

Tesis para obtener el título de cirujano plástico reconstructivo reconocido por

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

TITULO

Tratamiento de colgajos isquémicos miocutáneos de recto abdominal (TRAM) con
células madre de la grasa; modelo experimental en ratas

Autor: Carlos Gerardo Alfaro Moreno.

Hospital general "Rubén Leñero"

Secretaria de salud gobierno del Distrito Federal.

Año de presentación 2007.

Profesor titular curso de post grado U.N.A.M.: Jorge González Rentería

Asesor del trabajo: Dr. Enrique Rodríguez Patiño



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios y a mi maestro que me dio estas alas de plástico para volar.....

A mi madre que extraño mucho, gracias a mi familia y amigos que siempre estuvieron y están conmigo.

Índice

- I. Portada
agradecimientos
- II. Introducción
Historia de las células madre
Células madre de la medula ósea
Células madre de la grasa
- III. Hipótesis de trabajo
- IV. Objetivos
Objetivos particulares

Objetivos generales
- V. Diseño experimenta
Requerimientos de beaterio
Obtención de las células madre
Cultivo celular
Fase experimental
Fase control
Eutanasia
- VI. Material y métodos
Biot erío
Quirófano
Cultivos
- VII. Resultados
Grupo control
Grupo experimental
- √III. Discusión
Antecedentes de la literatura
Comparación de resultados
- IX. Bibliografía

Palabras clave: cirugía plástica, células madre, estudio experimental, colgajos miocutáneos, isquemia

Introducción.

Los colgajos son elementos ampliamente usados para reconstruir diversos defectos resultado de trauma, alteraciones congénitas, resecciones tumorales y por otras etiologías. Dentro de las complicaciones mas frecuentes la necrosis parcial se ha reportado hasta de 31% ⁽¹⁾ de los colgajos músculo cutáneos usados para reconstrucción mamaria, cabeza y cuello. El colgajo musculocutáneo transversal de recto abdominal se ha documentado que la porción lateral puede comprometerse, resultando en necrosis grasa y cutánea, por eso se ha diseñado en ratas un colgajo análogo para su correlación con modelos humanos para probar hipótesis en fenómenos de retardo, isquemia reperusión y otras ⁽²⁾.

La isquemia involucra muchas variables, para la interrupción aguda o crónica de aporte en el tejido, ocasionado por la falta de un adecuado flujo arterial, venoso o ambos. Esto por una mala técnica o condiciones propias del tejido que dañen la microvasculatura como tabaquismo, diabetes mellitus, trauma o enfermedad vascular periférica.

Esta condición en la que se encuentran múltiples pacientes a llevado al estudio mas minucioso en la formación de nuevos vasos sanguíneos o neovascularización, en la actualidad se sabe que ocurre de dos formas; la primera es la angiogénesis , donde hay la extensión de microvasos de una red vascular existente. La segunda por vasculogénesis, formación de vascularidad de sus progenitores endoteliales que se diferencian in situ. Este último se cree que sucede únicamente en el desarrollo embrionario, pero investigaciones recientes prueban que de hecho sucede en el

sistema vascular adulto ⁽³⁾. En ambos procesos es esencial la producción de factores de crecimiento, la supervivencia de células y progenitores endoteliales inhibiendo su apoptosis, mas el reclutamiento de pericitos que estabilizan la red vascular ⁽⁴⁾. De ahí la intención de buscar aumentar in situ la cantidad disponible de factores de crecimiento y células progenitoras para asegurar una revascularización mas eficaz.

Actualmente la ingeniería tisular puede proporcionar las células madre autólogas o post embrionarias, que fueron aisladas por primera vez de la medula ósea en la rata por Friedenstein y colaboradores ⁽⁵⁾ . Ellos describieron la separación y cultivo de células parecidas a fibroblastos y su diferenciación hacia osteocitos. Deduciendo que son progenitoras, celulares relativamente indiferenciados con la habilidad de desarrollar con el adecuado estimulo diferentes líneas celulares especializadas, auto renovarse y ser viable en cultivo a largo plazo.

Por otra parte las células madre embriológicas presentan esta misma característica; sin embargo, es problemática la investigación por las implicaciones éticas y las restricciones gubernamentales.

En contraste el tejido las células madres “autólogas” son naturalmente inmuno - compatibles y no existe restricciones éticas para su estudio. Estas células madre de adultos se han aislado de varios tejidos incluyendo sistema nervioso central, retina, músculo esquelético, piel, medula ósea, esta ultima la mas común. A pesar de ser muy dolorosa su obtención y solo de 10 a 25 mililitros de medula ósea se aspiran de un ser humano, y al procesarlas representan solo hay cerca del 0.0001% de la población de células nucleadas en esta. Esto sin menospreciar el riesgo de infección o supresión medular ⁽⁶⁾.

Fue hasta que Zuk y Zhu ⁽⁷⁾ procesaron el lipoaspirado de pacientes obtenido bajo anestesia local, utilizando una modificación del método de Björntorp para obtener la fracción vascular del estroma ⁽⁸⁾. Demostrando el aislamiento de células madres en la grasa y realizando su expansión in Vitro diferenciándolas a diferentes líneas celulares. De acuerdo a que las células de la grasa provienen embriológicamente del mesodermo y contienen una población celular estromal heterogénea y fácilmente separable, aunque se pensaba tradicionalmente que la grasa esta compuesta de adipocitos, pre adipocitos, células endoteliales y pericitos. Por la población obtenida del procesamiento del lipoaspirado nos referimos a las células remanentes “parecidas a fibroblastos”. Esta es una composición heterogénea con morfología de fibroblastos en cultivo y tiene la capacidad de diferenciación, que no se limita solo a grasa. Son autólogas, inmunocompatibles y pluripotenciales, demostrando su habilidad in Vitro de diferenciarse a líneas condrogénicas ⁽⁹⁾, osteogénicas ⁽¹⁰⁾, miogénicas ⁽¹¹⁾, y adipogénicas ⁽¹²⁾ inclusive células nerviosas ⁽¹³⁾ a pesar de que se creía que estas células solo se diferenciaban al patrón mesodérmico.

Además demostrando su capacidad de producción de múltiples factores de crecimiento angiogénicos y anti apoptoicos a niveles terapéuticos como son: factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento hepático (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblastico básico (bFGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

Estos hallazgos descubre muchas posibilidades para el cirujano plástico ya que la liposucción ha crecido en popularidad y con la nueva instrumentación se ha vuelto muy seguro y reproducible. Es el procedimiento estético mas realizado en el mundo; aunque

su objetivo original era retirar la grasa no deseada, puede establecerse actualmente como la forma ideal de obtener células madres autólogas para intervenir en la regeneración tisular.

Resumen: Tratamiento de colgajos isquémicos miocutáneos de recto abdominal (TRAM) con células madre de la grasa; modelo experimental en ratas

En este estudio se intentó establecer los efectos terapéuticos de las células madre de la grasa, para salvar colgajos musculocutáneos posterior a isquemia. Se obtuvieron bolsas grasas inguinales en ratas raza Lewis para procesar y aislar la población similar a fibroblastos. 50 Colgajos TRAM se realizaron. Cada colgajo experimental (n=27) recibió células madre y (n=23) únicamente suero de forma aleatoria, posterior a 4 horas de isquemia. En el séptimo día post quirúrgico se valoró el área viable del colgajo. La media del colgajo experimental fue de $(75.66 \pm 9.98\%)$ mientras que el grupo control tuvo un valor de $(26.75 \pm 6.79\%)$. La diferencia fue altamente significativa ($P < .001$). El presente estudio demostró que las células madre de la grasa mejora la supervivencia de colgajos musculocutáneos en modelos experimentales posterior a isquemia.

Palabras clave: Colgajos, células grasa, células madre.

Abstract: Treatment of ischemic TRAM flaps with stem cells from the fat: experimental model in rats

This study attempted to clarify the effects of therapeutic with stem cells from fat for salvaging musculocutaneous flaps after ischemia. Rat inguinal fat pads were isolated and processed from Lewis rats into fibroblast-like cells population. 50 flaps were elevated in experimental group (n=27) received stem cells, and the other group in a random matter

received just serum (n=23), after 4 hour of ischemia each. On the seven postoperative day, the flap survival area was measured. The mean survival area of stem cells flaps was (75.66 ± 9.98%) whereas control flaps showed a survival area of (26.75 ± 6.79%). The difference was highly significant (P=<.001). The present study proved stem cells from fat improved the viability after ischemia in a experimental model.

Key words: flaps, fat cells, stem cells.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. Las células madre de la grasa mejoran la viabilidad en los colgajos musculocutáneos isquémicos.

JUSTIFICACIÓN. Si se comprueba la utilidad en la aplicación de las células madre de la grasa, para mejorar la irrigación de tejidos isquémicos, permite desarrollar modelos clínicos aplicables a pacientes con heridas crónicas o tejidos con algún tipo de déficit circulatorio, en base al empleo de sus mismas reservas grasas con fines terapéuticos no únicamente estéticos. Esto mejora el pronóstico, consecuentemente reduce el gasto, de recursos empleados para el tratamiento y manejo de pacientes con patologías que afectan la cicatrización como diabetes mellitus, heridas crónicas, úlceras por presión, etc. Mejorando su calidad de vida.

HIPÓTESIS. Si las células estromales de la grasa producen factores de crecimiento angiogénicos en condiciones de isquemia y si las células endoteliales necesitan estos factores para sobrevivir entonces las células madre de la grasa mejoran la viabilidad de los colgajos isquémicos

OBJETIVO GENERAL.

Conocer el efecto local que tiene la aplicación de células madre de la grasa, en la sobrevivencia de los colgajos musculocutáneos isquémicos de la rata.

Objetivo particulares

- Obtener la grasa de la rata para aislar las células madre y cultivarlas.
- Realizar colgajos musculocutáneos en ratas sometidos a isquemia, con casos controles y un grupo experimental experimental aleatoriamente.
- Determinar diferencia estadísticas significativas entre los colgajos isquémicos control y experimental.

- Identificar los factores y conclusiones que desde el punto de vista experimental influenciaron el resultado final obtenido.

Material y métodos

Universo de estudio.

Cincuenta ratas hembra raza Lewis, con genoma fijó después de 16 generaciones sucesivas, con un coeficiente teórico de consanguinidad superior a 0.998, pesando de 300 a 400 gramos.

DISEÑO.

Comparativo, doble ciego, experimental, prospectivo y transversal

Tamaño de la muestra.

Estudio comparativo, Se espera encontrar en el grupo experimental 70% de tejido viable contra 30% en el grupo control. Número de grupos 2, número de casos por grupo 27 con corrección de continuidad y 23 sin corrección de continuidad. Con nivel alfa de $P < 0.05$ y potencia de la prueba de 95%.

Definición de variables

Células madre o estromal: Grupo celular aislado de la fracción vascular del estromal en un compartimento graso de una muestra de ratas hembra Lewis, mostrando una morfología parecía al fibroblasto en cultivo y tanto en vivo como in Vitro muestran capacidad pluripotencial de diferenciación a líneas celulares diversas.

Sexo: Únicamente se emplearon sujetos hembra para el experimento.

Peso: Rango 300 a 400 gramos.

Isquemia: Disminución transitoria del riego sanguíneo en el colgajo (TRAM), producida por una interrupción del flujo arterial y venoso durante cuatro horas. Cuantificando niveles séricos de creatinfosfo cinasa CPK inicial y a las 24 horas, para su estudio.

Tejido viable: Porción de tejido visualmente de color rosado, suave, que sangra al corte.

Capilares: Tejido formados por células endoteliales, que son aparentes con tinción hematoxilina eosina, bajo campos de alta resolución (40 x).

Cambios nucleares irreversibles:

Cariólisis :Desvanecimiento de la basofilia de la cromatina

Picnosis: Caracterizado por contracción nuclear y aumento de la basofilia. Cariorrexis: Desaparición del núcleo o desfragmentación.

Apoptosis: Masa redondeada núcleo pequeño y denso, con un citoplasma intensamente eosinofílico, formación cuerpos apoptoicos (fragmentación nuclear e intensas circunvolución de la superficie celular)

Se midió una escala nominal por campo (40x).

Independientes.		Dependientes.	
Variable	Escala	Variable	Escala

Células madre	Nominal	Niveles de CPK	Intervalo
Sexo	Nominal	Tejido viable	Intervalo
Peso	Intervalo	Capilares	nominal
		Cambios nucleares	nominal
		irreversibles	

Criterios de selección:

Criterios de Inclusión.

Todas las ratas de la raza Lewis hembra , pesando de 300 a 400 gramos sanas, sometidas al levantamiento colgajo TRAM, que sobrevivan 5 días, que no muestren otra manipulación que la experimental de la zona del colgajo.

Criterios de exclusión.

Todos los sujetos experimentales que muestren alteración anatómica a nivel abdominal.

Criterios de eliminación. Todas los sujetos que presenten alguna complicación anestésica. Muerte o presencia de alguna enfermedad durante el procedimiento o dentro de los primeros cinco días.

Descripción de procedimientos.

Se usaron 50 ratas hembra raza Lewis pesando de 300-400 gramos. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo al reglamento de la ley General de Salud en

Materia de Investigación para la salud y al comité de ética e investigación del Hospital General “Rubén Leñero”.

Cada animal se mantuvo en jaulas individuales en un ciclo de 12 horas luz-oscuridad, y alimentadas con nutrición estándar para ratas y agua ad libitum. Bajo anestesia de aplicación intra muscular de ketamina (50 mg/Kg) y xylazina (5mg/Kg) , se obtuvo de 10 ratas previo rasurado de la zona y bajo técnica estéril se resecaron las bolsas de grasa inguinal del lado izquierdo, sin lesionar la vasculatura subyacente. Este tejido se lavo exhaustivamente con solución estéril PBS (buffer fosfato salino) para remover los detritos y las células rojas. Luego es digerida en colágenasa tipo I al 0.075% con PBS, en una agitación gentil por treinta minutos a 37 grados centígrados. Posteriormente se neutraliza la actividad enzimática con medio Dulbenco modificado por Eagle (DMEM), con 10% suero fetal bovino y el infranadante es centrifugado a 1200 x g por 10 minutos. El concentrado celular es resuspendido en buffer para lisis de células rojas 160 mM NH₄Cl para luego filtrarse a través malla de 100 μm. El conteo celular y viabilidad celular se realizó por exclusión de azul tripán, con la cámara de Neubauer. Se cultivaron a una confluencia de 85%, con una concentración de 10⁶ células por 100 mm².

Todos los colgajos se levantaron de forma aséptica bajo anestesia usando aplicación intra muscular de ketamina (50 mg/Kg) y xylazina (5mg/Kg.). Inyecciones adicionales se realizaron durante la cirugía. Posterior a rasurar y lavar el abdomen, se diseñó y levantamiento de un colgajo derecho cefálico (3 x 8 cm) entre ambas líneas axilares y el margen costal al punto medio del abdomen. Se levanto primero la isla de piel y después es músculo recto abdominal derecho del peritoneo y seccionándolo

cranealmente, con la ayuda de un microscopio quirúrgico se esqueletizó un solo pedículo: arteria y vena epigástrica inferior, mientras que los otros son ligados con sutura nylon 6-0.

Ambos grupos se sometieron a una isquemia mediante colocación de un clamp vascular por cuatro horas. En la reperfusión todos los grupos se verificó el flujo arterial por sangrado de la arteria epigástrica superior ipsilateral y posteriormente fue nuevamente ligada.

De forma aleatoria sin conocimiento del cirujano se inyectó con una aguja de 26 gauge intra muscular y subcutáneamente 0.5 ml. de suero, en 27 de los sujetos contenía una alícuota con células estromales a una concentración de 1×10^6 suspendidas en suero y en 23 ratas únicamente el vehículo. Al término de la isquemia se recoloca el colgajo interponiendo un segmento igual al colgajo de látex estéril para prevenir la inosculación y se sutura al lecho con sutura continua nylon 5-0.

Todas las ratas recibieron una única dosis de gentamicina 4 mg/kg. intramuscular, todos la muestra inicio la alimentación el mismo al recuperarse de la anestesia.

Previo a la inducción anestésica y en un plazo de 24 horas se tomaron muestras séricas en toda los sujetos experimentales por punción no traumática, para determinación cuantitativa de creatinfosfocinasa (Chem-biolab Inc.) mediante un proceso automatizado en el espectrofotómetro del laboratorio clínico del hospital.

Los animales cursaron el post operatorio en jaulas individuales con cascos para evitar lesionaran la zona operada. Al séptimo día fueron anestesiados para levantar los colgajos con tejido viable y necrótico, y la eutanasia se realizó aplicando una dosis letal de pentobarbital intraperitoneal 100 mg/Kg.

Los colgajos fueron pesados en una báscula analítica (Ohaus Analytical plus) calibrada a una sensibilidad de 0.01 a 0.1 Mg. Se peso el colgajo sin desbridar y desbridado de la porción visualmente necrótica. El porcentaje de colgajo viable se cálculo con la siguiente formula: Colgajo viable (%)= (Peso de la porción viable/ peso total del colgajo)x 100.

Para cada colgajo la zona viable se conservo en bloques de 34 mm en formol, se realizaron cortes de 4 micrómetros y embebidos en parafina para su tinción hematoxilina y eosina para análisis histológico. Se tomo una medición cuantitativa de la neovascularización midiendo el número de capilares y los cambios nucleares irreversibles por campo de alta resolución con magnificación (40 x). Todos los datos se obtuvieron sin que el patólogo o el investigador tuvieran conocimiento del grupo analizado.

VALIDACIÓN DE DATOS.

Se utilizo estadística inferencial mediante el software SPSS (Statistical Packages for Social Sciences, versión 10.0) al tener dos grupos independientes con escalas de intervalo se aplico t de Student para mostrar diferencia significativa entre la supervivencia del colgajo, CPK . Los cambios histológicos se empleo la prueba de Chi cuadrada con la correlación de Spearman. El nivel de significancia para rechazar la hipótesis nula (Ho) fue de $p < 0.05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título séptimo. De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Capítulo único. Artículos 121-126

RESULTADOS

Entre la muestra empleada de 50 ratas Lewis hembra, con una media de peso 366 gramos de peso, no se eliminó ni se excluyó, ningún sujeto experimental durante el proceso. En el día siete post operatorio se observaba claramente la diferenciación entre la región no viable y la viable, esta última con una apariencia rosada, de textura normal, y de fácil sangrado al corte. En contraste, con la zona necrosada, de coloración negra, rígida y que no sangraba a la manipulación. La media \pm desviación estándar del porcentaje de tejido viable en el grupo control fue de $(26.75 \pm 6.79\%)$ en contraste con el grupo experimental (75.66 ± 9.98) resultando significativa la diferencia ($P < .001$) entre ambos. Una comparación de ambas medias del porcentaje del área de piel viable (Grafica 1). Los niveles séricos de CPK basal en ambos grupos tuvo una media para ambos grupos de 45 U/L. La comparación entre los niveles a las 24 horas tuvo una media \pm desviación estándar de en el grupo control $(1811 \pm 1148 \text{ U/L})$ y el grupo experimental (2173 ± 998) . En este intervalo no fue posible rechazar la hipótesis nula, obteniendo un valor de ($P = 0.239$).

Hallazgos histológicos. El tejido procesado estudiado viable al cuantificar el número de capilares exhibió una diferencia porcentual en la presencia de capilares en el grupo experimental 44.4% de los sujetos presentó 4 capilares (imagen 1: Tinción H y E 40x, se distinguen cuatro vasos de neoformación de los vasos ya existentes por las características del endotelio), en cambio el grupo control presentó 60.9% únicamente un capilar (imagen 2: Tinción H y E, se observa solo un capilar congestivo, infiltrado

celular y deshilachamiento muscular) , realizando la prueba de Chi-cuadrada y la correlación de Spearman de <0.001 . siendo significativa (Grafica 2). Los cambios celulares irreversibles se obtuvo una diferencia significativa en la comparación de ambos grupos Chi cuadrada = 0.005 con una correlación de Spearman <0.001 (grafica 3).

Discusión. Se ha realizado en los últimos 20 años un incremento del conocimiento en mecanismos celulares y moleculares de la angiogénesis, ahora se considera como un proceso dinámico que involucra múltiples células y factores de crecimiento. Iniciada con un aumento de la permeabilidad, producido por sustancias como óxido nítrico y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este último conocido inicialmente como “factor de permeabilidad vascular” producido por: macrófagos, queratinocitos, fibroblastos y células madre. Actúa específicamente en las células endoteliales uniéndose a receptores de alta afinidad (VEGF 1,2 3) ¹⁴. Zhang y colaboradores¹⁵ examinaron el efecto del tratamiento pre operatorio con plásmidos para la producción de VEGF, en un modelo de colgajo TRAM en ratas. Demostrando un incremento significativo en la cantidad de nuevos vasos y la viabilidad del colgajo en comparación grupo control. Si efectivamente el trauma vascular produce reclutamiento de progenitores endoteliales en la circulación destinado a los tejidos lesionados, al igual que el aumento del nivel de factor de crecimiento (VEGF), mostrando una fuerte relación y probablemente un efecto terapéutico inicial de este polipéptido se da por el reclutamiento de estas células.

Es lógico pensar entonces que la vasculogénesis ¹⁶ terapéutica tenga más ventajas sobre el abordaje terapéutico angiogénico basado exclusivamente en la aplicación de factores de crecimiento. En un modelo experimental para la reparación de miocardio isquémico con la inyección directa de células estromales derivadas de la médula ósea porcina, Amado⁽¹⁷⁾ observó un efecto medible funcional hemodinámico e histológico, con una reducción del área de fibrosis. Mediante un catéter de angioplastia produjo por 60 minutos una oclusión de la arteria coronaria anterior descendente seguida de

reperfusión. Realizaron un seguimiento de la integración de estas células a la zona infartada mediante resonancia magnética e inmunohistoquímica a más de 8 semanas mostrando su integración a zonas tanto musculares como vasculares cerca de la zona infartada. La reducción de la zona infartada fue significativamente menor comparado con el grupo placebo (P= 0.008 vs. placebo), Concluyendo que las células madres mesenquimatosas insertadas en zona isquémica muscular cardíaca son capaces de integrarse y expresar proteínas exclusivas de miocardio, endotelio vascular y músculo liso, reduciendo la extensión del infarto y promoviendo la regeneración cardíaca.

Estos hallazgos claramente muestran el beneficio de la aplicación de células madre en músculo isquémico e incluso con necrosis. Rehman ⁽¹⁸⁾ por su parte mostró la capacidad de las células madre de la grasa humanas previamente descritas por Zuk y Zhu en el 2001⁽⁷⁾, en su producción de múltiples factores de crecimiento angiogénicos y anti apoptóticos, como son: factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento hepático (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), a niveles terapéuticos. Inclusive expusieron estos cultivos en ambientes hipoxicos, demostrando la capacidad celular de responder en ambientes de baja concentración de oxígeno incrementando su producción de factores angiogénicos. Miranville ³ aisló de la fracción estromal de la grasa humana células que se comportan como progenitores endoteliales y se integran en la vascularidad promoviendo la neovascularidad en extremidades isquémicas en ratas. Esto redondea la capacidad de las células de la grasa para funcionar al igual que los elementos de la médula ósea como terapéuticas en modelos donde la vascularidad es deficiente.

En el presente estudio se empleo un modelo experimental ya validado de un colgajo pedículado musculocutáneo^{2,15}. Aunque la extrapolación en un modelo humano no es del todo aplicable, se pudo establecer una mejoría estimable al comparar la viabilidad del colgajo isquémico. Lo anterior empleando los depósitos grasos que en la generalidad de los pacientes manejados por el cirujano plástico son muy abundantes inclusive en personas con bajos índices de masa corporal, dejando a un lado la necesidad de cultivos celulares como en el uso de células madre de la medula ósea.

A pesar de que no se observo una mejoría significativa estadística en los niveles de CPK en comparación del grupo experimental y control. En este modelo no se tuvo el objetivo de valorar la lesión por isquemia- reperfusión ; únicamente realizar un reestablecimiento del flujo sanguíneo previo a una isquemia que es una entidad clínica frecuente en distintas situaciones para el cirujano plástico.

El cumplimiento de esto fue constatado por la elevación de los niveles de una enzima que se encuentra confinada al interior de la membrana celular, y su elevación se correlaciona con peroxidación lipídica de esta por radicales libres y pérdida de su selectividad filtrante¹⁹. Al no haber diferencia en la comparación de la elevación de CPK, se puede intuir que la exposición a isquemia fue equiparable tanto en grupo control como en el experimental. Pero no así, se puede generalizar que las células madre no mejoraron la respuesta a la isquemia por tener la misma elevación enzimática a las 24 horas, debido a que la enzima ya liberada no disminuirá aunque haya mejoría clínica en este lapso. Sin embargo se tradujo en menos cambios irreversibles celulares y mayor número de capilares en el estudio histológico de la muestra experimental comparada con el control.

El mecanismo para la formación de capilares y su origen en este caso no puede ser establecido con certeza a pesar de conocer la capacidad de las células madre de diferenciarse a progenitores endoteliales e integrarse en tejidos isquémicos como muestra la literatura. Inclusive el solo estímulo de isquemia libera factores de crecimiento angiogénico que puede ocasionar esto, pero no da la diferencia cuantitativa observada entre ambos grupos. Se deduce fuertemente que la neovascularización ocurre al reclutar células progenitoras o madre, es importante mencionar que tampoco se determinó el destino de cada célula inyectada en el colgajo como ya se ha realizado en otros estudios, en cambio se diseñó un modelo experimental no planteado en otra literatura para colgajos miocutáneos donde se estudió su aplicación y efecto. En una forma que es factible plantear con otros parámetros adecuados en aplicaciones clínicas utilizando la grasa propia de cada paciente para estos fines.

Conclusiones

Este estudio demuestra que se puede incrementar la viabilidad de colgajos isquémicos aumentando el lecho vascular de la herida, reclutando células madre de la grasa en la rata. Aunque no se puede extrapolar a un sujeto humano, plantea la facilidad y sin riesgo de aplicar células madre aisladas del compartimento del individuo para manejo de heridas con compromiso vascular, sin embargo se requieren mayores estudios para emplear este tejido en forma terapéutica y rutinaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Carlson GW. Breast reconstruction: surgical options and patient selection. *Cancer* 1994;74:436–439
2. Sano K, Hallock G, Rice, DC. A vertical midline scar is a high-risk factor for maximum survival of the rat TRAM flap. *Plast Reconstr Surg*. 2003;51:403-408.
3. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 110(3):349-355, July 20, 2004.
4. Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:887-893.
5. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6:230.
6. Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick M, Benhaim P. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plastic Reconstr Surg*. 2002;109:1033-1041.
7. Zuk P, Zhu M, Hiroshi M, Huang J, Futrell JW, Katz A, “et al”. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. 2001;7:211-225.
8. Bjorntorp P, Majvor K, Pertoft H, Pettersson P, Sjöström L, Smith U. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. 1978;9:316-324.

9. Huang J, Zuk P, Jones N, Zhu M, Lorenz H, Hedrick M, Benhaim P. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plastic Reconstr Surg.*2004;113:585-594
10. Dragoo J.L, Lieberman J, Lee R.S, Deugarte, Dan A, Lee Y, Zuk P,et al. Tissue-Engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plastic Reconstr Surg* 2005;115:1665-1673.
11. Mizuno H, Zuk P, Zhu M, Lorenz P, Benhaim P, Hendrick. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plastic Reconstr Surg.* 2002; 109:210-211.
12. Lee J, Parrett B.M, Conejero J.A, Laser J, Chen J, Kogon A,et al. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 2003;50:610-617.
13. Ashjian P, Elbarbary A, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk P, Lorenz P, Benhaim P, Hedrick M. In Vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plastic Reconstr Surg* 2003;111:1922-1931.
14. Efron P, Moldawer L.L. Cytokines and wound healing: The role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. *J Burn Care Rehabil* 2004;25:149-160.
15. Zhang F, Yang F, Hu E.C., Sones W, Lei M, Lineweaver W.C. Vascular endothelial growth factor gene therapy in improvement of skin paddle survival in a rat TRAM flap model. *J Reconstr Microsurg* 2005;21: 391-396.
16. Tepper O.M., Galiano R, Kalaka C, Gurtner G.C. Endothelial progenitor cells: The promise of vascular stem cells for plastic surgery. 2003;111:846-854.
17. Amado L.C, Saliaris A.P, Shuleri K, St Jhon M, Xie J, Cattaneo S, “et al”. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Circulation* 2005;102: 11474-11479

18. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove C, Bovenkerk J, "et al". Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109:1292-1298.

19. Deune E.G., Koopman R, Smith M.E., Hong S, Ozbek M.R. Khouri R. Prevention of ischemia-reperfusion injury with a synthetic metalloprotein superoxide dismutase mimic, sc52608. *Plastic Reconstr Surg* 1996;98:711-718.