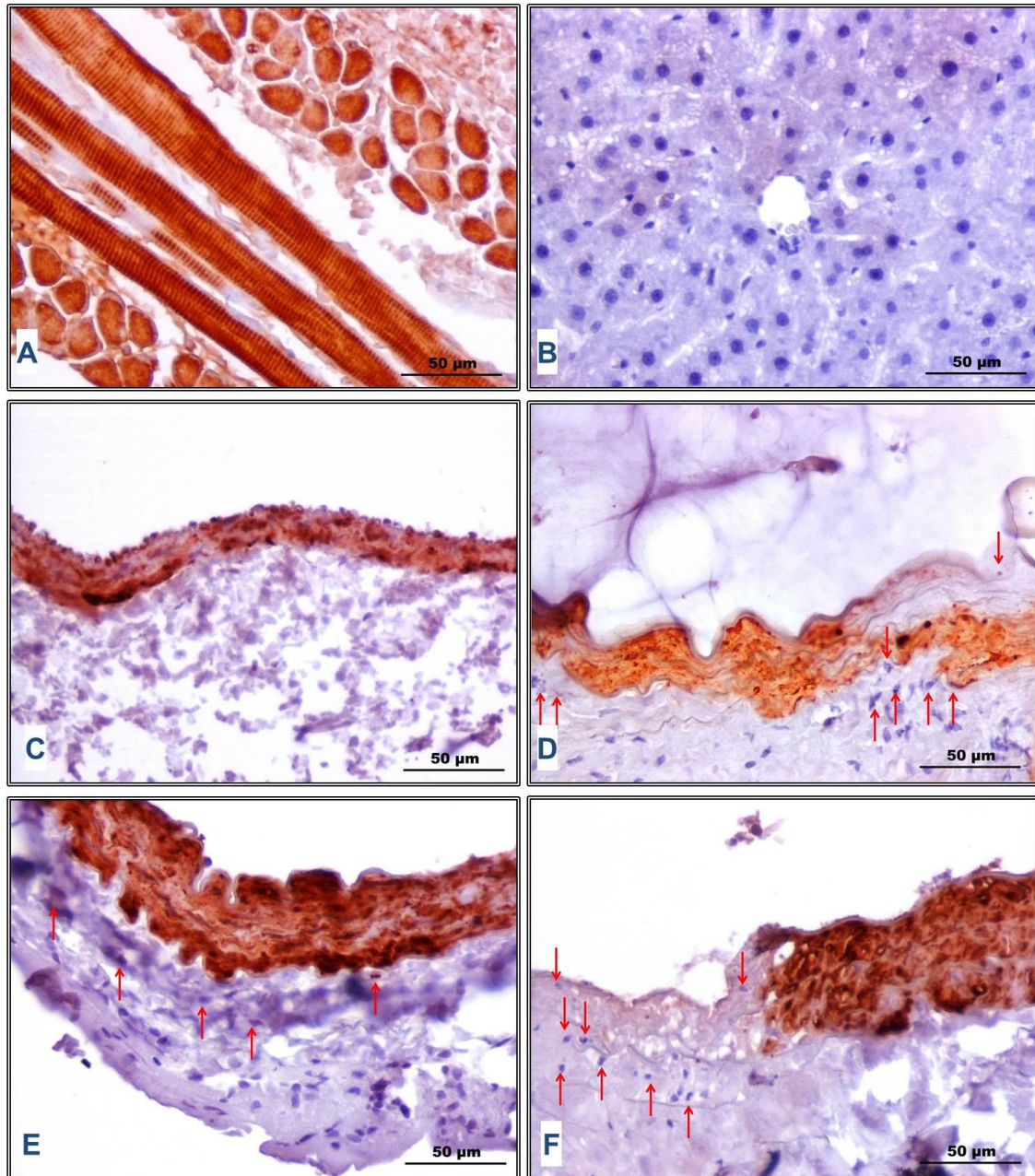


Figura 11. Células musculares lisas en injertos venosos. A) Testigo positivo: Lengua. B) Control negativo: Hígado. C) Control absoluto (segmento venoso femoral): positividad homogénea en la pared vascular de la túnica media. D, E, F) Injertos venosos de 1, 3 y 5 días muestran positividad para células musculares en la túnica media. Existen zonas desprovistas de actina en todos los tiempos analizados, en sitios cercanos a estas zonas se encontró la presencia de células infiltrantes (flechas). Fotomicrografía de luz. Inmunohistoquímica actina. 40x.

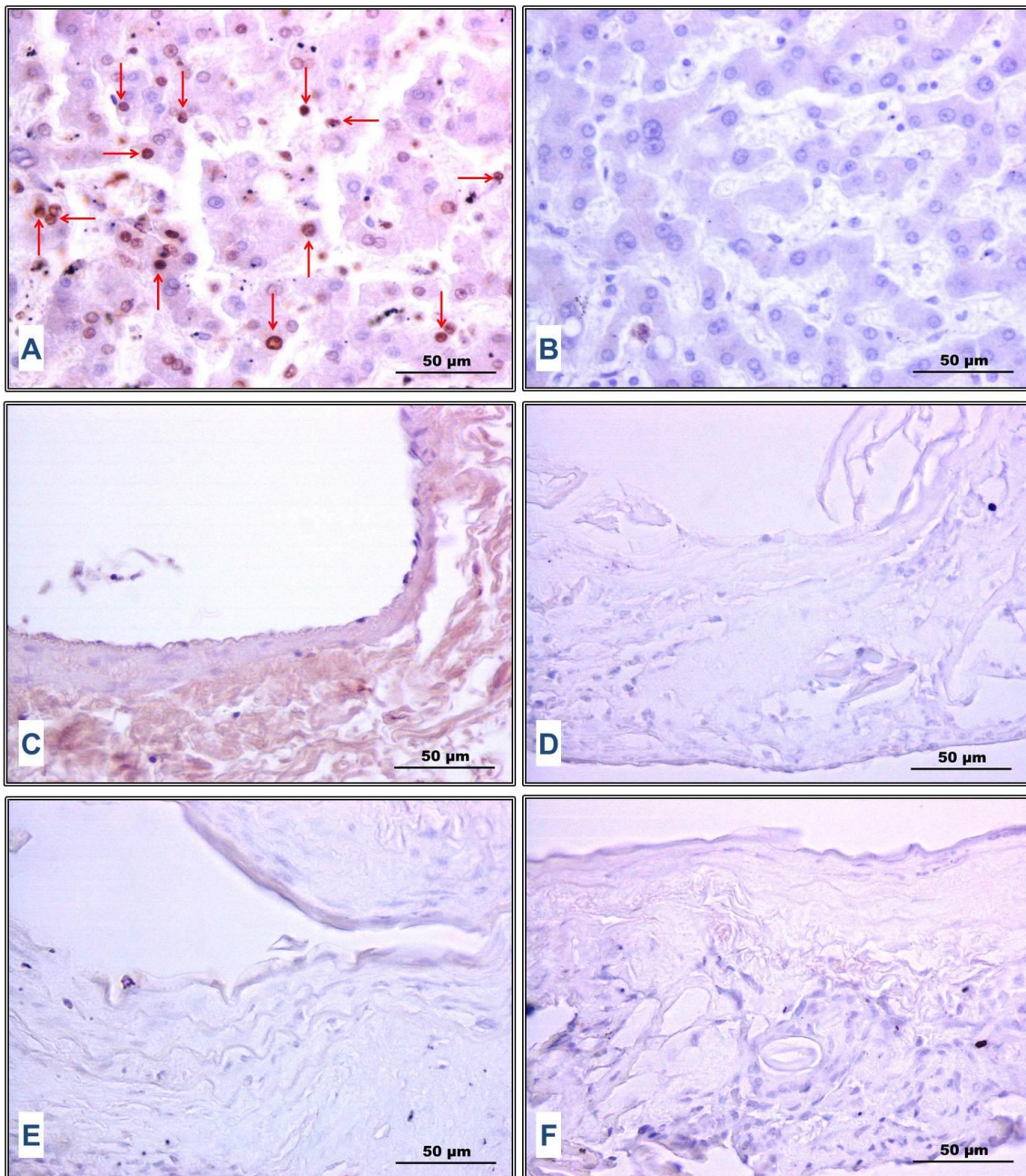


Figura 12. Apoptosis en injertos venosos. A) Control positivo: Hígado tratado con nucleasa. Se observan núcleos positivos a la fragmentación de la cromatina (flechas). B) Control negativo: Hígado tratado sin la enzima TdT. Se observan núcleos negativos. C) Control absoluto (segmento venoso femoral): Negativo. D, E, F) injertos venosos a los días 1, 3 y 5 posquirúrgicos: Negativos. Fotomicrografías de luz. TUNEL. 40x.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron identificar alteraciones en la estructura de la pared vascular de los injertos venosos a diferentes tiempos de estudio, por lo tanto, se acepta la hipótesis de trabajo establecida: “Se presentan cambios morfológicos adaptativos en la pared vascular de un segmento venoso femoral cuando se injerta en el lecho arterial femoral contralateral en ratas Wistar”.

En este estudio se establecieron modificaciones y se realizó la caracterización del modelo microquirúrgico de injerto venoso en ratas de cepa Wistar establecido por Quiroga-Garza y cols. en 2011. En este modelo experimental se analizó la estructura, composición y alteraciones morfológicas de segmentos venosos femorales injertados en la arteria femoral contralateral de las ratas, y se colectaron estos injertos una vez que se alcanzaron los tiempos de 1, 3 ó 5 días posquirúrgicos.

El desarrollo, mejora y caracterización de este modelo animal de estudio tiene una implicación importante en el estudio de la respuesta adaptativa e hiperplasia de la túnica íntima de los injertos venosos, esta última, considerada la causa más importante del fracaso de estos (Cooper GJ, 1996). Un mejor entendimiento de estos procesos en el injerto venoso permitiría conocer las características, mecanismos y moléculas participantes, a fin de establecer posibles blancos terapéuticos adecuados para tratar este padecimiento.

Existen diversos modelos animales para el estudio de la respuesta adaptativa en conductos vasculares (Schachner T, 2006) (Tabla 2). Estos presentan algunas características comunes a lo que ocurre en los humanos (apoptosis y proliferación de células musculares lisas en injertos venosos, respuesta inflamatoria) (Motwani JG, 1998; Lidman D, 1981).

Sin embargo, los procedimientos quirúrgicos varían de un modelo a otro y no se ejecutan de igual manera a como ocurre en una cirugía de injerto vascular (Zou Y, 1998; Kwei S, 2004; Cooley BC, 2004). El modelo de Kwei y cols. consistió en una anastomosis término-lateral de vena yugular externa con la arteria carótida común. Por otra parte, Zou (1998) realizó anastomosis termino-terminales de un segmento venoso (vena yugular externa autóloga, vena yugular heteróloga y vena cava) en la arteria carótida.

Animal:	Vena donadora:	Arteria receptora:
Cerdo Perro	Safena Mayor	Carótida Común
Cerdo Conejo Perro Rata Ratón	Yugular	Carótida Común
Cerdo	Mamaria Interna	Descendente Anterior Izquierda
Perro	Femoral	Femoral
Perro	Yugular	Femoral
Rata	Cava Inferior	Aorta Abdominal
Rata	Superficial Epigástrica	Femoral
Rata	Ileolumbar	Aorta Abdominal
Ratón	Cava Inferior	Carótida Común
Ratón	Yugular Externa	Aorta Infrarrenal
Mono rhesus	Femoral	Femoral
Oveja	Radial	Carótida Común

Tabla 2. Algunos de los modelos animales utilizados para el estudio de la respuesta adaptativa de conductos vasculares (Cooper GJ, 1996).

En el modelo utilizado para esta investigación se realizaron 2 anastomosis termino-terminales de un segmento de vena femoral autóloga en la arteria femoral contralateral a donde se obtuvo el segmento venoso. Este modelo presenta 3 características importantes: 1) Un adecuado calibre, con una proporción vena:arteria de 1.5:1 aproximadamente. 2) Fácil acceso y manipulación del injerto, ya que los vasos femorales se localizan fácilmente al disecar el tejido subcutáneo de la ingle. 3) semejanza en composición morfológica con el humano.

La fuerza de tensión del nudo de sutura afecta la capacidad del tejido para soportar una lesión (o desgarró). Otros factores que afectan la fuerza del tejido

son: el espesor del tejido, la presencia de edema y la induración (grado de endurecimiento del tejido en respuesta a la presión o lesión). Una de las modificaciones realizadas al modelo microquirúrgico presentado por Quiroga-Garza (2011) consistió en reducir el número de suturas simples de 12 a 8 puntos de sutura alrededor de cada anastomosis (suficientes para mantener la permeabilidad del injerto y evitar sangrados), esta modificación se hizo con el propósito de disminuir el riesgo de desgarros a causa de debilidad en la pared vascular del injerto venoso.

En condiciones normales, las plaquetas circulantes no muestran tendencia a adherirse entre sí o a las paredes del vaso, pero cuando entran en contacto con las fibras de colágeno de la pared vascular estas se activa la cascada de coagulación, aumentando el número de plaquetas y expresando receptores para fibrinógeno y formando agregados con fibrinógeno y con otras plaquetas, llevando a la formación de placas tromboticas que pueden progresar hasta la formación de coágulos (Geneser F, 2000). Debido a que al finalizar la cirugía de injerto venoso hay exposición de fibras colágenas de la pared vascular con las plaquetas circulantes en la zona de las anastomosis, se estableció una terapia administrando heparina como anticoagulante (St André AC, 2005) 30 minutos antes de cada cirugía y posteriormente cada día, hasta el momento de extraer el injerto para su análisis. Esta nueva modificación al modelo establecido por Quiroga-Garza (2011) se hizo con el propósito de disminuir la posibilidad de formación de coágulos en la zona de las anastomosis, aumentando las posibilidades de éxito de la cirugía.

Por otra parte, en los estudios morfológicos analizados a microscopía de luz, los segmentos venosos (controles) así como los injertos venosos mostraron una túnica íntima escasa y con muy pocas células endoteliales revistiendo la luz vascular; se ha reportado que existe pérdida del endotelio en los segmentos venosos debido al trauma mecánico que se produce por la manipulación de la vena durante la disección, previo a la inserción en la cirugía de revascularización. Pero también existen otros factores que pueden provocar la pérdida del endotelio, como son: la hipoxia que experimenta el segmento venoso durante el tiempo que dura la cirugía, así como la isquemia-reperusión

que ocurre cuando se libera la circulación arterial por el segmento venoso (Schachner T, 2006).

En estudios realizados con microscopía electrónica de transmisión se ha reportado que entre 1 y 4 horas posteriores a la cirugía de injerto hay evidencia de daño endotelial con pérdida celular, y la lámina elástica interna se observa como una línea discontinua y amorfa de elastina (Stark VK, 1997), en este estudio también se afirma que la íntima comienza a incrementar su área hasta las 6 semanas posquirúrgicas. Esto explicaría por qué se dificulta mucho la observación de la túnica íntima a los tiempos de 1, 3 y 5 días posquirúrgicos.

El análisis de los injertos venosos confirmó también un aumento gradual en el grosor y un desarreglo en la organización de los componentes de las túnicas media y adventicia desde el día 1 hasta el 5 posoperatorio. Este aumento en el grosor de las túnicas media y adventicia puede ser debido a la migración y proliferación de células musculares o sus precursores hacia la pared vascular del injerto (Diao Y, 2008; Hu Y, 1999).

Es probable que la desorganización gradual en la composición de las túnicas media y adventicia esté relacionada con la actividad de las enzimas metaloproteinasas 2 y 9, las cuales degradan colágeno y elastina (Lessner SM, 2004) para permitir el libre tráfico de células musculares lisas a través de la matriz extracelular desde la adventicia y la media en dirección hacia la neo-íntima (Mavromatis K, 2000).

En todos los tiempos posquirúrgicos analizados se reportó la presencia de células infiltrantes al día 1 y 3 en la túnica adventicia y, se encontró que al día 5 posoperatorio estas células se encontraban presentes en la túnica media.

La presencia de estas células infiltrantes desde el día 1 posoperatorio así como el hallazgo de líquido extracelular encontrado en las muestras de todos los tiempos estudiados (Figura 8) sugiere la existencia de un proceso inflamatorio en la pared vascular, el cual estaría influyendo directamente en el

engrosamiento de las túnica media y adventicia del injerto venoso a estos tiempos posquirúrgicos.

Los resultados del presente trabajo mostraron que desde el tiempo de 1 día posoperatorio había células en proliferación en la pared vascular del injerto, lo que coincide con los resultados presentados por Kalra y cols. en 2000 y Kwei S. en 2004, que reportan la presencia de nuevas células musculares lisas dentro de las primeras 24 a 36 horas posteriores a la cirugía de revascularización. En las muestras de injerto analizadas se pudo observar que la localización de las células en proliferación al día 1 posoperatorio era en el área que corresponde a la túnica adventicia, posteriormente a los días 3 y 5 se encontraron estas células en las túnica media y adventicia; esto sugiere que las células además de proliferar, también se encuentran en migración dirigiéndose al sitio donde se regenerará la túnica íntima (Kalra M, 2000).

Al analizar por métodos inmunohistoquímicos el patrón de distribución de las células musculares lisas en busca de alteraciones morfológicas se encontró que, en los tiempos analizados de 1, 3 y 5 días, estas células se encuentran confinadas únicamente a la túnica media. Sin embargo, llamó la atención el hallazgo de zonas en la túnica media que no presentaban positividad para la actina (Figura 11). Al revisar con más detalle estas zonas se observó que, en las cercanías a estas zonas sin actina, había dispersas células infiltrantes, las cuales, como se mencionó anteriormente son indicativas de un proceso inflamatorio. La presencia de zonas desprovistas de positividad para la actina en la túnica media de los injertos venosos probablemente sea causada por un enmascaramiento de los antígenos de actina debido a la presencia de líquido extracelular en las muestras, con lo cual se evitaría la reacción antígeno-anticuerpo y su posterior revelado.

Los resultados de los experimentos para la demostración de apoptosis, mostraron que a los tiempos tempranos de 1, 3 y 5 días posoperatorios no hay positividad para la fragmentación de la cromatina en las células de la pared vascular de los injertos venosos. Estos resultados sugieren que, a tiempos posquirúrgicos tempranos, como los analizados en este trabajo, existe más

proliferación celular (y posiblemente migración) en las tunicas media y adventicia de la pared vascular de los injertos, y a tiempos más largos ocurre la activación de la apoptosis.

Si bien es cierto que la hiperplasia de la túnica íntima es considerada la causa principal del fracaso del injerto vascular, en modelos animales de estudio ésta se hace evidente aproximadamente a la primer semana posquirúrgica (Diao Y, 2005). Además, las investigaciones dirigidas al estudio de la hiperplasia de la túnica íntima suelen enfocarse en tiempos experimentales largos (a partir de semanas o meses después de la cirugía) y nunca a tiempos cortos. Los resultados mostrados en este proyecto se enfocaron en tiempos posquirúrgicos más cortos de los que suele manejar la literatura y mostraron que las principales alteraciones morfológicas ocurren no en la túnica íntima, si no en las tunicas media y adventicia de los injertos venosos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

5.1 Conclusiones.

1. El modelo microquirúrgico de injerto vascular termino-terminal de vena femoral en arteria femoral presenta cambios morfológicos adaptativos en su pared vascular.
2. Los eventos más importantes a tiempos experimentales cortos de 1, 3 y 5 días posquirúrgicos ocurrieron en las tunicas media y adventicia de los injertos.
3. Estos cambios morfológicos se caracterizan por la presencia de infiltrado celular y líquido extracelular en algunas regiones de la pared vascular de los injertos, así como un engrosamiento de sus tunicas media y adventicia a partir del día 1 posoperatorio.
4. Hay presencia de células en proliferación en la adventicia de los injertos a partir del día 1 postoperatorio. Al día 3 las células proliferantes están presentes tanto en la túnica media como en la adventicia.
5. En este modelo experimental no se encontraron células en apoptosis en los injertos venosos a los tiempos posquirúrgicos de 1, 3 y 5 días.

5.2 Perspectivas.

1. Identificar los tipos celulares presentes en el infiltrado celular en los injertos venosos.
2. Determinar los tipos celulares que presentan positividad para el marcador de proliferación (PCNA).
3. Caracterizar los cambios morfológicos en este modelo a tiempos experimentales más largos (7, 14 y 21 días).
4. Analizar el efecto del silenciamiento de genes relacionados con el desarrollo de la hiperplasia de la íntima sobre los cambios adaptativos del injerto venoso (Landen Jr CN, 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Acar C., Ramsheyi A., Pagni J.Y., Jebara V., Barrier P., Fabiani J.N., Deloche A., Guermonprez J.L., Carpentier A. The radial artery for coronary artery bypass grafting: clinical and angiographic results at five years. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1998; 116: 981-989.
2. Aguirre-Rivero R. *Tratado de Cirugía General*. 1^a Edición. Editorial El Manual Moderno. 2003.
3. Bäck M., Bu D.X., Bränström R., Sheikine Y., Yan Z.Q., Hansson G.K. Leukotriene B4 signaling through NF-kappaB-dependent BLT1 receptors on vascular smooth muscle cells in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005; 102: 17501-17506.
4. Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani F., Redard M., Desmoulière A., Gabbiani G. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 1059-1064.
5. Buxton B.F., Chan A.T., Dixit A.S., Eizenberg N., Marshall R.D., Raman J.S. Ulnar artery as a coronary bypass graft. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 65: 1020-1024.
6. Campeau L., Enjalbert M., Lespérance J., Vaislic C., Grondin C.M., Bourassa M.G. Atherosclerosis and late closure of aortocoronary saphenous vein grafts: sequential angiographic studies at 2 weeks, 1 year, 5 to 7 years, and 10 to 12 years after surgery. *Circulation.* 1983; 68: II 1-7.
7. Clause B.T. The Wistar Institute Archives: rats (not mice) and history. *Mendel Newsl.* 1998; 7: 2-7.
8. Cooley B.C. Murine model of neointimal formation and stenosis in vein grafts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1180-1185.
9. Cooper G.J., Underwood M.J., Deverall P.B. Arterial and venous conduits for coronary artery bypass. A current review. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 1996; 10: 129-140.
10. Cooper R., Cutler J., Desvigne-Nickens P., Fortmann S.P., Friedman L., Havlik R., Hogelin G., Marler J., McGovern P., Morosco G., Mosca L., Pearson T., Stamler J., Stryer D., Thom T. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the

- United States: findings of the national conference on cardiovascular disease prevention. *Circulation*. 2000; 102: 3137-3147.
11. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. *Patología estructural y funcional*. 5^a Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España 1995: 580.
 12. Dallan L.A., de Oliveira S.A., Lisboa L.A., Platania F., Jatene F.B., Iglesias J.C., Filho C.A., Cabral R., Jatene A.D. Complete myocardial revascularization using arterial grafts. *Heart. Surg. Forum*. 2001; 4: 179-183.
 13. De Juan-Herráez V., Martín-Herranz R., López-Gálvez M.I. ¿Qué es un modelo animal? *Gaceta Óptica*. 2004; 382: 20-24.
 14. Diao Y., Guthrie S., Xia S.L., Ouyang X., Zhang L., Xue J., Lee P., Grant M., Scott E., Segal M.S. Long-term engraftment of bone marrow-derived cells in the intimal hyperplasia lesion of autologous vein grafts. *Am. J. Pathol*. 2008; 172: 839-848.
 15. Dumanian G.A., Segalman K., Mispireta L.A., Walsh J.A., Hendrickson M.F., Wilgis E.F. Radial artery use in bypass grafting does not change digital blood flow or hand function. *Ann. Thorac. Surg*. 1998; 65: 1284-1287.
 16. Elizondo-Omaña R.E. Empleo de polidioxanona, polipropileno o seda como materiales de sutura en anastomosis termino-terminal en arterias muscular, elástica o vena. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L., 2008.
 17. Elizondo-Omaña R.E., García-Rodríguez M.A., Morales-Gómez J.A., Guzmán-López S., Tijerina-de la Garza O., Fernández Rodarte B., Montemayor-Flores M.L., Herrera-Meléndez J. Conductos vasculares utilizados en la operación de revascularización miocárdica. *Medicina Universitaria*. 2005; 7: 222-225.
 18. Friedl R., Li J., Schumacher B., Hanke H., Waltenberger J., Hannekum A., Stracke S. Intimal hyperplasia and expression of transforming growth factor-beta1 in saphenous veins and internal mammary arteries before coronary artery surgery. *Ann. Thorac. Surg*. 2004; 78: 1312-1318.
 19. Gartner L.P., Hiatt J.L. *Texto y Atlas de Histología*. 2^a Edición. Editorial Mc Graw Hill. México, D.F. 2002: 243-245.

20. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 1992; 119: 493-501.
21. Geneser F. *Histología*. 3^a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2000: 242-243, 391.
22. González-Santos J.M., López-Rodríguez J., Dalmau-Sorlí M.J. Arterial grafts in coronary surgery. Treatment for everyone?. *Rev. Esp. Cardiol.* 2005; 58: 1207-1223.
23. Hifny M., El-Shazly M., El-Osaily M., El-Otiefy M. Histo-pathologic spectrum in the different methods of arterial microvascular anastomoses: an experimental study in the rat femoral artery. *J. Chinese Clin. Med.* 2007; 2: 661-666.
24. Hinojosa-Amaya J.M., Elizondo-Omaña R.E., García-Rodríguez M.A., Morales-Gómez J.A., Guzmán-López S., Montemayor-Flores M.L., Herrera-Meléndez J. Características anatómicas de la arteria cubital: longitud, diámetro y ramos musculares. *Medicina Universitaria*. 2005; 7: 67-70.
25. Hinojosa-Amaya J.M., Villarreal-Silva E.E., Elizondo-Omaña R.E., Gutiérrez-de la O J., Dávila-Canales R., González-Cantú A., Fernández-Zambrano E.M., Guzmán-López S. Conduits for myocardial revascularization grafts: The importance of morphology and imaging. *Medicina Universitaria*. 2010; 12: 115-119.
26. Hu Y., Zou Y., Dietrich H., Wick G., Xu Q. Inhibition of neointima hyperplasia of mouse vein grafts by locally applied suramin. *Circulation*. 1999; 100: 861-868.
27. Isselbacher K.J., Braunwald E., Wilson J.D. Harrison, principios de medicina interna. 13^a Edición. Mc Graw Hill Interamericana. 1994: 1241-1250.
28. Jiang Z., Wu L., Miller B.L., Goldman D.R., Fernández C.M., Abouhamze Z.S., Ozaki C.K., Berceli S.A. A novel vein graft model: adaptation to differential flow environments. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 286: H240-H245.
29. Junqueira L.C., Carneiro J. *Basic Histology. Text & Atlas*. 11^a Edición. Editorial Mc Graw Hill. Estados Unidos de América. 2005: 205.

30. Kalra M., Miller V.M. 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.* 2000; 37: 576-584.
31. Kochanek K.D., Murphy S.L., Anderson R.N., Scott C. Deaths: final data for 2002. *Natl. Vital. Stat. Rep.* 2004; 53: 1-115.
32. Kwei S., Stavrakis G., Takahas M., Taylor G., Folkman M.J., Gimbrone M.A. Jr. García-Cedeña G. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 81-89.
33. Landen C.N. Jr., Chavez-Reyes A., Bucana C., Schmandt R., Deavers M.T., Lopez-Berestein G., Sood A.K. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer. Res.* 2005; 65: 6910-6918.
34. Lessner S.M., Martinson D.E., Galis Z.S. Compensatory vascular remodeling during atherosclerotic lesion growth depends on matrix metalloproteinase-9 activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 2123-2129.
35. Lidman D., Daniel R.K. The normal healing process of microvascular anastomoses. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 1981; 15: 103-110.
36. Lytle B.W., Cosgrove D.M., Ratliff N.B., Loop F.D. Coronary artery bypass grafting with the right gastroepiploic artery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1989; 97: 826-831.
37. Mavromatis K., Fukai T., Tate M., Chesler N., Ku D.N., Galis Z.S. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000; 20: 1889-1895.
38. Mills N.L., Everson C.T. Right gastroepiploic artery: a third arterial conduit for coronary artery bypass. *Ann. Thorac. Surg.* 1989; 47: 706-711.
39. Motwani J.G., Topol E.J. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation.* 1998; 97: 916-931.
40. Mueller C.F., Lewis C.E., Edwards W.S. The angiographic appearance of splenic-to-coronary artery anastomosis. *Radiology.* 1973; 106: 513-516.
41. O'Donnell A. Coronary artery bypass graft surgery: principles and choice of conduit. *Heart. Wise.* 1999; 2: 7-10.

42. Petrofski J.A., Hata J.A., Gehrig T.R., Hanish S.I., Williams M.L., Thompson R.B., Parsa C.J., Koch W.J., Milano C.A. Gene delivery to aortocoronary saphenous vein grafts in a large animal model of intimal hyperplasia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2004; 127: 27-33.
43. Pistavos C.E., Panagiotakos D.B., Chrysohoou C.A., Skoumas J., Stefanadis C., Toutouzas P.K. Education and acute coronary syndromes: results from the CARDIO2000 epidemiological study. *Bull. World. Health. Organ.* 2002; 80: 371-377.
44. Pola P., Serricchio M., Flore R., Manasse E., Favuzzi A., Possati G.F. Safe removal of the radial artery for myocardial revascularization: a Doppler study to prevent ischemic complications to the hand. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1996; 112: 737-744.
45. Pym J., Brown P.M., Charrette E., Parker J.O., West R.O. Gastroepiploic-coronary anastomosis. A viable alternative bypass graft. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1987; 94: 256-259.
46. Quiroga-Garza A., Delgado-Brito M., Bazaldúa-Cruz J.J., Villarreal-Silva E., Velázquez-Gauna S.E., Elizondo-Omaña R.E, Guzmán-López S. [New microsurgical model for the study of the morphological adaptative response of venous grafts]. *Rev. Invest. Clin.* 2011; 63: 399-406.
47. Riekkinen H.V., Karkola K.O., Kankainen A. The radial artery is larger than the ulnar. *Ann. Thorac. Surg.* 2003; 75: 882-884.
48. Rienstra H., Zeebregts C.J., Hillebrands J.L. The source of neointimal cells in vein grafts: does the origin matter. *Am. J. Pathol.* 2008; 172: 566-570.
49. Sata M., Nagai R. Origin of neointimal cells in autologous vein graft. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1147-1149.
50. Schachner T., Laufner G., Bonatti J. In vivo (animal) models of vein graft disease. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2006; 30: 451-463.
51. Schwartz S.I. *Principios de Cirugía. Cardiopatías adquiridas.* 3ª Edición. Interamericana Mc Graw Hill. 1995: 878-893.
52. St. André A.C., DelRossi A. Hemodynamic management of patients in the first 24 hours after cardiac surgery. *Crit. Care. Med.* 2005; 33: 2082-2093.
53. Stark V.K., Warner T.F., Hoch J.R. An ultrastructural study of progressive intimal hyperplasia in rat vein grafts. *J. Vasc. Surg.* 1997; 26: 94-103.

-
54. Sun J., Zheng J., Ling K.H., Zhao K., Xie Z., Li B., Wang T., Zhu Z., Patel A.N., Min W., Liu K., Zheng X. Preventing intimal thickening of vein grafts in vein artery bypass using STAT-3 siRNA. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 2-10.
55. Zhu Z.T., Jiang X.S., Wang B.C., Meng W.X., Liu H.Y., Tian Y. Andrographolide inhibits intimal hyperplasia in a rat model of autogenous vein grafts. *Cell. Biochem. Biophys.* 2011; 60: 231-239.
56. Zou Y., Dietrich H., Hu Y., Metzler B., Wick G., Zu Q. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1998; 153: 1301-1310.

APÉNDICE A

PERFUSIÓN DE TEJIDOS POR GRAVEDAD.

Soluciones usadas: Solución salina heparinizada (1 UI/mL) y formalina al 4 %.

A.1 Pre-perfusión.

1. Pesar a la rata.
2. Anestesiarse con una mezcla de ketamina (82.5 mg/kg) y xilacina (10mg/kg) por vía intraperitoneal. Dejar reposar a la rata por 10 o 15 minutos para que haga efecto la anestesia (la rata debe perder sensibilidad y el reflejo de respuesta). Una vez anestesiada, se debe tener cuidado de prevenir la pérdida de calor, ya que son propensas a caer en hipotermia.
3. Colocar a la rata en la tabla de operaciones en posición decúbito supino y sujetarla de sus extremidades.
4. Verificar el efecto de la anestesia en el animal aplicando un estímulo doloroso (pellizco o punción con aguja) en alguna pata. **La rata debe estar profundamente anestesiada antes de continuar.**

A.2 Perfusión.

1. Hacer una incisión en la línea media del abdomen. Con unas tijeras afiladas cortar la pared abdominal hacia los lados, siguiendo el borde subcostal.
2. Una vez expuesto el estrecho torácico inferior, con mucho cuidado cortar los bordes del diafragma para exponer la cavidad torácica.
3. Sujetar el corazón con unos fórceps (no es necesario disecar los ligamentos esterno y vertebropericárdicos, ya que pueden ayudar a mantener el corazón en su lugar). Enseguida se inserta la aguja (20 o 21 G) en la protrusión del ventrículo izquierdo y se introduce en línea recta hacia el origen de la aorta, aproximadamente 5 mm.
4. Asegurar la posición de la aguja usando unas pinzas hemostáticas y liberar la válvula del sistema de venoclisis dejando gotear solución salina heparinizada (1UI / mL) lentamente y por gravedad.

5. Hacer un corte en la vena cava superior o inferior para asegurar que la solución fluye libremente. Si la solución no fluye libremente o sale por la nariz o boca, habrá que reacomodar la aguja.
6. Administrar aproximadamente 150 mL de solución salina heparinizada, o hasta que la sangre de la rata haya sido retirada del cuerpo (la solución salina sale del cuerpo casi transparente).
7. Administrar aproximadamente 200 mL de solución de formalina al 4 % (por goteo lento y gravedad), hasta que los tejidos de la rata se hayan puesto duros.
8. Detener la perfusión y extraer el tejido de interés. Colocarlos en viales conteniendo formalina al 4 % y mantener en fijación al menos 2 horas más. (Si las piezas recolectadas son pequeñas o muy delgadas, como en el caso de injertos venosos, se puede eliminar el paso 7).
9. Procesar los tejidos por la técnica histológica.

APÉNDICE B

TÉCNICA HISTOLÓGICA.

B.1 Técnica de inclusión en parafina.

1. Obtener segmentos de injerto venoso y fijarlos con formalina al 4 %.
2. Lavar en agua corriente.
3. Deshidratar en alcoholes graduales.
 - Alcohol etílico al 60 % 60 min.
 - Alcohol etílico al 70 % 60 min.
 - Alcohol etílico al 80 % 60 min.
 - Alcohol etílico al 96 % 60 min (2 veces).
 - Alcohol etílico absoluto 60 min (2 veces).
4. Colocar los fragmentos en alcohol etílico-xilol 1:1 por 60 minutos.
5. Colocar los fragmentos en xilol por 60 min. (2 veces).
6. Preincluir los fragmentos en parafina líquida a 60 °C.
7. Inclusión definitiva de los fragmentos con parafina y dejar solidificar.

Posteriormente se realizan cortes histológicos por microtomía y se adhieren estos cortes a las laminillas por medio de un baño de flotación.

B.2 Desparafinado de laminillas.

1. Colocar las laminillas (con los cortes) en una estufa a 60 °C por 20 min.
2. Colocar las laminillas en xilol por 5 min.
3. Pasar las laminillas a una mezcla de etanol-xilol por 5 min.
4. Transferir a etanol absoluto por 2 min.
5. Transferir a etanol de 96 ° por 2 min.
6. Enjuagar lento con agua destilada.

Posteriormente se realiza la tinción de los cortes, se deshidratan y aclaran; finalmente se monta el cubreobjetos añadiendo resina sintética.

APÉNDICE C

TINCIONES.

C.1 Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E).

1. Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
2. Hidratar con etanol-xilol (1:1) por 5 min.
3. Hidratar con etanol absoluto por 2 min.
4. Hidratar con alcohol etílico 96° por 2 min.
5. Enjuagar lentamente con agua destilada.
6. Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill por 2 min.
7. Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
8. Sumergir (y sacar) rápidamente en alcohol ácido (1 inmersión).
9. Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
10. Sumergir (y sacar) rápidamente en agua amoniacal (2 inmersiones).
11. Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
12. Enjuagar lentamente con agua destilada.
13. Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
14. Deshidratar con alcohol etílico 96° por 2 min (2 cambios).
15. Sumergir en etanol absoluto por 2 min (2 cambios).
16. Sumergir en etanol-xilol por 3 min.
17. Sumergir en xilol por 2 min (2 cambios).
18. Montar con resina sintética.

C.2 Técnica de tinción con el método Tricrómico de Masson.

Fijación: formalina 4 %. Inclusión: parafina. Espesor de corte: 5 µm.

1. Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100% 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 con agua destilada.
5. Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
6. Lavar el agua corriente por 5 min, o hacer 3 cambios de 15 s.

7. Lavar en agua destilada.
8. Teñir con solución de fucsina-escarlata por 5 s (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 ésta deje de teñirse.
10. Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
11. Teñir con la solución de azul de anilina durante 15 s (el tiempo depende de la calidad y/o concentración, y tiempo de uso del reactivo).
12. Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante.
13. Pasar al ácido acético por 1-2 min.
14. Deshidratar en alcohol de 96 ° por unos s (cuidar que no se decolore).
15. Continuar con el alcohol absoluto hasta aclarar en xilol y montar en resina.

APÉNDICE D

MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR CÉLULAS MUSCULARES O CÉLULAS EN PROLIFERACIÓN.

Fijar los tejidos con formalina al 4 %.

Incluir en parafina.

Usar cortes histológicos de 4 μ m.

Dilución de anticuerpo primario: Actina (1:50), PCNA (1:200).

- 1 Desparafinar e hidratar los cortes en las siguientes soluciones:
 - Xilol (2 cambios). 5 min.
 - Etanol absoluto. 3 min.
 - Etanol 95 %. 3 min.
 - Etanol 70 %. 3 min.
 - Agua destilada. 3 min.
 - Solución Tris-buffer salino + Tween 20 (TBST). 3 min.
- 2 Recuperar antígenos con solución TRS a 100 °C.
 - Pre calentamiento (sin muestras). 20 min.
 - Calentamiento (con muestras). 20 min.
 - Enfriamiento . 20 min.
- 3 Lavar en solución buffer TBST. 5 min.
- 4 Bloquear la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% a 37 °C. 10 min.
- 5 Lavar en solución buffer TBST. 5 min.
- 6 Bloqueo de proteínas a 37 °C. 30 min.
- 7 Añadir el anticuerpo primario a 37 °C (o toda la noche a 4 °C) 45 min.
- 8 Lavar en solución buffer TBST. 5 min.
- 9 Añadir el anticuerpo secundario a 37 °C. 30 min.
- 10 Lavar en solución buffer TBST. 5 min.
- 11 Añadir la solución de estreptavidina-HRP a 37 °C. 30 min.
- 12 Lavar en solución buffer TBST. 5 min.
- 13 Revelar con solución de sustrato-cromógeno a 37 °C. 7 min.

Contratinción.

- | | | |
|---|---|---------|
| 1 | Lavar en agua destilada (3 veces). | 2 min. |
| 2 | Contrastar con hematoxilina de Mayer. | 20 seg. |
| 3 | Lavar en agua de la llave hasta que deje de desteñirse. | |
| 4 | Enjuagar en agua destilada. | 3 min. |
| 5 | Deshidratar gradualmente con: | |
| | • Etanol 70 %, 1 cambio. | 3 min. |
| | • Etanol 95 %, 1 cambio. | 3 min. |
| | • Etanol 100 %, 1 cambio. | 3 min. |
| | • Xilol, 2 cambios. | 5 min. |
| 6 | Limpiar el exceso de xilol. | |
| 7 | Montar con resina sintética y almacenar en oscuridad. | |

APÉNDICE E

MÉTODO INMUNIHISTOQUÍMICO PARA DETECTAR LA FRAGMENTACIÓN DE LA CROMATINA MEDIANTE LA TÉCNICA TUNEL.

Para cortes fijados con formaldehído al 4 %, embebidos en parafina, y con grosor de 7 μ m.

E.1 Desparafinar e Hidratar.

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

NO PERMITIR QUE LOS CORTES SE SEQUEN.

E.2 Instrucciones del kit de Detección de Apoptosis.

1. Sumergir las muestras en PBS 1x a temperatura ambiente (T_a).
*Secar cuidadosamente alrededor de la muestra.
2. Cubrir con 50 μ L/ muestra de solución de proteinasa K, incubar a 37 °C por 30 min.
3. Lavar 2 veces en agua desionizada por 2 min c/u.
4. Sumergir las muestras en solución bloqueadora a T_a por 5 min.
5. Lavar las muestras en PBS 1x a T_a por 1 min.
6. Sumergir las muestras en buffer de marcaje TdT 1x a T_a por 5 min.
7. Cubrir con 50 μ L/muestra de mezcla de reacción de marcaje e incubar en cámara húmeda a 37 °C por 2 h.
8. Sumergir las muestras en buffer stop TdT 1x a T_a por 5 min.
9. Lavar 2 veces en PBS 1x a T_a por 2 min c/u.
10. Cubrir con 50 μ L/muestra de la solución de anticuerpo e incubar a 37 °C por 30 min.
11. Lavar 2 veces en PBS 1x a T_a por 2 min c/u.
12. Cubrir con 50 μ L/muestra de solución Strep-HRP e incubar a 37 °C por 10 min.
13. Lavar 2 veces en PBS 1x a T_a por 2 min c/u.
14. Sumergir las muestras en solución de DAB a T_a por 7 min.

15. Lavar las muestras en varios cambios de agua desionizada, 2 min c/u.

E.3 Contratación.

1. Sumergir las muestras en agua desionizada, por 2 min.
2. Sumergir en verde de metilo, por 2 min.
3. Lavar las muestras consecutivamente, sumergiéndolas 10 veces en cada una de las siguientes soluciones:
 - Agua desionizada.
 - Etanol 70 %.
 - Etanol 95 %.
 - Etanol 100 %.
 - Xilol, 2 cambios.
4. Limpiar el exceso de xilol de las laminillas.
5. Montar con resina sintética y guardar en oscuridad.

APÉNDICE F

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

F.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

F.1.1 Formaldehído (formalina) al 4%.

*Para preparar 500 mL

Paraformaldehído	20 g.
Agua destilada	450 mL.
<u>*Calentar a 60 °C por 30 min.</u>	
PBS 10x	50 mL.

Ajustar pH a 7.2.

Almacenar a 4 °C.

F.1.2 PBS 10x.

*Para preparar 100 mL.

NaCl	8.00 g.
KCl	0.20 g.
Na ₂ HPO ₄	1.44 g.
KH ₂ PO ₄	0.24 g.

Ajustar pH a 7.2.

Almacenar a 4 °C.

F.1.3 Hematoxilina de Gill.

Agua destilada	730 mL.
Etilenglicol	250 mL.
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 g.
*Si está en cristales pesar:	2.36 g.
Yodato de sodio	0.2 g.
Sulfato de aluminio	17.6 g.
Ácido acético glacial	2.0 mL.

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

F.1.4 Eosina.

- Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 g.
Agua destilada	20 mL.
Etanol de 96 °	80 mL.

- Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregar 3 partes de etanol al 80 %. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

F.1.5 Alcohol ácido.

Etanol al 70 %	99 mL.
Ácido clorhídrico concentrado	1 mL.

F.1.6 Agua amoniacal.

Agua destilada	99 mL.
Hidróxido de amonio	1 mL.

F.1.7 Hematoxilina férrica de Weigert.

- Solución A:

Hematoxilina (anhidra)	1 g.
Etanol de 96 °	100 mL.

- Solución B:

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 mL.
Agua destilada	95 mL.
Ácido clorhídrico concentrado	1 mL.

- Solución de cloruro férrico al 29 %.

Cloruro férrico	14.5 g.
Agua destilada	50 mL.

- Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. Esta solución debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y consistencia (precipita con el tiempo).

F.1.8 Fucsina ácida y escarlata de Biebrich.

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

- Solución de escarlata de Biebrich al 1 %.

Escarlata de Biebrich	1 g.
Agua destilada	100 mL.

- Solución de fucsina ácida al 1%.

Fucsina ácida	1 g.
Agua destilada	100 mL.

F.1.9 Ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.

Ácido fosfomolibdico	5 g.
Ácido fosfotúngstico	5 g.
Agua destilada	200 mL.

F.1.10 Azul de anilina.

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

F.1.11 Ácido acético al 1%.

Ácido acético glacial	1 mL.
Agua destilada	99 mL.

F.1.12 Fijador de Bouin.

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

F.2 INMUNOHISTOQUÍMICA (TUNEL).

Se utilizó el kit TACS.XL[®] DAB *In Situ* Apoptosis Detection de Trevigen[®].

Las soluciones marcadas con * se deben preparar con no más de 30 minutos antes de usarse.

F.2.1 PBS 1x.

*Para preparar 500 mL.

PBS 10x	50 mL.
Agua destilada	450 mL.

Ajustar pH a 7.2. Almacenar a 4 °C.

F.2.2 *Solución de proteinasa K.

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

F.2.3 *Solución bloqueadora.

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

F.2.4 Solución de buffer de marcaje TdT 1x.

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

F.2.5 *Mezcla de reacción de marcaje.

- Descongelar la mezcla B-dNTP y la enzima TdT a temperatura ambiente, y después colocarlas en hielo. (Para mantener la actividad óptima de la enzima saque del congelador el tubo de ésta solo el tiempo necesario para tomar el volumen requerido).
- Mantener la mezcla de reacción de marcaje en hielo.

- Preparar 50 μL por muestra de la siguiente manera:

	<u>2 muestras</u>	<u>4 muestras</u>	<u>10 muestras.</u>
Mezcla B- dNTP	2 μL	4 μL	10 μL
Enzima TdT	2 μL	4 μL	10 μL
Buffer de marcaje TdT 1x	100 μL	200 μL	500 μL .

F.2.6 Buffer stop TdT 1x.

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

Buffer stop TdT 10x	5 mL.
Agua desionizada	45 mL.

F.2.7 Solución de anticuerpos.

- Usar 50 μL de la dilución de anticuerpo por muestra. Preparar de la siguiente manera:

	<u>2 muestras</u>	<u>4 muestras</u>	<u>10 muestras.</u>
Anti-BrdU	2 μL	4 μL	10 μL
Diluyente-Strep	100 μL	200 μL	500 μL .

F.2.8 *Solución Strep-HRP.

- Usar 50 μL de solución Strep-HRP por muestra.
- Almacenar la solución a temperatura ambiente.
- Preparar de la siguiente manera:

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

F.2.9 *Solución de DAB.

- Descongelar la solución de DAB a 37 °C. después dejar a temperatura ambiente, NO en hielo, porque precipita la solución DAB.
- Preparar la solución no más de 30 minutos antes de usarla.
- Usar 50 mL de solución DAB para procesar de 1 a 10 muestras.
- Preparar de la siguiente manera:

PBS 1x	50 mL.
DAB	250 µL.
H ₂ O ₂ 30 %	50 µL.
DAB enhancer	0 a 50 µL.

F.2.10 Verde de metilo al 1 %.

- Listo para usar, puede ser reutilizado. Almacenar en recipiente cerrado, si precipita fíltrelo.

F.2.11 Control positivo. TACS-Nucleasa y buffer.

Buffer de marcaje TdT 1x	50 µL.
Mezcla de B- dNTP	1 µL.
Enzima TdT	1 µL.
TACS-Nucleasa	1 µL.

F.2.12 Control negativo.

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

APÉNDICE G

RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO.

Nombre: Sergio Everardo Velázquez Gauna.

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología.

Título de la tesis: Modelo Microquirúrgico para el Estudio de la Respuesta Morfológica Adaptativa de la Pared Vasculare en Segmentos Venosos Injertados en Conductos Arteriales en Ratas Wistar.

Área de estudio: Orientación Terminal en Morfología.

Datos personales:

Lugar de nacimiento: Monterrey, Nuevo León, México; el 25 de febrero de 1980.

Estado civil: Soltero.

Escolaridad:

- Químico Farmacéutico Biólogo con especialidad en Diagnóstico Clínico, egresado de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en diciembre de 2004.
- Maestro en Ciencias con Orientación Terminal en Morfología, egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en agosto de 2008.

Publicaciones en revistas científicas:

1. Morphometric Study of Cervical Vertebrae C3-C7 in a Population from Northeastern Mexico. Bazaldúa C.J.J., González L.A., Gómez S.A., Villarreal S.E.E.; Velázquez G.S.E., Sánchez U.A., Elizondo-Omaña R.E. & Guzmán L.S. Int. J. Morphol. 2011; 29: 325-330.

2. [Study of the vascular morphology of the lower limb nerves used as grafts]. Bazaldúa-Cruz J.J., Quiroga-Garza A., Velázquez Gauna S.E., Villarreal-Silva E.E., Tijerina-de-la Garza O., Elizondo-Omaña R.E., De-la-Garza-Cstro O., Guzmán-López S. Rev. Invest. Clin. 2011; 63: 461-466.

Publicaciones relacionadas a la tesis:

1. [New microsurgical model for the study of the morphological adaptive response of venous grafts]. Quiroga-Garza A., Delgado-Brito M., Bazaldúa-Cruz J.J., Villarreal-Silva E.E., Velázquez-Gauna S.E., Elizondo-Omaña R.E., Guzmán-López S. Rev. Invest. Clin. 2011; 63: 399-406.



ARTÍCULO ORIGINAL

Nuevo modelo microquirúrgico para el estudio de la respuesta morfológica adaptativa de injertos venosos

Alejandro Quiroga-Garza,* Miriam Delgado-Brito,* Juan José Bazaldúa-Cruz,* Eliud Villarreal-Silva,* Sergio E. Velázquez-Gauna,* Rodrigo E. Elizondo-Omaña,* Santos Guzmán-López*

* Departamento de Anatomía Humana, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

RESUMEN

New microsurgical model for the study of the morphological adaptive response of venous grafts

ABSTRACT

Introduction. Animal models have been developed for the study of the intimal hyperplasia, a common cause of venous graft stenosis. **Objective.** To establish a venous graft animal model for the study of the morphologic adaptive response to the arterial circulation. **Material and methods.** A venous graft was placed in the arterial circulation of the caudal extremity from Wistar rats. In order to develop the model, it was carried out a morphologic study of the caudal extremity blood vessels. Three possible sites were evaluated for the obtaining of the venous graft. **Results.** Graft permeability and viability were observed only in one segment, between the muscular branches and the origin of the saphenous vein. The portion of vein that was obtained from one extremity, was placed in the arterial circulation of the opposite extremity. **Conclusions.** A venous graft animal model was established, using a femoral vein segment, between the muscular branches and the origin of the saphenous vein, placing it in the homonyme artery of the opposite extremity.

Key words. Venous graft. Animal model. Vascular microsurgery. Intimal hyperplasia.

Introducción. Se han desarrollado modelos animales para el estudio de la hiperplasia de la túnica íntima, una causa de la estenosis que sufren los injertos venosos. **Objetivo.** Establecer un modelo animal de injerto venoso para el estudio de la respuesta morfológica adaptativa a la circulación arterial. **Material y métodos.** El estudio se realizó en los Laboratorios de Microcirugía e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se realizó un modelo animal de injerto venoso colocado en la circulación arterial. Para desarrollar el modelo se realizó un estudio morfológico de los vasos sanguíneos de la extremidad caudal de la rata Wistar. Se evaluaron tres posibles sitios para la obtención del injerto venoso. **Resultados.** Se observó permeabilidad y viabilidad del injerto sólo en un segmento comprendido entre los ramos musculares y el origen de la vena safena. El segmento venoso obtenido fue colocado en la circulación arterial de la extremidad caudal opuesta al lugar donde se obtuvo el injerto. **Conclusiones.** Se estableció un modelo animal de injerto venoso utilizando el segmento de la vena femoral, comprendido entre los ramos musculares y el origen de la vena safena, se colocó en la arteria homónima del lado opuesto.

Palabras clave. Injerto venoso. Modelo murino. Microcirugía vascular. Hiperplasia de la túnica íntima.

INTRODUCCIÓN

Los modelos animales de experimentación han sido muy utilizados en diversas áreas de la investigación biomédica, ya sea para el estudio de enfermedades y/o de sus posibles tratamientos (médicos o quirúrgicos).¹⁻³ Así, por ejemplo, se cuenta con modelos que simulan enfermedades como: esofagitis con reflujo,⁴ osteoporosis,⁵⁻⁶

daño hepático,⁷ obesidad inducida⁸⁻⁹ y cáncer.¹⁰⁻¹¹ Otros modelos se usan para evaluar intoxicaciones por fármacos,¹²⁻¹³ toxinas y metales pesados.¹⁴⁻¹⁵ Algunos de los modelos quirúrgicos se han utilizado para evaluar la isquemia cerebral, ya sea transitoria o permanente,¹⁶⁻¹⁷ y la respuesta adaptativa de los injertos vasculares como ocurre en la cirugía de derivación miocárdica,¹⁷⁻³² entre otros.

En la actualidad, existen diversos modelos animales en cirugía vascular que estudian la respuesta al empleo de diversos materiales y técnicas de sutura.³³⁻³⁴ En un estudio realizado por Elizondo-Omaña, *et al.*,³³ se reportó que no existen diferencias significativas al utilizar polidioxanona o polipropileno en arteria muscular, elástica y vena. En la investigación realizada por Hifny, *et al.* (2007),³⁴ se evaluó la histopatología de anastomosis microvasculares término-terminales arteriales (arteria femoral) al utilizar diferentes técnicas de sutura (simple interrumpida, continua, en manga) en ratas de la cepa Sprage-Dawley. Reportaron cambios importantes al emplear uno u otro tipo de técnica de sutura y concluyeron que la técnica de sutura simple interrumpida fue la que obtuvo mejor permeabilidad para anastomosis vasculares con un diámetro < 1 mm.³⁴

Existen otros modelos animales para el estudio de los injertos venosos¹⁷⁻³² que tratan de simular la respuesta de los injertos vasculares humanos y que son de importancia para dilucidar las causas de la oclusión que éstos sufren con el paso del tiempo. El modelo desarrollado por Zou, *et al.* (1998)²⁷ consistió en el empleo de ratones transgénicos de la cepa C57BL/6J susceptibles para desarrollar aterosclerosis, en los que se realizó un injerto de vena yugular externa en la arteria carótida común. Los segmentos venosos injertados fueron obtenidos y analizados en las semanas 1, 2, 4, 8 y 16. Se reportó reducción del diámetro luminal de la vena anastomosada debido a la formación de hiperplasia de la túnica íntima. En las primeras semanas se observó pérdida de células musculares lisas y, posteriormente, su proliferación. Este modelo reprodujo algunas características de los injertos venosos con aterosclerosis del humano.²⁷

El modelo realizado por Kwei, *et al.* (2004),³⁰ en ratones de la cepa C57BL/6J, consistió en una anastomosis entre la vena yugular externa y la arteria carótida común con el propósito de analizar los cambios morfológicos de la vena en diferentes tiempos (días 1, 3 y 7). En su reporte demostraron la preservación del endotelio y la formación de múltiples capas concéntricas de células musculares, con la consecuente disminución del diámetro luminal.³⁰

Otro modelo consiste en anastomosar una rama de la vena yugular externa en la arteria femoral en ratones de la cepa C57BL/6J y Rosa26.³⁵ Los ratones de la cepa C57BL/6J expresan, constitutivamente, un gen reportero de β -galactosidasa en todas las células. Una rama de la vena yugular externa del ratón de la cepa Rosa26 fue injertada en la arteria femoral del ratón Wild-type y viceversa (de Wild-type

a Rosa26). Se obtuvieron las muestras a los cinco, diez y 30 días; posteriormente fueron evaluadas. Reportaron un engrosamiento de la túnica íntima cercana a la oclusión en la porción proximal y distal del injerto, en comparación con la porción media donde no fue tan notorio. El engrosamiento de la túnica íntima fue mayor al compararlo con otros modelos murinos.³⁵

OBJETIVO

Establecer un modelo de injerto venoso en ratas de la cepa Wistar para el estudio de la respuesta morfológica adaptativa de estos injertos expuestos a la circulación arterial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, longitudinal, prospectivo y comparativo para desarrollar un modelo murino para el estudio de la respuesta adaptativa de los injertos venosos en la circulación arterial (Figura 1). La experimentación se realizó en los Laboratorios de Microcirugía e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

Ratas

Se desarrolló un nuevo modelo de injerto venoso autólogo en ratas Wistar de entre 250 y 400 g de peso. Se utilizó un segmento de la vena femoral del miembro caudal para ser injertado en la arteria femoral del lado opuesto. Se realizó un estudio anatómico de la circulación en los miembros caudales de la rata Wistar, pruebas de permeabilidad del injerto venoso y la evaluación morfológica del injerto en los días 1, 3, 7, 14 y 21. Las muestras utilizadas como control fueron obtenidas del segmento venoso correspondiente, pero del lado opuesto a donde se obtuvo el injerto. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio.

Estudio anatómico de la circulación arterial y venosa

Se realizó un estudio anatómico para la selección del segmento venoso que se utilizaría como injerto. El estudio consistió en tres etapas distintas de identificación, en las que se practicó disección de la vasculatura en el miembro caudal de la rata Wistar

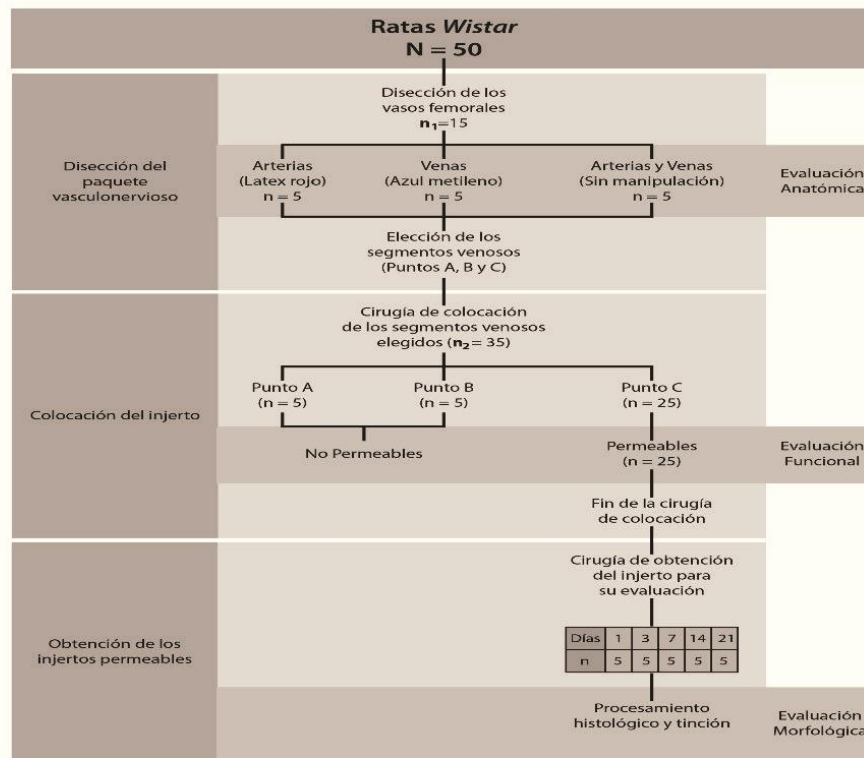


Figura 1. Estrategia general del estudio. Las muestras control fueron obtenidas del segmento venoso correspondiente al lado opuesto al utilizado como injerto.

bajo microscopio quirúrgico Karl Zeiss a 0.6x y 2.0x aumentos y se observó el diámetro externo de los vasos.

En la primera etapa se estudió la distribución arterial, para lo cual se inyectó látex vascular rojo (red latex® Wards) en la aorta abdominal de cinco ratas Wistar y, posteriormente, se disecó bajo microscopio para observar las ramas arteriales con mayor facilidad. En la segunda etapa se inyectó azul de metileno en cinco ratas para identificar y observar la distribución venosa. La tercera etapa consistió en la visualización (sin tinción) de la trama vascular completa (arterias y venas) del miembro caudal de cinco ratas Wistar.

Después de una disección minuciosa de la vasculatura del miembro inferior de la rata Wistar, se determinó la suficiencia de la circulación venosa para

drenar la sangre del resto del miembro caudal. Esto se realizó colocando, de forma independiente, una ligadura en cada uno de los tres puntos (A, B y C) sugeridos por el estudio anatómico con base en su distribución y calibre (Figura 2).

Cirugía de injerto venoso

Después de anestesiarse a la rata por vía intraperitoneal con ketamina (5 mg/100 g) se disecó la arteria y vena femoral de ambas regiones inguinales. Del lado izquierdo se obtuvo el segmento venoso que se utilizó como injerto en la arteria femoral del lado derecho. Una vez obtenido el segmento venoso izquierdo se colocó en un plato Petri con solución salina heparinizada. Posteriormente, se colocaron los aproximadores vasculares en la arteria

femoral derecha y se realizó una sección transversal para anastomosar el injerto venoso utilizando nylon 10-0. Al finalizar este procedimiento se realizaron las pruebas de permeabilidad (Figura 1).

Estudio de permeabilidad del injerto venoso

Durante el procedimiento quirúrgico, una vez colocado el injerto venoso, se realizó la prueba de llenado para evaluar la permeabilidad en el momento. Esta prueba consistió en pinzar la arteria femoral en la porción proximal al injerto; posteriormente, se

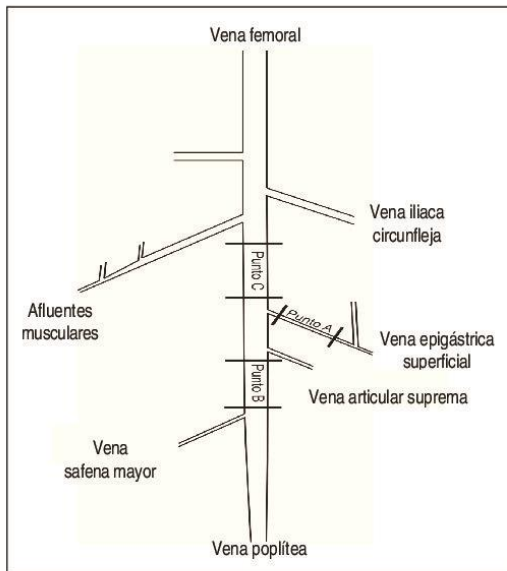


Figura 2. Segmentos venosos vasculares (puntos A, B y C) que se probaron como posibles injertos en la arteria femoral.

drenó (vació) el injerto en dirección caudal y, finalmente, se retiró el pinzamiento de la arteria y se observó el llenado y pulso del injerto (prueba positiva). Comprobada la permeabilidad del injerto concluyó la cirugía de colocación del injerto.

Evaluación morfológica

Las ratas fueron reoperadas los días 1, 3, 7, 14 y 21 (n = 5 por tiempo) y eutanizadas para la obtención del segmento venoso injertado y las muestras fijadas en formol; posteriormente, procesadas con la técnica histológica e incluidas en parafina. Los controles fueron obtenidos del segmento venoso correspondiente del lado derecho. Se realizaron cortes de 5 µm para ser teñidos con hematoxilina y eosina, y tricrómico de Masson para su evaluación morfológica. Se realizaron morfometrías de las túnicas de la pared vascular.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Excell®. Las variables cualitativas se representaron en tablas de frecuencias y porcentajes. Para las morfometrías y comparación con los controles se utilizó la prueba de U Mann-Withney y se reportaron sus medias y desviaciones estándar.

RESULTADOS

Estudio anatómico de la circulación arterial y venosa

Se realizaron un total de 15 procedimientos para el estudio de la vasculatura del miembro caudal de la rata Wistar. Se realizaron cinco procedimientos por cada una de las tres técnicas del estudio anatómico (Figuras 1 y 3). Se observó que la arteria femoral es

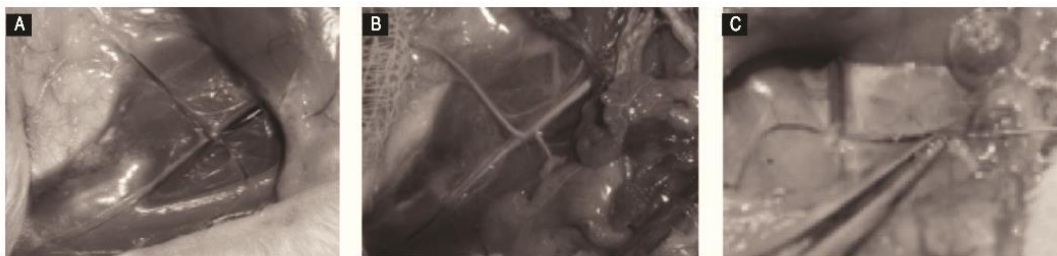


Figura 3. Técnicas utilizadas para el estudio anatómico: Técnica de visualización directa (A), técnica de inyección de látex (B) y técnica de inyección de azul de metileno (C).

una continuación directa de la arteria iliaca externa. Un ramo importante de la primera es la arteria femoral profunda que se distribuye de forma principal en la musculatura del miembro caudal.

De la arteria femoral (propriadamente dicha) se originan las arterias: circunfleja iliaca superficial, epigástrica superficial, circunfleja femoral lateral y medial, ramos musculares que se anastomosan con otros provenientes de la femoral profunda.

El estudio anatómico de las venas sugirió que era posible utilizar:

- **A.** Vena circunfleja iliaca superficial.
- **B.** Vena femoral en un punto distal a la desembocadura de la vena circunfleja iliaca superficial.
- **C.** Vena femoral en un punto proximal a la vena circunfleja iliaca superficial, pero distal a la vena femoral profunda (Figura 1).

Al evaluar la suficiencia de la vasculatura venosa en el miembro caudal de la rata Wistar se demostró la existencia de flujo suficiente al ligar en A, B y C. Cuando la ligadura se colocó en cualquiera de los puntos (A, B o C) se observó flujo distal y adecuada función de la extremidad posterior a la cirugía (Figura 1).

Cirugía de injerto venoso y estudio de permeabilidad

Se realizaron diez cirugías donde se utilizaron los segmentos A (n = 5) y B (n = 5). Sin embargo, se encontró negativa la prueba de permeabilidad en todas las muestras, por lo que se decidió no continuar con estas intervenciones.

Se realizaron un total de 25 cirugías (n = 25) para la colocación del injerto venoso del punto C (vena fe-

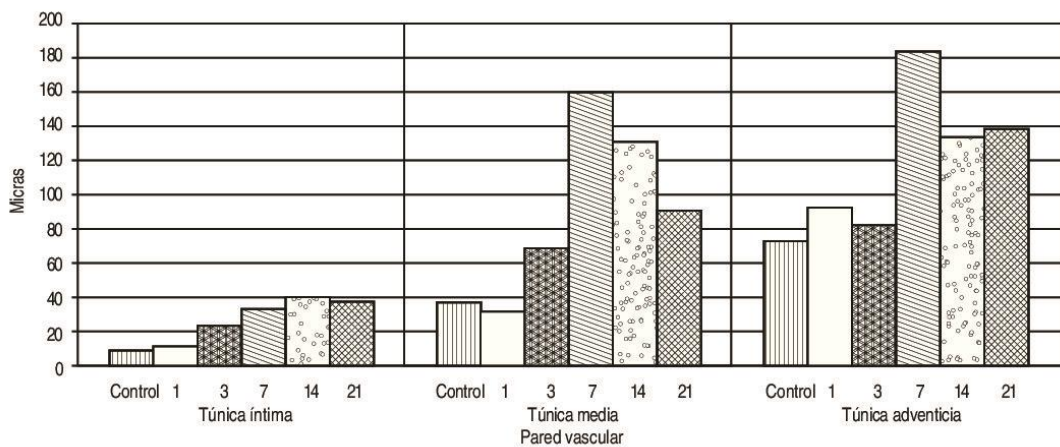


Figura 4. Comportamiento del grosor de las túnicas en diferentes tiempos. Se observa un incremento gradual y constante en la túnica íntima. En la túnica media y adventicia el grosor se incrementa con un pico en el día 7 y se observa una tendencia a la disminución en los días posteriores.

Cuadro 1. Media y desviación estándar de las morfometrías realizadas en cada túnica y grosor total de la pared del injerto venoso, de acuerdo con el tiempo en que se obtuvo la muestra después de la cirugía.

Días	T. íntima		T. media		T. adventicia		Grosor total	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Control	8.90	3.66	37.97	4.67	73.45	30.19	120.33	21.86
1	10.92	3.40	31.60	11.30	93.02	54.90	108.44	77.76
3	23.75	8.51*	68.73*	30.05	82.45*	38.68	174.94	68.41
7	33.46	11.15*	159.60*	114.75	184.86*	67.01	302.34*	222.11
14	39.78	11.23*	131.02*	44.82	133.57*	81.93	253.64*	158.36
21	39.04	23.78*	90.95*	34.58	139.45*	95.75	269.44*	129.45

* Diferencias estadísticamente significativas al comparlas con el control (p < 0.05).

moral en un punto proximal a la vena circunfleja iliaca superficial, pero distal a la vena femoral profunda) en la arteria femoral. En tres casos ($n = 3$, 12%) se obtuvo una muestra de injerto que no fue posible valorar por errores técnicos. El resto de los injertos ($n = 22$, 88%) eran funcionales al momento de extraer la muestra en los días 1, 3, 7, 14 y 21. Al momento de terminar el procedimiento, la prueba de llenado del injerto (permeabilidad) fue positiva cuando se utilizó el segmento venoso del punto C.

Evaluación morfológica

La evaluación morfológica se realizó en las muestras obtenidas de los injertos venosos en los días 1, 3, 7, 14 y 21 (Figura 4). Las morfometrías de cada una de las túnicas y el grosor total de pared se muestran en el cuadro 1 y en la figura 4. La túnica íntima mostró crecimiento gradual y sostenido hasta alcanzar su grosor máximo en el día 14 durante el periodo de evaluación; mientras que la túnica media y adventicia tuvieron su máximo engrosamiento en el día 7; posteriormente, sufrieron una disminución, aunque no lo suficiente para alcanzar los niveles basales observados en el control.

DISCUSIÓN

Se estableció y caracterizó un modelo microquirúrgico de injerto venoso en ratas de la cepa Wistar para el estudio de la respuesta morfológica adaptativa de estos injertos expuestos a la circulación arterial. El desarrollo de este modelo es importante por su implicación para el estudio de la hiperplasia de la túnica íntima, considerada como la principal causa de estenosis en los injertos venosos y un factor importante en su fracaso, así como del posible desarrollo y evaluación de tratamientos para evitar su formación y, en última instancia, el fracaso temprano del injerto.

Existen diversos modelos animales (perros, conejos y roedores) para el estudio de la estenosis en los injertos vasculares.¹⁷⁻³² Algunos modelos murinos reproducen muchos de los aspectos presentes en la enfermedad de los injertos venosos humanos, por lo que podrían ser útiles para su estudio.²⁷ Los modelos animales de injerto venoso presentan características comunes a lo que ocurre en humanos: pérdida y proliferación de células musculares lisas en los injertos venosos, así como una respuesta inflamatoria.^{28,36} Algunas diferencias que podrían señalarse son las relacionadas a las enfermedades humanas, no presentes en el modelo murino, como

las lesiones ateroscleróticas y la predisposición a trombosis.²⁸

Además, los procedimientos quirúrgicos varían y no se ejecutan de igual modo a como ocurre en una cirugía de injerto vascular.^{27,30,35} El modelo desarrollado por Kwei (2004) consiste en una anastomosis término-lateral de la vena yugular externa con la arteria carótida común.³⁰ A diferencia de éste, el modelo propuesto por Zou (1998) realiza una anastomosis término-terminal de un segmento venoso (vena yugular externa autóloga, vena yugular heteróloga y vena cava) en la arteria carótida.²⁷

En el modelo del presente estudio se utilizó una anastomosis término-terminal de la vena femoral autóloga (injerto) en la arteria homónima de la extremidad caudal del lado opuesto al que se obtuvo el injerto. Las tres características importantes del presente modelo son: adecuado calibre, fácil acceso y manipulación del injerto, semejanza en su composición morfológica en relación con el humano.

La vena y arteria femorales presentan adecuado calibre (proporción 1.5:1, respectivamente) y circulación colateral para realizar este procedimiento, lo que implica menor morbilidad y facilidad técnica que aquel realizado en los vasos carotídeos y otros vasos. La proporción del calibre entre vena femoral (punto C):arteria femoral que se utilizó en el presente estudio es adecuado, ya que –por ejemplo– en humanos el diámetro de la vena safena es una a dos veces más grande que el de la arteria coronaria.³⁷ Es bien conocido que la vena safena desarrolla hiperplasia de la túnica íntima.

Los vasos femorales se pueden diseccionar fácilmente bajo microscopio quirúrgico, lo que puede implicar menor manipulación que otros vasos (vena cava, arteria carótida y vena yugular) utilizados en diferentes modelos.^{27,30,35} En la actualidad, se cree que la manipulación cuidadosa (no touch) puede ayudar a prevenir el desarrollo de la hiperplasia de la túnica íntima.³

Las arterias femorales tienen una túnica media donde predominan las células musculares lisas y escasas fibras elásticas, lo cual semeja a las características de las arterias coronarias en humanos. Adicionalmente, la arteria femoral es considerada de bajo flujo, condición donde se ha demostrado un marcado desarrollo de hiperplasia de la túnica íntima.³

En el presente modelo, se encontró evidencia de la reducción del diámetro luminal secundario, principalmente, a un engrosamiento de la túnica íntima, aunque también estuvo presente en el resto de las túnicas. Se han demostrado cambios morfológicos en

todas las tunicas de la pared vascular de injertos,³⁰ aunque los encontrados en la túnica íntima son de mayor importancia clínica.²⁷

CONCLUSIONES

El modelo presentado es adecuado para el estudio de la hiperplasia de la túnica íntima observada en injertos venosos. Sin embargo, debido a la complejidad de las lesiones vasculares en humanos, se reconoce que hasta hoy no existe un modelo animal que reproduzca exactamente la patofisiología de la enfermedad de los injertos venosos autólogos. Es importante estar conscientes y siempre considerar algunas diferencias en los mecanismos entre las respuestas fisiológicas y patológicas de la vasculatura en animales y humanos.

REFERENCIAS

1. Clause BT. The Wistar Institute Archives: rats (not mice) and history. *Mendel Newsletter* 1998; 7: 2-7.
2. Sata M, Nagai R. Origin of neointimal cells in autologous vein graft. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1147-9.
3. Schachner T, Yping Z, Oberhuber A, et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 1580-5.
4. Asaoka D, Nagahara A, Oguro M, et al. Characteristic pathological findings and effects of ecabet sodium in rat reflux esophagitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3480-5.
5. Brouwers JEM, Lamberst FM, Gasser JA, et al. Bone degeneration and recovery alter early and late bisphosphonate treatment of ovariectomized Wistar rats assessed by in vivo micro-computed tomography. *Calcif Tissue Int* 2008; 82: 202-11.
6. Hidaka S, Okamoto Y, Uchiyama S, et al. Royal jelly prevents osteoporosis in rats: beneficial effects in ovariectomy model and in bone tissue culture model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2006; 3: 339-48.
7. Mansuroglu T, Dudas J, Elmouhoub A, et al. Hepatoblast and mesenchymal cell-specific gene-expression in fetal rat liver and in cultured fetal rat liver cells. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 11-9.
8. Primeaux SE, Barnes MJ, Bray GA. Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behav Brain Res* 2008; 180: 190-6.
9. Cottone P, Sabino V, Nagy TR, et al. Feed microstructure in diet-induced obesity susceptible versus resistant rats: central effects of urocortin2. *J Physiol* 2007; 583: 487-504.
10. Pacharinsak C, Beitz A. Animal models of cancer Pain. *Comp Med* 2008; 58: 220-33.
11. Morrone FB, Oliveira DL, Gamermann P, et al. In vivo glioblastoma growth is reduced by apyrase activity in a rat glioma model. *BMC Cancer* 2006; 6: 226.
12. Andersen ML, Martins RCS, Elvarenga TAF, et al. Progesterone reduces erectile dysfunction in sleep-deprived spontaneously hypertensive rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 1(5): 7.
13. Vieyra-Reyes P, Mineur YS, Tunes I, et al. Antidepressant like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression. *Brain Res Bull* 2008; 77: 13-8.
14. Chang CC, Hwang JS, Chan CC, et al. Interaction effects of ultrafine carbon Black with iron and nickel on heart rate variability in spontaneously hypertensive rats. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1012-7.
15. Nelli S, Craig J, Martin W. Oxidation by trace Cu²⁺ ions underlies the ability of ascorbate to induce vascular dysfunction in the rat perfused mesentery. *Eur J Pharmacol* 2009; 614: 84-90.
16. Chang Y, Hsieh CY, Peng ZA, et al. Neuroprotective mechanisms of puerarin in middle cerebral artery occlusion-induced brain infarction in rats. *J Biomed Sci* 2009; 19(16): 9.
17. Cheng J, Alkayed NJ, Hurn PD. Deleterious effects of dihydrotestosterone on cerebral ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1553-62.
18. Garrett HE, Dennis EW, De Bakey ME. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft: seven year follow-up. *JAMA* 1973; 223: 792-4.
19. Wei WI, Lam KH, Wong J. Use of the yarsagil aneurismal clamp for end-to-side microvascular anastomosis: an experimental study in rats. *British J Plastic Surg* 1983; 36: 363-6.
20. Dobrin PB, Littooy FN, Endean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery* 1989; 105(3): 393-400.
21. Dilley RJ, McGeachie JK, Tennant M. The role of cell proliferation and migration in the development of a neo-intimal layer in veins grafted into arteries, in rats. *Cell Tissue Res* 1992; 269(2): 281-7.
22. McGeachie JK, Tennant M. The role of cell proliferation and migration in the development of a neo-intimal layer in veins grafted into arteries, in rats. *Cell Tissue Res* 1992; 269: 281-7.
23. Gupta SK, Girinshkumar H. Lower extremity revascularization. *J Cardiovasc Surg* 1993; 34: 229-36.
24. Tennant M, McGeachie JK. Adaptive remodelling of smooth muscle in the neo-intima of vein-to-artery grafts in rats: a detailed morphometric analysis. *Anat Embryol* 1993; 187(2): 161-6.
25. Mills JL, Fujitani RM, Taylor SM. The characteristics and anatomic distribution of lesions that cause reversed vein graft failure: a five year prospective study. *J Vasc Surg* 1993; 17: 195-204.
26. Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg* 1994; 81: 1254-69.
27. Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Zu Q. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1998; 153: 1301-10.
28. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 1998; 97: 916-31.
29. Leville CD, Osipov VO, Jean Claude JM, Seabrook GR, et al. All-trans-retinoic acid decreases cell proliferation and increases apoptosis in an animal model of vein bypass grafting. *Surgery* 2000; 128: 178-84.
30. Kwei S, Starvrakis G, Takhas M, et al. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am J Pathol* 2004; 161: 81-9.
31. Wai-Man NgR. Training model for end-to-side microvascular anastomosis in rat. *Surg Pract* 2006; 10: 114-6.
32. Kudo FA, Muto A, Moloney SP, et al. Venous identity is lost but arterial identity is not gained during vein graft adaptation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1562-71.
33. Elizondo-Omaña RE. Empleo de polidioxanona, polipropileno o seda como materiales de sutura en anastomosis termino-terminal en arterias muscular, elástica o vena. Tesis doctoral. Monterrey: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León; 2008.

34. Hifny M, El-Shazly M, El-Osaily M, El-Otiefy M. Histo-pathologic spectrum in the different methods of arterial microvascular anastomoses: an experimental study in the rat femoral artery. *J Chinese Clin Med* 2007; 2(12): 661-6.
35. Cooley BC. Murine model of neointimal formation and stenosis in vein grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1180-5.
36. Lidman D, Daniel RK. The normal Ealing process of microvascular anastomoses. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1981; 15: 103-10.
37. Qingbo X, Sata M, Nagai R. Mouse models of vein grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 185-7.

Reimpresos:

Dr. Rodrigo E. Elizondo Omaña
Departamento de Anatomía Humana
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Nuevo León
Av. Madero y Dr. Aguirre Pequeño s/n
Col. Mitras Centro, 64460, Monterrey, N.L.
Correo electrónico: rod_omana@yahoo.com

*Recibido el
Aceptado el*



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

A QUIEN PUEDA INTERESAR

Las Dra. M^a Carmen González García, Dra. Silvia M. Arribas Rodríguez y el Dr. Luis A. Condezo-Hoyos, del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, hacen constar el siguiente informe relativo a la estancia de académica del Químico Clínico Farmacéutico Lic. Don **Sergio Everardo Velázquez Gauna**, doctorando del Programa de Doctorado en Ciencia Médicas (Ciencia Morfológicas) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, México.

Don **Sergio Everardo Velázquez Gauna** realizó una estancia de investigación entre el 10 de junio al 30 de julio de 2011. Durante la misma participó con gran aprovechamiento académico e investigador en varias actividades que realiza nuestro grupo de investigación. En primer lugar, aprendió los fundamentos teórico-prácticos de las técnicas utilizadas en nuestro equipo de investigación, entre los que se incluyen:

- Métodos bioquímicos para la cuantificación de colágeno y purificación de elastina.
- Técnicas de valoración de actividad de enzimas de defensa antioxidante (glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa) en muestras de plasma.

Una vez aprendidas las técnicas básicas, Don **Sergio Everardo Velázquez Gauna** participó en el proyecto de investigación RESTRICCIÓN NUTRICIONAL DURANTE LA GESTACIÓN Y LA SALUD CARDIOVASCULAR DE LA DESCENDENCIA: ESTUDIO EXPERIMENTAL, realizando las siguientes tareas:

- Purificación de elastina en aorta de rata mediante el método de extracción alcalina.
- Participación en la puesta a punto de un nuevo método de cuantificación de colágeno mediante DOT BLOT.
- Estudio de las propiedades mecánicas pasivas de segmentos de aorta y de elastina purificada mediante medida de la tensión isométrica.

También participó en la valoración de enzimas de defensa antioxidante en plasma de pacientes con insuficiencia venosa crónica, dentro del proyecto de investigación: BIOMARCADORES DE DAÑO VASCULAR PARA EL DIAGNÓSTICO PROCOZ DE LA INSUFICIENCIA VENOSA.

Don **Sergio Everardo Velázquez Gauna** mostró siempre un gran entusiasmo e iniciativa en la realización de los experimentos, interesándose también por aspectos no previstos en su formación inicial. Ello, unido a su gran capacidad de integración en el equipo y su sociabilidad,

le ha permitido ponerse en contacto con otras técnicas experimentales que el equipo de investigación utiliza habitualmente, en concreto las técnicas de medida de la presión intraarterial en el animal anestesiado.

También queremos destacar que a lo largo de toda su estancia Don **Sergio Everardo Velázquez Gauna** ha demostrado un elevado grado de responsabilidad en las tareas que se le han encomendado, lo que ha llevado a buen término las tareas experimentales y nos ha permitido avanzar en la investigación relativa a las alteraciones de la matriz extracelular inducidas en la descendencia de ratas sometidas a restricción nutricional durante la gestación. Fruto de su estancia se han enviado dos comunicaciones al Congreso Internacional LIAC, 2011:

- A dot-blot based assay to quantify collagen in NaOH extracts from large arteries
- A Plasmatic Oxidative Stress Global Index in Early Stages of Chronic Venous Insufficiency

Por todo lo anteriormente expuesto, queremos hacer constar el buen aprovechamiento científico que Don **Sergio Everardo Velázquez Gauna** ha tenido durante su estancia, lo cual nos permite confirmar la aceptación de una segunda estancia investigadora de seis meses de duración que, en principio, podrá realizar el Lic. Velázquez-Gauna en nuestro Laboratorio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UAM, durante el próximo año 2012.

Y para que así conste, firmamos el presente Informe favorable en Madrid, a 9 de septiembre de 2011


Dra. Mª Carmen González García,


Dra. Silvia M. Arribas Rodríguez


Dr. Luis A. Condezo-Hoyos

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid
C/ Arzobispo Morcillo 2
28029-Madrid
Tel: (+34) 914975475
FAX: (+34)914975478



La Sociedad Mexicana de Anatomía A.C. y la Escuela de Medicina de la
Universidad Quetzalcóatl en Irapuato

Otorgan la presente:

CONSTANCIA


a:

Quiroga Garza A, Delgado Brito M, Bazaldua Cruz JJ, Velázquez
Gauna SE, Elizondo Omaña RE, Guzmán López S.

por la presentación de su trabajo

**NUEVO MODELO MICROQUIRÚRGICO PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA
MORFOLÓGICA ADAPTATIVA DE INJERTOS VENOSOS**

XXIII CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA "Congreso del Bicentenario", efectuado en
Irapuato, Gto, del 5 al 8 de octubre de 2010


DR. MANUEL ÁNGELES CASTELLANOS
PRESIDENTE DE LA SMA


DR. LUIS FERNANDO PEÑA FUNG
DIRECTOR DE LA EM UQI



Facultad de Medicina, UANL

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Subdirección de Investigación otorga
la presente

CONSTANCIA

a:
Est. Cynthia Guadalupe Reyes Hernández, M.C. Sergio Everardo Velázquez Gauna, Dr. Juan José Bazaldúa Cruz, Dr. José Miguel Hinojosa Amaya, Dr. C. Rodrigo Elizondo Omaña, Dr. med. Santos Guzmán López

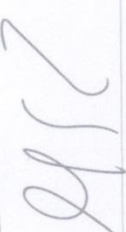
por la presentación **ORAL** del trabajo titulado:

"ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA ARTERIA RADIAL EN EL ANTEBRAZO Y SU IMPLICACIÓN EN LA CIRUGÍA DE REVASCULARIZACIÓN MIOCÁRDICA."

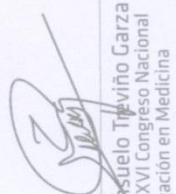


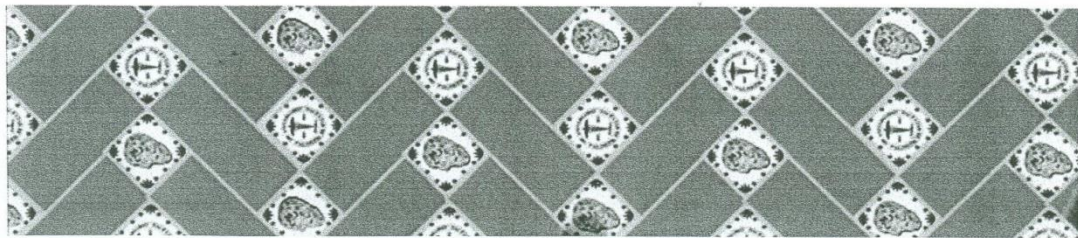
Llevado a cabo del 22 al 24 de Septiembre de 2011
en Monterrey, NL, México
"Alere Flammam Veritatis"


Dr. med. Santos Guzmán López
Director


Dr. C. Guillermo Elizondo Riojas
Secretario de Fomento a la Investigación


Dr. med. José Gerardo González
Subdirector de Investigación


Dr. med. Consuelo Treviño Garza
Coordinadora XXVI Congreso Nacional
de Investigación en Medicina



XIX Reunión Nacional de Morfología

CLXXX Aniversario de la Fundación de la Facultad de Medicina de la BUAP

La Sociedad Mexicana de Anatomía y la Facultad de Medicina de la BUAP otorgan la presente

CONSTANCIA

a:

**REYES HERNÁNDEZ C.G., VELÁZQUEZ GAUNA S.E., BAZALDUA CRUZ
J.J., HINOJOSA AMAYA J.M., ELIZONDO OMAÑA R.E., GUZMÁN LÓPEZ S.**

Por haber obtenido el primer lugar en la **SESIÓN DE ANATOMÍA** en la modalidad **ORAL** del trabajo:

ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LA ARTERIA RADIAL EN EL ANTEBRAZO Y SU IMPLICACIÓN EN LA CIRUGÍA DE REVASCULARIZACIÓN MIOCÁRDICA

H. Ciudad de Puebla de Zaragoza del 5 al 8 de octubre de 2011

Dr. Miguel A. Herrera Enríquez
Presidente SMA



Dr. Rosendo Briones Rojas
Fac. Med. BUAP