



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado

Instituto Mexicano del Seguro Social
Unidad Médica de Alta Especialidad
Hospital "Dr. Antonio Fraga Mouret"
Centro Médico Nacional "La Raza"

**Factores que influyen en la sobrevida del injerto graso
en un modelo animal**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA**

PRESENTA: DR. FRANCISCO VLADIMIR ROJAS AGUILAR

ASESORES DE TESIS

DR. PEDRO GRAJEDA LÓPEZ

DRA. EVA RAMÓN GALLEGOS

DRA. MARÍA DEL ROSARIO MORA CAMPOS



MÉXICO D.F. febrero 2014



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.

DR. JESÚS ARENAS OSUNA

Jefe de la División de Enseñanza e Investigación Médica
Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”

Centro Médico Nacional “La Raza”

DR. PEDRO GRAJEDA LÓPEZ

Jefe del Departamento de Cirugía Plástica y Reconstructiva
Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”

Centro Médico Nacional “La Raza”

DR. FRANCISCO VLADIMIR ROJAS AGUILAR.

Residente de Sexto Año Cirugía Plástica Reconstructiva
Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret”

Centro Médico Nacional “La Raza”

Número de registro final CLIS: R-2014-3501-23

ÍNDICE

I. RESUMEN	4
II. ABSTRACT	5
III. ANTECEDENTES	6
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	18
V. RESULTADOS	28
VI. DISCUSIÓN	43
VII. CONCLUSIONES	47
VIII. BIBLIOGRAFIA	48
IX. ANEXOS	51

Resumen

Título: Factores que influyen en la sobrevida del injerto graso en un modelo animal.

Materiales y métodos: Se desarrolló un estudio *in vivo* mediante la toma de tejido graso de la región inguinal de 2 ratones NU/NU donadores y con técnica abierta se aplicó en el dorso, a 3 ratones NU/NU receptores. Posterior, a 9 semanas, se sacrificaron. Se determinó el volumen, peso, angiogénesis y las características del tejido, mediante histología e inmunohistoquímica. Nos sujetamos a la NOM-062-ZOO-1999.

Resultados: El modelo con ratones NU/NU es un modelo válido, reproducible y adecuado para estudiar el injerto graso ya que presenta similar variabilidad de sobrevida (ratón I, -31,57 %, ratón II, -63,41 y ratón III, + 436%) como los humanos y las mismas características histológicas en el injerto en tinciones de rojo oleoso y Hematoxilina-Eosina. La variabilidad en el volumen del injerto graso de los 3 ratones fue significativa $p= 0,004$. No se encontraron diferencias en el peso inicial y final de los ratones $p= 0,184$. No se encontró diferencia en la densitometría (CD34 $p=0,196$ y PECAM $p= 0,721$).

Conclusiones: El ratón NU/NU es un modelo adecuado para la aplicación de aloinjertos, ya que presenta una respuesta similar a la sobrevida del injerto graso documentada en humanos. El peso del injerto y del ratón, no son factores para la sobrevida. En próximos estudios sería conveniente valorar, factores externos que permitan mejorar la sobrevida como la movilidad y los que favorecen la angiogénesis.

Palabras clave: Injerto graso, ratón NU/NU, sobrevida, angiogénesis.

Abstract

Title: Factors influencing fat graft survival in an animal model.

Materials and methods: An study was developed in an *in vivo* model by taking fat tissue from the inguinal region of two NU/NU mice donors and by open technique was applied in the back of three NU/NU mice recipients through an incision. Recipient mice were maintained for 9 weeks and then sacrificed. Fat grafts were harvested and then volume, weight, rate of angiogenesis and tissue characteristics were determined by histology and immunohistochemistry. It was submitted to NOM-062-ZOO-1999.

Results: The model with NU/NU mice is valid, reproducible and suitable for assessing the fat graft survival because it had similar variability (mouse I, -31.57%; mouse II, -63.41%; mouse III, +436%) as in humans, and the same histologic features of graft survival in the red oil and HE staining. The variability of fat graft survival between the three mice was significant ($P=0.004$). There was no significant difference in the initial and final weight of the mice ($P=0.184$). No significant difference was found in angiogenesis evaluation by densitometry (CD34 $P=0.196$ y PECAM $P=0.721$).

Conclusions: The NU/NU mice is a valid model suitable for the application of fatty implant since it has a survival rate similar to the documented in human fat graft. The angiogenesis, mouse and graft weight are factors that do not affect fat graft survival. In future studies should be appraised external factors to improve fat graft survival and to determine its importance.

Key words: fat graft, survival, NU/NU mice, angiogenesis

Antecedentes.

Los síndromes de lipodistrofia

Los síndromes de lipodistrofia comprenden un grupo de enfermedades raras y heterogéneas que se caracterizan por la pérdida progresiva de tejido graso, principalmente del compartimento subcutáneo, y que afecta en ocasiones a la grasa visceral [1]. La lipoatrofia puede ser parcial, localizada, o generalizada. Éstos últimos se acompañan de trastornos relacionados con el metabolismo, incluyendo la resistencia a la insulina, diabetes mellitus, hiperlipidemia, enfermedad hepática progresiva y estado anabólico. El tratamiento para la lipodistrofia se ha incrementado en los últimos años debido a una nueva población los pacientes que tienen lipoatrofia asociada al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [2]. Son mucho más numerosos que los pacientes afectados por entidades de lipodistrofia clásicos.

Esta disminución puede ser parcial o completa del tejido adiposo, tanto a nivel localizada o generalizada. La lipoatrofia y lipodistrofia coexisten con frecuencia, y ambos términos son intercambiables. La lipodistrofia implica redistribución de tejido graso, puede ser considerado como un mecanismo de compensación, como el tejido adiposo "saludable" o remanente que se acumula y aumenta su actividad metabólica para preservar las funciones corporales globales [2].

El diagnóstico cuando la afección es subcutánea es clínico, tanto a nivel de mejillas, región temporal, extremidades, en este último haciéndose evidente la musculatura y las venas por la lipodistrofia, pero si ésta es leve hace difícil el diagnóstico principalmente en hombres en los cuales hay una cantidad fisiológicamente baja de tejido graso. A este nivel se requerirá la comparación con tomografía entre muslos sanos.

Las lipodistrofias se acompañan de datos clínicos de resistencia a la insulina, como son acantosis *nigrans* (principalmente en pacientes con peso normal), datos de acromegalia, lesiones de "golpe de sable a nivel facial", aumento de órganos

genitales en niños prepúberes, hiperandrogenismo ovárico que conduce a virilización e hirsutismo [2].

La clasificación de las lipodistrofias incluye tres grandes grupos: generalizadas, parciales y localizadas (zonas aisladas). A la vez estos trastornos se dividen en familiares (hereditarios) o formas adquiridas (Cuadro 1) [3]. Aunque no están claros muchos aspectos de la patogénesis de lipodistrofias, los recientes avances en esta materia son notables. La base genética de muchos síndromes de lipodistrofia heredados ha sido dilucidada por medio de la investigación en biología molecular.

Cuadro 1. Clasificación de las lipodistrofias.

Hereditario	Lipodistrofia congénita generalizada	Tipo 1.
	Lipodistrofia familiar parcial	Tipo 2. Variedad Dunniga Las mutaciones del receptor proliferado de peroxisoma activado
Adquirido	Displasia mandibuloacral	
	Lipodistrofia generalizada adquirida	
	Lipodistrofia parcial adquirida	
	Lipodistrofia en pacientes infectados por el VIH	
	Lipodistrofia localizada	
	Secundario:	Drogas, presión, traumatismo, paniculitis.
	Semicircular lipoatrofia	
	Lipodistrofia centrifugal abdominal	
	Idiopática	

Las causas de la lipodistrofia por VIH, se atribuyen al uso de fármacos inhibidores de proteasas, que han mejorado la supervivencia de estos pacientes pero se asocian a una pérdida selectiva de grasa subcutánea de la cara y extremidades y en algunos pacientes presentan acumulación de grasa alrededor del cuello, región dorso cervical, y abdomen [4]. La toxicidad de los inhibidores de las proteasas se ha demostrado por la reversión parcial de los trastornos metabólicos después de cambiar a otro régimen farmacológico de retrovirales [5].

La terapia para lipodistrofias

La terapéutica debe evaluar tres problemas principales: los cosméticos, el manejo de las enfermedades metabólicas y sus repercusiones sistémicas. Además de tratar la perturbación psicológica, especialmente en los casos generalizados o pacientes con lipoatrofia facial severa, la enfermedad metabólica es la principal causa de morbilidad y mortalidad, por pancreatitis recurrente por hipertrigliceridemia, esteatosis que conduce a la cirrosis hepática, enfermedad vascular aterosclerótica temprana, y complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus [3]. El control metabólico es parte esencial de las repercusiones sistémicas que se pueden desarrollar [2].

Existen terapias que consideran la comprensión actual de la resistencia a la insulina y complicaciones metabólicas. Estas complicaciones son principalmente: la incapacidad para almacenar triglicéridos en los adipocitos o por la reducción en la síntesis o liberación de adipocitos por falta de adipocitos maduros [6].

Anil Agarwal en el 2006 refirió tres estrategias para el manejo metabólico:

- 1) Mejorar la capacidad de almacenar triglicéridos por los adipocitos.
- 2) Reemplazar las adipocinas deficientes.
- 3) Limitar la carga de triglicéridos de la dieta en pacientes con casi total ausencia de tejido adiposo para reducir el almacenamiento aberrante.

La mejora de la capacidad de almacenamiento de triglicéridos se puede lograr mediante [6]:

- a) Trasplante de tejido adiposo
- b) Inducción por el agonista PPAR (receptor activado proliferado peroxisoma).

En estudios experimentales se observó una mejoría en la sensibilidad a la insulina, diabetes y hipertrigliceridemia [7].

La atrofia facial puede requerir técnicas para recuperar un aspecto saludable, con especial interés en el área paranasal, mejillas, temporal y las zonas inferiores. La cirugía reconstructiva ofrece diversas posibilidades, incluyendo implantes de larga duración, el trasplante de grasa autóloga, rellenos y procedimientos quirúrgicos.

En vista de la creciente gama de procedimientos reconstructivos, los intereses comerciales y financieros, y la publicidad no científica sobre muchas de estas técnicas y el hecho de que muchas de ellas no se basan en razones de salud o experimentales sólidas, es obligatorio para aconsejar a los pacientes en términos de expectativas reales sobre el tratamiento más adecuado, los resultados estéticos finales, y efectos negativos a largo plazo. Esto es especialmente importante en la población con lipoatrófica secundaria a VIH, en los que el estrés psicológico puede jugar un papel negativo al elegir la opción adecuada [2].

La dieta no es útil a menos que se recomiende para el control de los trastornos metabólicos. El ejercicio físico puede contribuir a la mejora de la acumulación de grasa intraabdominal y la hipertrigliceridemia, pero se produce a expensas de perder grasa subcutánea. La mayoría de los pacientes buscan asesoramiento médico para compensar la pérdida de grasa facial por medio de procedimientos quirúrgicos [3].

El tratamiento ofrecido para corregir depresiones o variaciones en el volumen facial generalmente tiene por objeto mejorar la estética. Hay varias alternativas para reducir los defectos de la cara como son el injerto dérmico, injerto graso, cartílago o hueso, la inclusión de acrílico y silicón [9]. La elección de la técnica depende de las condiciones del paciente, la esperanza de vida y severidad de la lesión.

Las correcciones con injerto de grasa autóloga son una técnica que tiene la ventaja de una menor relación costo-beneficio, una mejor textura de la piel y los contornos más naturales. Sin embargo, la imprevisibilidad de los resultados debido a la posibilidad de la absorción y la consiguiente pérdida de volumen deseado están siendo factores limitantes para el injerto de grasa [9].

Los injertos de grasa autóloga se realizaron por primera vez por Neuber a finales de 1800 [10]. Desde entonces, se han utilizado para corregir depresiones debido al trauma, enfermedades inmunológicas y el envejecimiento. En la década de 1980, Illouz [11] introdujo la liposucción. Desde entonces, Coleman introdujo métodos para la extracción de grasa autóloga y procedimientos para un injerto graso estructural [12]. En consecuencia, el injerto de grasa autóloga es usado en la actualidad y se acepta como un método estándar en el campo de la cirugía [13].

La grasa autóloga es ventajosa y segura para el cuerpo humano en comparación con los implantes aloplásticos. Sin embargo, tiene la desventaja de que sus efectos no pueden predecirse con exactitud debido a la diferencia en las tasas de absorción, siendo aceptable una pérdida de un 30%. Por consiguiente, en un ajuste clínico, las sobrecorrecciones o retoques de los injertos son comúnmente realizados para resolver estas desventajas [14,15].

De acuerdo con una revisión de la literatura sobre varios tipos de transferencia de tejido, el tejido graso sobrevive a través de la revascularización. Para mejorar la supervivencia es esencial mantener el injerto fijo y estable en el sitio receptor en la

etapa temprana (primeros 4 días), que es cuando se realiza la angiogénesis [16]. Sin embargo, el injerto graso a nivel facial, no es tan exitoso en su integración como en otras áreas por el movimiento de la musculatura de la cara durante la expresión facial. Esto también es acompañado por el proceso problemático de la toma nuevamente de las células adiposas para retocar el injerto y los costos [10,11].

Base teórica de la supervivencia del injerto

Con respecto a una base teórica para la supervivencia del injerto graso, dos opiniones son ampliamente aceptadas:

1) Teoría de la célula huésped: Sostiene que el remplazo de nuevos adipocitos en el huésped ocurre cuando el tejido graso injertado no sobrevive y es sustituido por histiocitos [17].

2) Teoría de la supervivencia: Refiere que algunas células adiposas injertadas se destruyen a través de una respuesta del huésped. Los histiocitos del área receptora desempeñan un papel importante en la captación de lípidos degradándolos, y sólo algunas células adiposas residuales permanecen o sobreviven [17].

Estudios recientes han abogado por ambas opiniones, basadas en la interacción entre el injerto de grasa y el tejido del huésped. Es decir, tanto el injerto de grasa, como el sitio receptor y el tejido huésped, contienen células adiposas maduras y pre-adipocitos. Con el tiempo, se puede presumir que el injerto sobreviviente es una mezcla de células adiposas maduras que sobrevivió después del trasplante y tejido adiposo que se diferencia de los pre-adipocitos del tejido receptor. Dependiendo de la interacción entre el sitio receptor y el injerto de grasa, algunas células adiposas injertadas se eliminan. Sin embargo, también se ha observado que las células injertadas estimulan al entorno del sitio receptor para inducir el desarrollo de nuevas células adiposas a través de la diferenciación y desdiferenciación [18].

El trabajo de Peer señala en su teoría que explica el mantenimiento del volumen de los adipocitos después de que se trasplantan en el tejido receptor [19]:

La teoría de "Difusión/Angiogénesis" postula que los adipocitos sobreviven por difusión de oxígeno en el sitio receptor durante los primeros 7-14 días después de injertar, con la eventual micro-angiogénesis y la formación de un suministro de sangre viable a las células injertadas. La superpoblación o exceso de presión intersticial en el sitio receptor se cree que interfiere con la difusión, lo cual conduce a la muerte celular, la apoptosis y la pérdida de volumen del injerto. Esto explica que el uso de volúmenes pequeños (18 a 34 cc) tiene más éxito (Kanchwala, 2008).

La importancia de la revascularización también es subrayada por Smahel, él menciona que el grado de revascularización inducida desde la región adyacente es más importante que cualquiera de las dos respuestas celulares basadas en las dos teorías predominantes para la mejoría en la supervivencia del injerto de grasa [20]. Esto a la larga puede tener un efecto sobre la supervivencia a largo plazo de los injertos grasos. Antes de la circulación sanguínea la nutrición es a través de la difusión de los nutrientes a través de la circulación plasmática. Para asegurar que se produzca esta acción, los sitios receptores deben tener circulación abundante y un sitio sin infecciones. Además, para asegurarse de que el injerto de grasa tenga un buen contacto con la zona receptora, la fijación estable del injerto de grasa es un factor esencial para su integración [12,16]. Sin embargo, en virtud de que la capa subcutánea donde se coloca a la grasa para corregir la deformidad del tejido blando a nivel facial, tiene tejidos musculares adyacentes lo hacen un área inestable, con las acciones de estos, la estabilidad inicial requerida para la fijación del injerto de grasa puede ser afectada.

En cuanto a las zonas del cuerpo sometidas a control voluntario, los pacientes deben ser educados sobre el manejo apropiado de los movimientos. En las extremidades donde la rigidez puede ser causada con el uso de una férula o un

fijador externo, la supervivencia de los injertos puede ser asistida con éstos durante un cierto tiempo [16]. Sin embargo, cuando la grasa es injertada en las regiones faciales, se debe recordar que los músculos de la mímica facial son involuntarios, por tanto no son sometidos a control arbitrario.

En el manejo del injerto graso muchos estudios han examinado los métodos para la extracción e inyección de la grasa para maximizar la supervivencia del injerto. Además, la ingeniería tisular ha realizado estudios utilizando células adiposas diferenciadas y derivadas de células madre, pero la mayoría de estos estudios tienen un alto costo y no puede aplicarse a un entorno clínico, y los procedimientos y manipulaciones son un tanto complicados [21,22].

Con estos antecedentes, el uso de injerto graso es un tratamiento eficaz para la corrección de las defectos faciales [30].

Función vascular en el crecimiento del tejido adiposo.

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, lo cual es crucial para todos los tejidos en crecimiento, expansión y reparación. El tejido adiposo en particular es el más vascularizado del cuerpo ya que cada adipocito está rodeado de capilares. Se ha demostrado que la angiogénesis tiene un papel crucial en la modulación de la adipogénesis y la obesidad. Los mecanismos moleculares de comunicación angiogénica implican una superposición de factores angiogénicos e inhibidores, incluyendo el factor crecimiento endotelial vascular A (VEGFA), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la adiponectina y la trombospodina 1 [24].

En el cultivo de tejido adiposo los nuevos vasos angiogénicos contribuyen a la adipogénesis por numerosos mecanismos [24] :

1. Suministran nutrientes y oxígeno en la sangre, que los adipocitos como la mayoría de tejidos del cuerpo requieren para el crecimiento y mantenimiento.

En particular, el aumento de la perfusión vascular en el tejido adiposo pardo, puede aumentar aún más las tasas metabólicas, proporcionando moléculas de oxígeno para quemar combustibles.

2. El plasma, rico de factores de crecimiento y citosinas, mantiene la supervivencia de los adipocitos para mantener su función.
3. Los suministros vasculares desde la medula ósea y otros tejidos son capaces de diferenciarse en preadipocitos, adipocitos y células vasculares, lo que aumenta las células inflamatorias procedentes de la medula ósea que se observan en los obesos.
4. El factor de activación endotelial de las células en los vasos angiogénicos producen diversos factores de crecimiento y citocinas que se comunican con adipocitos de forma parácrina para promover su crecimiento y expansión.
5. En estudios recientes las células murales incluyendo los pericitos vasculares (PC) tienen características de células madre y se pueden diferenciar en preadipocitos y adipocitos.
6. Los vasos angiogénicos eliminan los productos de desecho del tejido adiposo, que además son importantes como suministro de oxígeno y nutrientes.
7. La vasculatura de tejido adiposo consiste en un fenestrado de microvasos que juegan un papel esencial en los efectos locales y sistémicos de los adipocitos.

La vasculatura puede tener un papel causal en el crecimiento de los adipocitos, regresión y funciones de control fisiológico en el número de microvasos y por la remodelación de los vasos existentes.

En efecto varias adipocinas, incluyendo leptina, resistina y visfatina, modulan la angiogénesis y la supervivencia vascular. Las adipocinas y factores angiogénicos clásicos como VEGFA y FGF pueden inducir sinérgicamente la angiogénesis. La leptina también podría regular el incremento de la expresión de la VEGFA y a la par producir angiogénesis [24].

El tejido adiposo también produce algunos factores anti-angiogénicos, como la trombospondina 1 y el inhibidor de la activación del plasminógeno, para prevenir la neovascularización. Además de los adipocitos, otros tipos de células tales como las células inflamatorias y del estroma en el tejido adiposo contribuyen sustancialmente a la angiogénesis [24].

La hipoxia en el tejido adiposo en individuos obesos produce un proceso inflamatorio y angiogénico de respuesta, induciendo al factor de transcripción 1 (HIF1), lo que aumenta la expresión de ciertos factores relacionados con la angiogénesis [24].

Las células estromales derivadas del tejido adiposo (ADSC) también se diferencia en varios tipos de células incluyendo la endotelial y perivascular. Estas células han sido usadas en la reparación y regeneración del tejido miocárdico infartado [24].

El tejido adiposo contiene precursores endoteliales que expresan marcadores como son: CD34, CD31, receptor 2 de VEGF, tirosinaquinasa con inmunoglobulina y cadherina de endotelio vascular. Cuando sea necesario estas células pueden ser rápidamente movilizadas y diferenciadas en células maduras endoteliales para los vasos sanguíneos. Estudios recientes han demostrado que las células progenitoras de los adipocitos se encuentran en el compartimento de las células murales, en las paredes de los vasos sanguíneos del tejido adiposo, junto con los pericitos [25].

Por otra parte, estas células progenitoras adiposas se encuentran en la vasculatura del tejido adiposo y no en el tejido tisular adiposo. Por lo tanto, la vasculatura del tejido adiposo no sólo suministra oxígeno, nutrientes, células inflamatorias, factores parácrinos para la adipogénesis, sino también proporciona un nicho progenitor para el desarrollo de tejido adiposo [25].

Modelos biológicos para el estudio de la supervivencia de injertos grasos

El animal de laboratorio es “cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos” [26,27]. Es un animal estandarizado, lo que significa que tiene una composición genético sanitario definido, son criados y mantenidos en ambientes controlados que cumplen con los requerimientos específicos para cada especie, los cuales garantizan, además el bienestar animal.

La homogeneidad genética de estos animales permite que ésta no tenga que ser considerada como una variable contundente en las investigaciones. Por lo que la variabilidad de los resultados de las investigaciones se pueden deber a factores ambientales o metodológicos. Esto es lo que hace posible la comparación de resultados experimentales entre animales de diferentes laboratorios [28].

Características

Dentro de los modelos de experimentación sin duda, el ratón es el más conocido y utilizado en la mayor parte de las experiencias *in vivo* de biología y medicina. Muchos investigadores consideran al ratón como un modelo animal casi perfecto porque además de su corto tiempo generacional, alta desempeño reproductivo y fácil mantenimiento, son los animales más sofisticados que pueden ser utilizados por los investigadores [29,30]. Existen más de 478 cepas consanguíneas de ratón y 234 de rata de laboratorio. Dentro de éstas, las hay de uso general o especial, como los modelos para enfermedades autoinmunes, endócrinas y tumoral [28].

Una de estas mutaciones espontáneas simples es la denominada nude (nu). La característica que le dio el nombre a la mutación fue la carencia de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechazan tejidos alo y xenotransplantados. El hecho de que acepten el trasplante de tumores humanos ha sido uno de los

descubrimientos más importantes que ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo a estos individuos en el primer modelo de animal de experimentación inmunodeficiente [31].

Antecedentes del trabajo

En la literatura el empleo de injertos grasos para la reconstrucción a nivel facial es una terapéutica común pero con resultados pocos estables en la sobrevida del injerto. Se han realizado estudios *in vivo*, para valorar diferentes técnicas para aumentar la sobrevida del injerto, tanto empleando diferentes tipos de cánulas, variaciones en su diámetro y toma [32], plano de aplicación, forma de aplicación [33] y en los últimos años con la aplicación de neurotoxinas.

El uso de estos agentes en la aplicación del injerto graso ha aumentado la sobrevida gracias a que hay un aumento en el suministro sanguíneo de colgajos como lo refiere Dunc C (2009) [34], Chenwang D (2009) [35], y este aumento de la vascularidad permitiría la sobrevida del injerto graso como los describieron Baek y Cols. (2012) [36], y otro estudio similar realizado anteriormente por Jung y Cols. (2009) [37], en modelos animales. Hay diferencias en estos 2 últimos estudios mencionados: como es que en el de Baek y Cols. 2012, sólo tiene 2 grupos de estudio y usando ratones NU/NU, y aplicación simultánea de una neurotoxina, y sin valoración inmunológica; el otro estudio Kyung y Cols. (2009), utiliza ratones C57/BL6 con 5 grupo con un grupo con colocación de neurotoxina 3 días antes y otro simultáneo y con valoración con sólo un marcador inmunológica para la angiogénesis (cd31).

Material y métodos

Características del lugar en donde se realizará el estudio

El estudio se realizó en el servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva ubicado en el Hospital de Especialidades de la UMAE “Dr. Antonio Fraga Mouret”, del Centro Médico Nacional “La Raza” del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Laboratorio de Citopatología Ambiental del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Campus Zacatenco, así como en el bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Tipo de estudio.

- Ensayo preclínico controlado aleatorizado
- Experimental
- Prospectivo
- Longitudinal
- Comparativo
- Abierto
- Doble ciego

Grupo de estudios

Características de los casos.

La investigación tuvo un grupo, con 3 ratones NU/NU, hembras de iguales características en peso talla, edad y alojamiento; a los cuales se le colocó un injerto (aloinjerto) graso en la región dorsal en un plano submuscular mediante una incisión de 4mm.

Características del grupo de trabajo.

El injerto graso se realizó únicamente con solución fisiológica.

Criterios de selección

Criterios de inclusión: Ratones NU/NU hembras de peso mayor a 18 g, de 4 semanas de vida y ratones NU/NU adultos de 9 semanas y que no presentaron patologías durante el experimento.

Criterios de eliminación o no inclusión: Ratones los cuales fallecieron o se perdió su seguimiento y a los que no se les realizaron los procedimientos mencionados.

Criterios de exclusión: A los que presentaron patologías en la piel u otras lesiones que impidieron la valoración o el procedimiento quirúrgico.

Población y muestra

Población: Ratones (*mus musculus*) NU/NU homocigotos de pesos de 18 a 20 g., y 4 semanas de edad. Poseen un alelo mutante homocigota recesivo que pertenecen al grupo *linkage* VII del cromosoma 11, son ratones con fenotipo desnudos o sin pelo se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubiran.

Muestra: Debido a la estabilidad genética de la cepa se manejaron de forma arbitraria grupos de 2 hasta 8 ratones, además porque el costo por ratón NU/NU suele ser hasta 5 veces más que el de las cepas comunes. El grupo tubo 3 ratones NU/NU cada uno de 4 semanas. Y 2 ratones NU/NU adultos de 9 semanas de vida para toma del injerto graso de la región inguinal (donadores). Este proceso se basa en el descrito por Baek y Cols., 2012.

Definición de las variables.

Variables independientes.

Tipo de tratamiento.

Definición conceptual: Manejo realizado por el investigador basado en parámetro y metodología científica.

Definición operacional: En base a los datos del investigador.

Tipo de variable: Categórica nominal.

Escala de medición: Categórica nominal.

Injerto graso más solución salina.

Injerto grasos más relajantes musculares simultáneos.

Relajante muscular más injerto graso tardío.

Variables de control.

Edad.

Definición conceptual: Cantidad de años, meses y días cumplidos a la fecha de aplicación del estudio.

Definición operacional: En base a los registros del bioterio.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Escala de medición: Lineal.

Peso.

Definición conceptual: La fuerza con que la tierra atrae a un cuerpo y a la magnitud de dicha fuerza.

Definición operacional: cantidad en gramos del tejido graso se midió con balanza milimétrica.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Escala de medición: Lineal.

Variables dependientes.

Volumen del injerto graso.

Definición conceptual: Cantidad de espacio ocupado por un cuerpo tridimensional, que se mide en centímetros cúbicos.

Definición operacional: Volumen medido del tejido graso obtenido de la región inguinal y del dorso de los ratones, el cual se realiza con regla milimétrica para sacar los valores para ecuación de volumen.

Tipo de variable: Variable cuantitativa.

Escala de medición: Lineal.

Volumen final.

Definición conceptual: Cantidad de espacio ocupado por un cuerpo tridimensional, que se mide en unidades cúbicas.

Definición operacional: Volumen de tejido graso obtenido posterior a su retiro del área injertada a las 9 semanas y se pesó con balanza milimétrica.

Tipo de variable: Variable cuantitativa.

Escala de medición: Lineal.

Tasa de angiogénesis.

Definición conceptual: Es el número de veces que se produce un evento en un periodo de tiempo dado.

Definición operacional: Es el número de veces que se presenta en un área determinada la presencia de nuevos vasos arteriales en 1mm cuadrado en cada grupo de estudio observada en microscopio, así como se evaluó mediante estudio de antígeno anticuerpo la tasa de angiogénesis del colgajo e injerto graso.

Tipo de variable: Cuantitativa discreta.

Escala de medición: Cuantitativa discreta.

Tasa de supervivencia.

Definición conceptual: Es el número de veces que se produce un evento en un periodo de tiempo dado.

Definición operacional: la cantidad de tejido graso diferencial entre el tejido graso inicial y el tejido graso final, pesado en balanza milimétrica.

Tipo de variable: Cuantitativa continúa.

Escala de medición: Cuantitativa continúa.

Mantenimiento de los ratones NU/NU.

Los ratones atímicos NU/NU (hembras de 4 y 9 semanas) se mantuvieron en jaulas de acrílico con tapa de acero inoxidable esterilizables, bajo condiciones ambientales controladas en el laboratorio que incluyen: inyección y extracción de aire calidad tipo farmacéutico. Control de la temperatura a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$. y la humedad. Se les proporcionó el alimento estéril para ratón/rata Teklad-Harlan y agua *ad libitum*, cama de viruta estéril y se realizó el cambio de jaulas cada cuarto día. Las condiciones de esterilización para el alimento, agua, cama y jaulas son: 15 Lb/in² de presión, 121°C. por 15 min.

Obtención del tejido graso.

Una vez que se adaptaron al área los ratones, posterior a 4 días de su introducción, se obtuvo el tejido graso de la región inguinal de estos 2 ratones NU/NU adultos hembras de 9 semanas de edad, mediante una incisión en la región inguinal bajo anestesia (pentobarbital y xilasina) y el tejido obtenido se pesó en una balanza analítica y se midió con regla milimétrica, a los ratones donadores se le realizó el cierre del área donadora y se sacrificaron siguiendo la norma oficial, mediante una sobredosis de pentobarbital y aplicando un anestésico inhalado (isoflorano o halotano) colocado en una torunda en un espacio cerrado. Todo el manejo se realizó y supervisado por el médico veterinario de pequeñas especies del bioterio. La eliminación de los ratones se realizó conforme a la norma señalada, en el bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, mediante incineración.

Desarrollo del modelo.

Se utilizaron 3 ratones NU/NU hembras de 4 semanas de edad, que cumplieron los criterios de inclusión, al cual se le colocó mediante una herida de 4mm en el

dorso (fuera de la región del deltoides) del ratón, 1 ml de solución salina + 0.20g. de injerto graso en un plano submuscular, todas las heridas se realizaron el cierre mediante *nylon* 6-0, puntos simples los cuales se retiraron a los 7 días de colocados. Posteriormente, se mantuvieron en las mismas condiciones de alojamiento y cuidados.

Sacrificio y disección de los ratones.

A las 9 semanas bajo anestesia con pentobarbital sódico y xilasina, se realizó la medición con regla milimétrica, la apertura del área injertada y la toma del tejido graso de sitio y, se pesó en una balanza analítica. Este tejido graso obtenido se dividirá en dos fragmentos: uno para análisis histopatológico y otro para realización de estudios de inmunohistoquímica. A los ratones en experimentación se les realizó el cierre del área de estudio con nylon 6-0 y se sacrificaron bajo la NOM-062-ZOO-1999, mediante un exceso de pentobarbital y aplicando un anestésico inhalado (isoflorano o halotano) colocado en una torunda en un espacio cerrado, esto se realizó por el médico veterinario. La eliminación de los ratones se realizó conforme a la norma señalada en el bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, mediante incineración.

Análisis histopatológico.

Técnica de hematoxilina-eosina (Cotran, 2000).

Técnica de rojo Congo.

Ensayo inmunohistoquímico para los anticuerpos de marcadores moleculares PCAM y CD32. Preparación de la solución de cromo-gelatina: Los componentes de esta solución se muestran en la tabla.

Tabla 1. Componentes de la solución Cromo-gelatina.

SOLUCIÓN CROMO-GELATINA	
Reactivo	Cantidad
Agua destilada a 60°C	1L.
Gelatina	3g.
Sulfato de Potasio y Cromo	0.5g.
Cristales de Timol	0.2g.
4°C α	

A un matraz aforado de 1000 ml se le agrego 500 ml de agua destilada a 60°C y una barra de agitación. El matraz se colocó sobre un agitador magnético con parrilla calefactora ajustada a 60°C. Mientras el agitador se mantuvo en movimiento se agregaron lentamente 3g. de gelatina evitando que se formen grumos. Una vez disuelto la gelatina se apagó la parrilla. Se agregaron 0.5g. de Sulfato de Potasio y Cromo $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12\text{H}_2\text{O}$ y se mantuvo en agitación hasta su disolución. Finalmente se agregarán los cristales de timol y se mantuvo en agitación durante 15 minutos. Se conservó en refrigeración hasta que se utilizó.

Tratamiento de portaobjetos con cromo gelatina.

Los portaobjetos que se destinaron para este ensayo se lavaron con una solución al 1% de detergente Extran® y se enjuagaron en tres ocasiones con agua bidestilada. Se desengrasaron con alcohol al 70% y se dejaron secar sobre papel absorbente. Posteriormente se sumergió en la solución de cromo-gelatina durante 1 hora y posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente en posición vertical.

Obtención de cortes de bloques con parafina.

A partir de un bloque de parafina en el que se encontraba incluido un fragmento de muestra histológica, se procedió a realizar cortes en un micrótopo. Los cortes realizados fueron de 5 micras de espesor. Una vez cortados se colocaron sobre un

baño de flotación de agua destilada a 42°C. al que se le agregan unas gotas de alcohol al 70%. Los cortes serán levantados en cubreobjetos previamente tratados con Cromo gelatina. Los cubreobjetos con los cortes se dejaron secar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

Técnica histológica de desparafinación.

Previo a la desparafinación los cubreobjetos se colocaron en una incubadora a 60°C. durante 1 hora en posición vertical para permitir que la parafina se escurriera. Posteriormente los cubreobjetos se colocaron en el tren de desparafinación y siguieron el orden y tiempo indicados a continuación en la tabla 2.

Tren de desparafinación	
Reactivo	Tiempo
Xilol	3 min
Xilol (1)	Lavado
Xilol (2)	Lavado
Alcohol absoluto	3 min
Alcohol absoluto (1)	Lavado
Alcohol absoluto (2)	Lavado
Alcohol 96%	3 min
Alcohol 80%	3 min
Alcohol 70%	3 min
Agua destilada	

Bloqueo

Se agregaron a los tejidos desparafinados, evitando que se secan, la solución de bloqueo estuvo constituida de albúmina al 0.5% y suero normal de ratón al 1% en PBS filtrado. Se sacaron los portaobjetos del último paso del tren de desparafinación y se lavaron 3 veces con PBS filtrado, a continuación se agregó a

cada porta objetos la cantidad necesaria de solución de bloqueo para cubrir el tejido, aprox. 3ml por muestra y se incubo durante una hora a temperatura ambiente.

Exposición de los tejidos a los anticuerpos PCAM y CD32.

La preparación del anticuerpo se realizó de la misma forma como se describe en el inciso anterior, previo a la preparación de la solución con el anticuerpo, se preparó una cámara húmeda que consistió en un contenedor de plástico con tapa en el que debe haber una base de papel absorbente húmedo y una base alta y plana para colocar los portaobjetos. Una vez preparada la solución con el anticuerpo, inmediatamente se agregaron 400 μ l., de esta solución y sobre cada corte, evitando que se secan entre cada aplicación, se colocó dentro de la cámara húmeda y se incubo a 4° durante 24h.

Exposición de los tejidos al anticuerpo secundario.

Al finalizar el tiempo de incubación con el PCAM o CD32, los portaobjetos se lavaron con PBS, 5 veces a chorro directo. A su término se colocaron sobre la cámara húmeda y en condiciones de oscuridad y evitando la desecación del tejido se agregó 400 μ l., del anticuerpo secundario sobre cada tejido. Se incubó durante 1h., cubiertos de la luz.

Montaje de cubreobjetos.

El montaje consistió en colocar sobre la muestra del portaobjetos una gota de 10 μ l. de la solución de glicerol al 1% y se colocó un cubreobjetos sobre la gota. Se dejó secar y se sellaron los bordes con barniz transparente. Se mantuvieron las preparaciones en refrigeración y cubiertos de la luz previa observación en un microscopio de fluorescencia.

Forma de captura y validación de la información en la computadora.

Se realizó mediante los datos obtenidos de los ratones, de los parámetros de peso, talla, edad, así como el peso del injerto graso obtenido. Posterior a 9 semanas se valoró el peso, previo a su sacrificio y el peso del tejido graso en el sitio injertado. También se valoró mediante microscopia las características histológicas, así como la neoformación de nuevos vasos y la diferencia de tasa de angiogénesis en relación con la respuesta a antígeno anticuerpo como marcadores.

Pruebas estadísticas realizadas

Se realizaron graficas de cajas para las variables a analizar en este trabajo. Se utiliza la prueba de t-pareada para valorar los resultados del peso al inicio y al final del experimento y se realizó la prueba de Kruskal Wallis para analizar las variables de los resultados del volumen del injerto final y la densitometría con los anticuerpos CD34 y PCAM entre los 3 grupos. Un criterio de $p < 0.5$ se consideró como significativo.

Resultados

Condiciones de mantenimiento de los ratones NU/NU, obtención del tejido graso y método de implante del mismo.

Todos los tres ratones de grupo receptor sobrevivieron (100 %) a la prueba y sin morbilidades.

Se realizó el cuidado y mantenimiento de los ratones NU/NU, ajustando las condiciones para tener una mejor sobrevida del injerto (Figura 1).

Se tuvo un tiempo de adaptación de 5 días previos a su manipulación, se colocaron en jaulas estériles con agua y alimento estéril (palatable) a libre demanda, tanto la jaula y viruta estériles (Figura 1, a, b, c), se realizó su cambio de los mismos cada 3 días, se mantuvieron a temperatura de 32 grados Celsius con una humedad del 20 % (controlado con calentador eléctrico y sistema de flujo de aire controlado). La manipulación de los ratones se realizó en la campana de flujo laminar previa esterilización y bajo luz ultravioleta, el manejo del operador fue bajo técnica estéril, guantes, gorro cubre bocas y bata estéril (Figura 1, d, e). La manipulación de los ratones para la colocación del injerto graso, se realizó con apoyo del médico veterinario, el cual aplicó xilasina 0.2 ml., intramuscular a nivel del muslo de los ratones donadores con una latencia de 4 min., se realizó una incisión a nivel inguinal con hoja de bisturí 15 y toma del tejido graso inguinal y pre vesical (en esta región se encontró una cantidad adecuada de injerto graso ya que por ser ratones de poco peso es la región en donde hay mayor cantidad de tejido graso existe) de los 2 ratones donadores y se pesó en balanza milimétrica y se colocó en solución fisiológica y cubierto para evitar su desecación. Se procedió al cierre de incisiones inguinal con nylon 6-0 y se procedió al sacrificio de los 2 ratones mediante sobredosis de pentobarbital 0.8 ml y colocando en un espacio cerrado al ratón con una torunda empapada de halotano, teniendo una respuesta a los 4 min. Sin observar sufrimiento. Se colocó en a los 3 ratones receptores, el injerto graso obtenido de los 2 ratones NU/NU donadores y previamente pesado en una balanza analítica y mediante una incisión de 4 mm en la región dorsal

fuera de la región deltoidea y detrás de la región cervical (áreas de gran movilidad), en un plano submuscular.

Mediante este manejo durante las nueve semanas no se observaron datos de infección local ni mortalidad en el manejo ni morbilidad en el área quirúrgica (Figura 2).

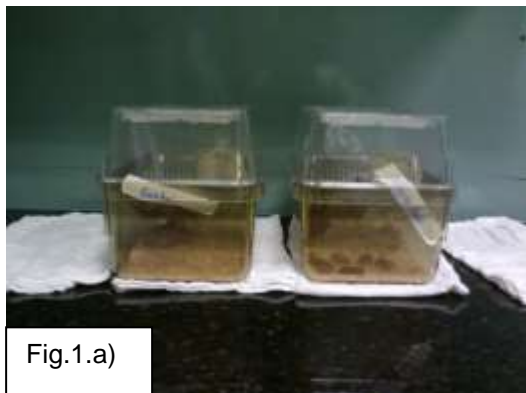


Fig.1.a)



Fig.1. b)



Fig.1 c)



Fig.1 d)

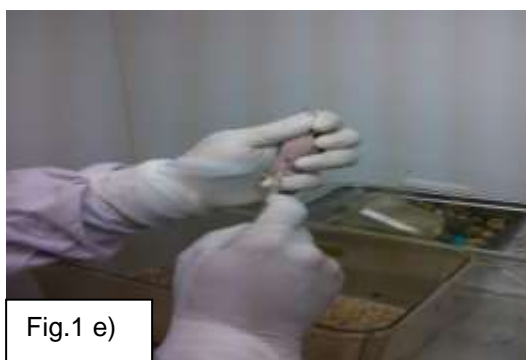


Fig.1 e)

Figura 1. a) Mantenimiento de los ratones NU/NU, b) Alimentación a libre demanda, c) Mantenimiento en las mismas condiciones, d) Condiciones de manejo en la campana de flujo laminar, e) Aplicación de anestésico.

Análisis del peso y volumen de los injertos al inicio y al final del experimento.

Organizar los datos y realizar el análisis estadístico como parte del adiestramiento de la especialidad.

Se observó el injerto voluminoso subcutáneo (Flecha) en los ratones principalmente en uno (ratón III) y en menor dimensión o casi nulo en los otros dos ratones (Figura 2).

Con respecto al peso se realizó la toma del peso de los ratones al inicio del experimento y el pesado del injerto al inicio y al final de las 9 semanas.

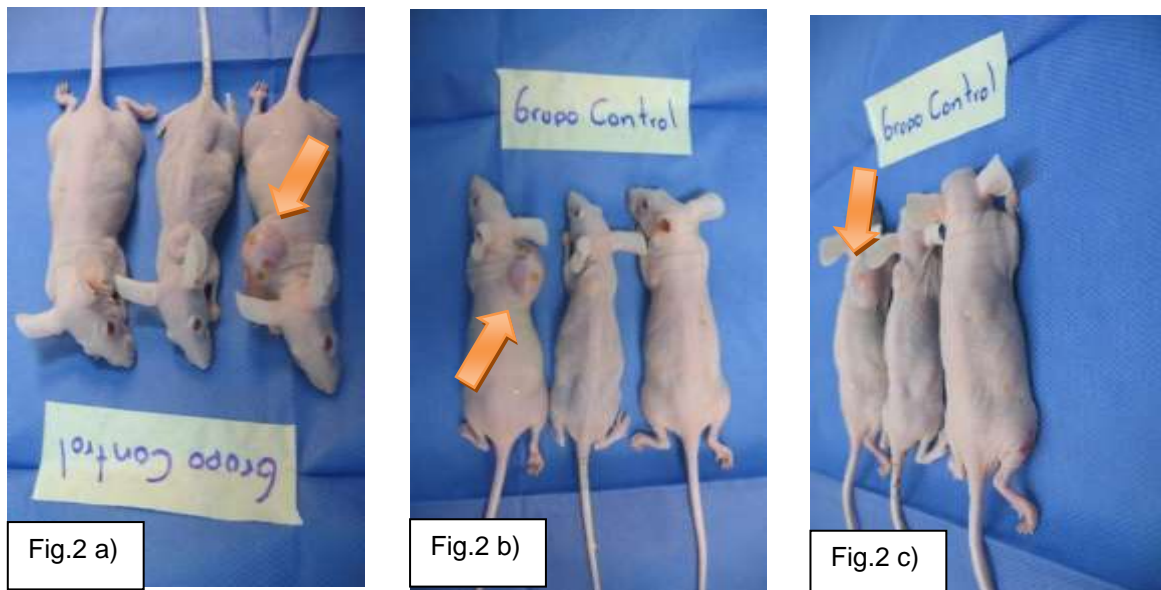


Figura 2: Imagen de los tres ratones del grupo de trabajo a las 9 semanas.

Se realizó la comparación entre los 3 ratones en estudio en el cual se valora el peso inicial y peso final del ratón a las 9 semanas (Tabla 3).

Tabla 3. Comparativo entre el peso inicial y final del injerto graso en los 3 ratones del grupo de estudio. **NO** hubo diferencia significativa entre de los 3 grupos en el peso del injerto inicial y final de los ratones **P=0,591**.

Ratón	Peso del injerto graso inicial (g)	Peso del injerto graso a las 9 semanas (g)
I	0,38	0,12
II	0,41	0,26
III	0,44	1,96

Se realizó la comparación entre los 3 ratones en estudio en el cual se valora el peso inicial del injerto y el peso final del injerto a las 9 semanas.

Tabla 4. Comparativo entre el peso inicial y final de los 3 ratones del grupo de estudio **NO** hubo diferencia significativa entre los 3 grupos en el peso inicial y final de los ratones **P= 0,184**

Ratón	Peso inicial del ratón (g)	Peso final del ratón (g)
I	23	17.3
II	30	26,24
III	26	25.8

Se realizó la comparación entre el resultado de volumen del injerto graso final del experimento entre los 3 ratones en estudio y se compraron entre ellos.

Tabla 5: Resultados del volumen del injerto graso al final del estudio. **Si** hubo diferencia significativa entre de los 3 grupos entre los volúmenes finales del injerto graso **P=0,004**

Ratón	Largo	Ancho	Volumen (cm ³)
I	0,95	1,1	0,57475
II	1,34	1,2	0,9648
III	0,45	0,58	0,07569

Se realiza la valoración de la sobrevida del injerto graso, comparado entre el peso inicial y el peso final. Y se encuentra.

Tabla 6. Comparativo de porcentajes de sobrevida entre los 3 ratones.

Ratón	Sobrevida
I	-31,57%
II	-63,41%
III	+436%

Análisis de la viabilidad del injerto por la tinción del rojo oleoso y la angiogénesis por inmunohistoquímica en el injerto graso a las 9 semanas de su aplicación.

Se realizó evaluación del tejido mediante histología con técnica HE y Rojo Oleoso.

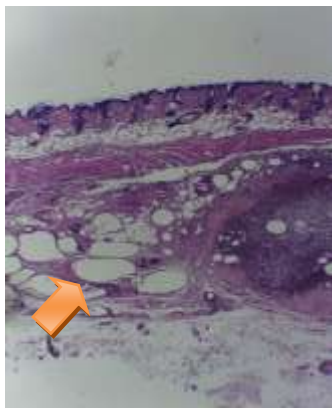


Fig. 3 Ratón III.



Fig. 4 Ratón II.

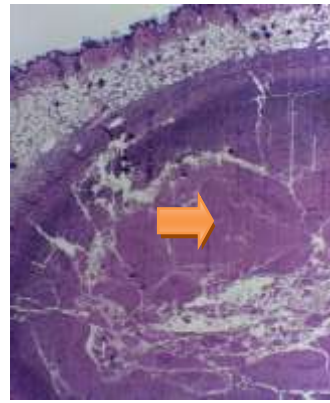


Fig. 5 Ratón I.

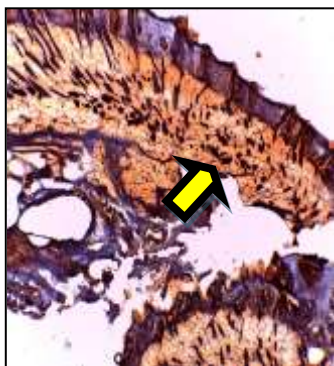


Figura 6. Ratón III.

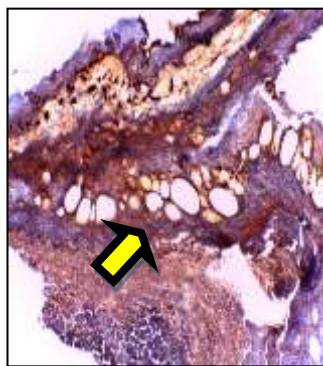


Figura 7. Ratón II.

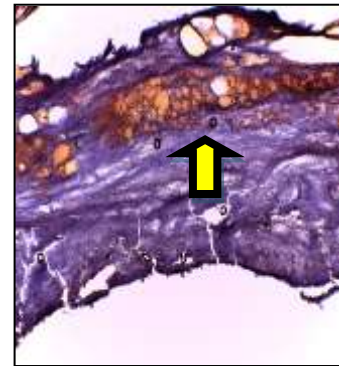


Figura 3. Análisis histopatológico de los injertos mediante la tinción de hematoxilina–eosina (HE) y rojo oleoso. A) Ratón I: en la figura superior, se encuentra epidermis y tejido celular subcutáneo sin alteraciones, en dermis hay tejido adiposo submuscular de diversos diámetros (Flecha), proceso inflamatorio agudo y crónico. Y en la figura inferior en la tinción del rojo oleoso se muestra gran cantidad de tejido adiposo (Flecha)

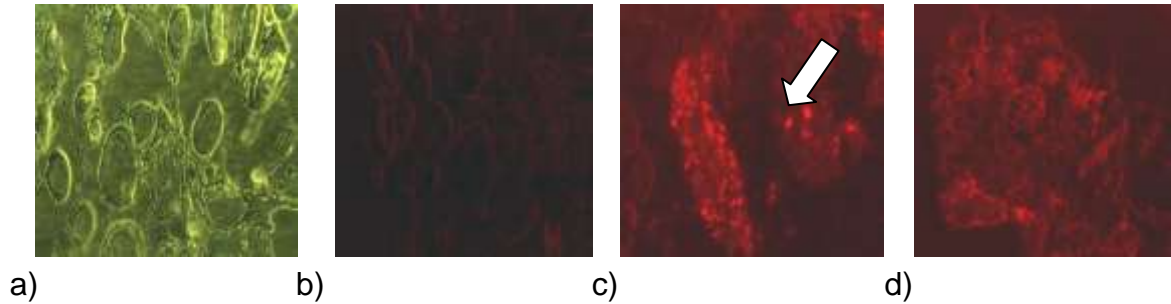
Figura 4: Mediante tinción de hematoxilina – eosina (HE) de ratón II: en la figura superior se encuentra epidermis y tejido celular subcutáneo normal, presenta dermis con infiltrado inflamatorio de linfocitos y células plasmáticas con vasos congestivos (Flecha), escaso tejido adiposo. En la figura inferior se delimita en un plano submuscular el tejido adiposo en moderada cantidad (Flecha), entre tejido adiposo maduro y preadipocitos.

Figura 5: Mediante tinción de HE de ratón III: en la figura superior epidermis y tejido celular subcutáneo sin alteraciones, dermis con proceso inflamatorio agudo y crónico con extensa necrosis central y apoptosis, sin presencia de tejido adiposo. Y en la figura inferior con la tinción de rojo oleoso escasas células adiposas (Flecha) y gran cantidad de tejido necrótico.

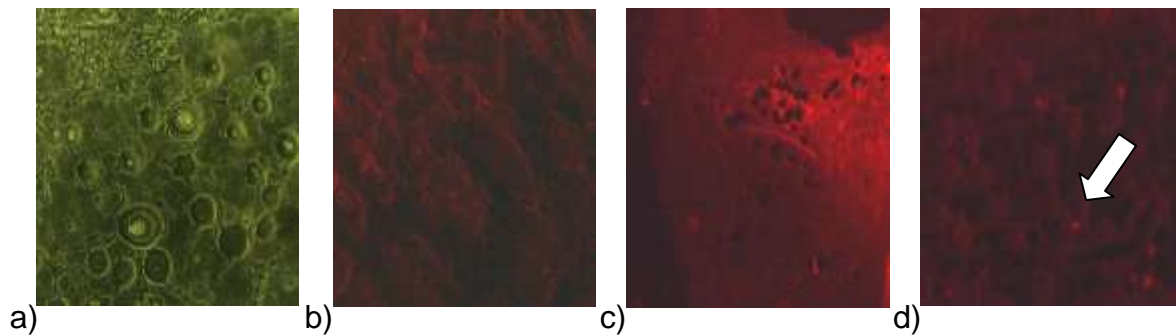
Figura 6: Se realizó una amplificación de la tinción con rojo oleoso del tejido adiposo del ratón III, en el cual se identifica de forma adecuada el tejido adiposo.

Figura 7: Se realizó amplificación de la tinción con HE del ratón II, para mostrar la fagocitosis de un histiocito al tejido graso (Flecha).

Se realizó evaluación de los tejidos mediante fluorescencia con anticuerpos CD34, de cada uno de los 3 ratones.

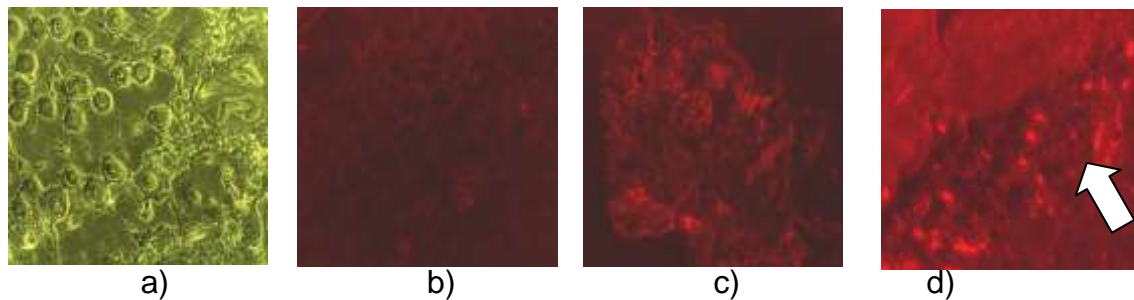


Figuras 8: Análisis inmunohistoquímico del injerto. La fluorescencia roja indica la presencia de los vasos sanguíneos mediante el uso del anticuerpo CD34 en el ratón I. a) Campo claro; b, c y d) Imagen de fluorescencia. La flecha indica los vasos con aumento 4x.



Figuras 9. Análisis inmunohistoquímico del injerto. La fluorescencia roja indica la presencia de los vasos sanguíneos mediante el uso del anticuerpo CD34 en el ratón II. a) Campo claro; b, c y d) Imagen de fluorescencia. La flecha indica un vaso Aumento de 40X.

I



Figuras 10. Análisis inmunohistoquímico del injerto. La fluorescencia roja indica la presencia de los vasos sanguíneos mediante el uso del anticuerpo CD34 del ratón III a) Campo claro; b, c y d) Imagen de fluorescencia. La flecha indica los vasos con aumento 40X.

Figura 8: Mediante tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo CD34 + rojo Texas dirigido al endotelio vascular del ratón I: a) campo claro. b, c y d): se señala con la flecha la angiogénesis pero sin un patrón estructural del tejido adiposo.

Figura 9: Mediante tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo CD34 + rojo Texas dirigido al endotelio vascular del ratón II: a) campo claro. b, c y d): se señala con la flecha la angiogénesis y el resto del campo con un patrón estructural escaso (células) del tejido adiposo.

Figura 10: Mediante tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo CD34 + rojo Texas dirigido al endotelio vascular del ratón III: a) campo claro. b, c y d): se señala con la flecha una mayor angiogénesis con un patrón estructural del tejido adiposo más definido.

Resultados de la medición por **densitometría** en los 3 ratones del grupo de estudio con anticuerpo CD34.

Ratón	Anticuerpo	Área	Mean
I	CD34	14,564	55,604
	CD34	14,564	52,060
	CD34	14,564	56,566
II	CD34	14,564	64,192
	CD34	14,564	55,604
	CD34	14,564	55,077
III	CD34	14,564	55,189
	CD34	14,564	45,880
	CD34	14,564	48,629

Tabla 11. Resultados de densitometría CD34.

NO hubo diferencia significativa entre de los 3 ratones en la valoración por densitometría con CD34 (**P: 0,196**).

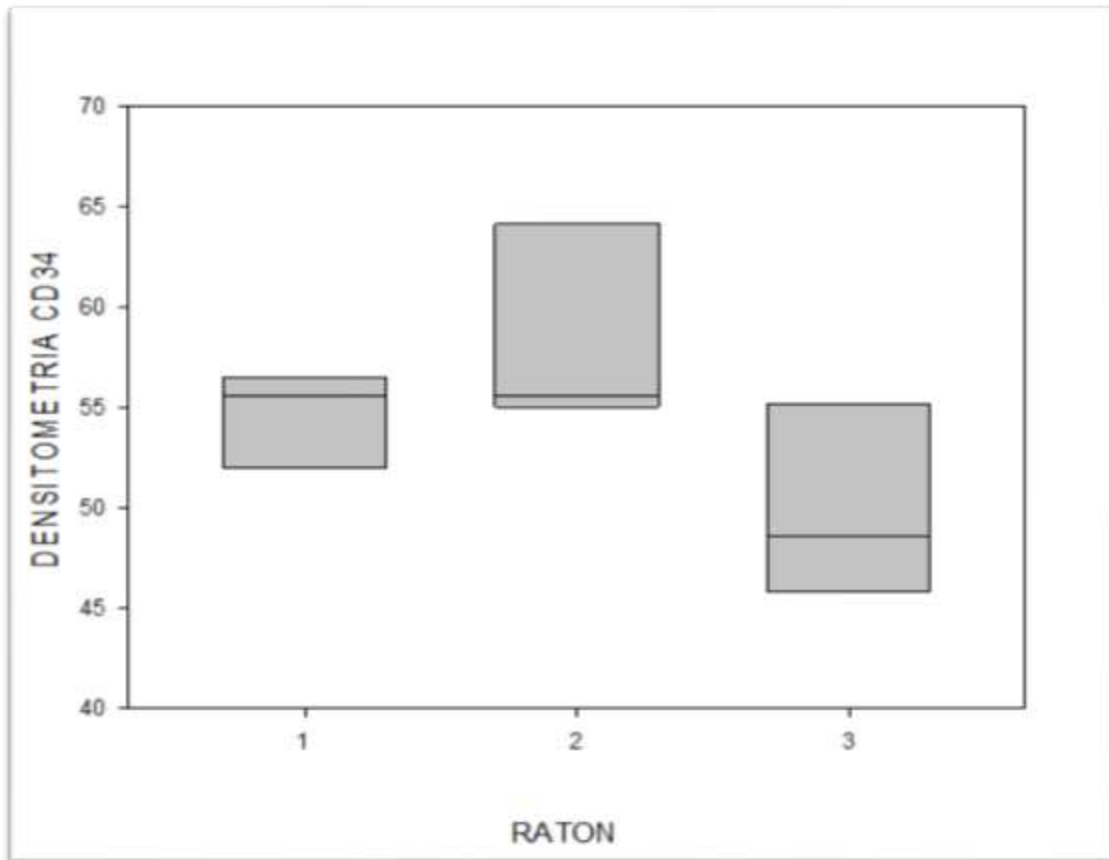
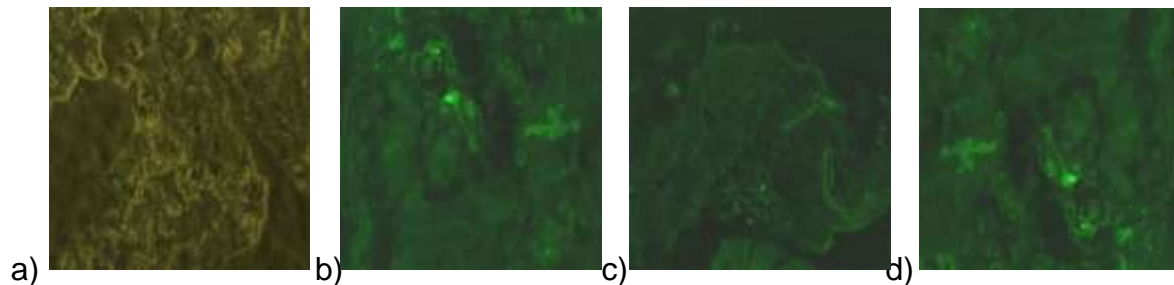


Figura 11. Densitometría de la presencia de vasos sanguíneos con CD34 en los injertos de los 3 ratones de los grupos de estudio.

En la figura 11 se observa el patrón de la mediana entre los 3 ratones en su valoración por densitometría, teniendo intersección entre los 3 grupos.

Se realizó evaluación de los tejidos mediante fluorescencia con anticuerpos PECAM, de cada uno de los 3 ratones.



Figuras 12: Análisis inmunohistoquímico del injerto. La fluorescencia verde indica la presencia de los vasos sanguíneos mediante el uso del anticuerpo PECAM del ratón 3. a) Campo claro; b, c y d) Imagen de fluorescencia. Aumento 40X.

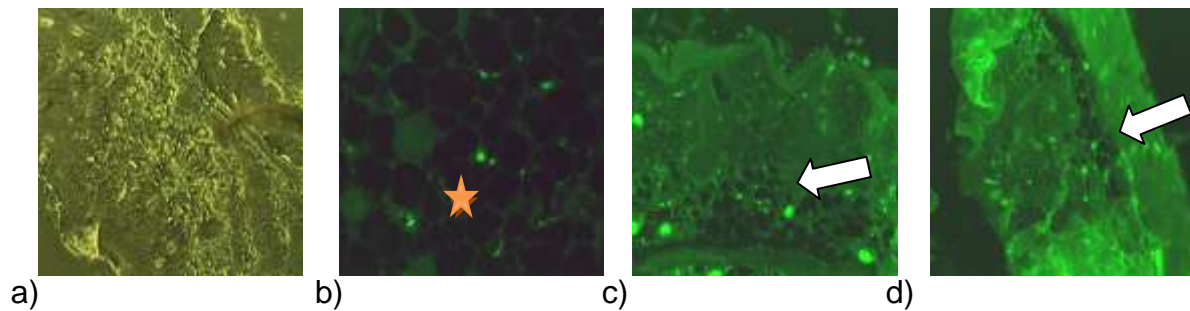


Figura 13: Análisis inmunohistoquímico del injerto. La fluorescencia verde indica la presencia de los vasos sanguíneos mediante el uso del anticuerpo PECAM del ratón 3. a) Campo claro; b, c y d) Imagen de fluorescencia. La estrella señala la distribución homogénea de grasa y las flechas los vasos. Aumento 40X.

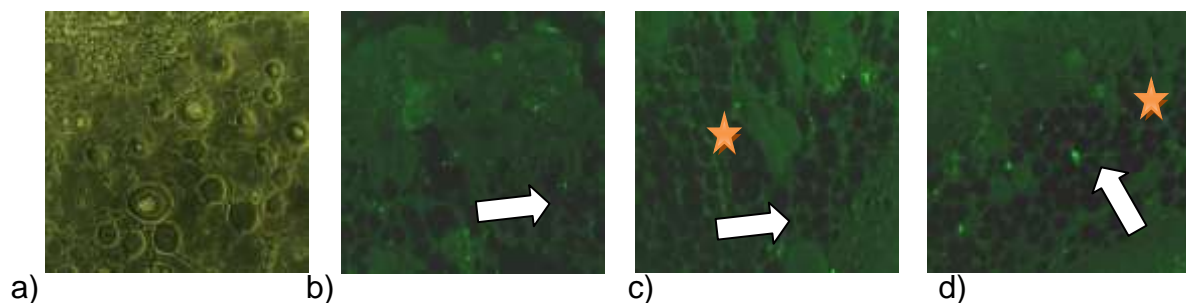


Figura 14: Análisis inmunohistoquímico del injerto. La fluorescencia verde indica la presencia de los vasos sanguíneos mediante el uso del anticuerpo PECAM del ratón 3. a) Campo claro; b, c y d) Imagen de fluorescencia. La estrella señala la distribución homogénea de grasa y las flechas los vasos. Aumento 40X.

Figura 12: Mediante tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo PECAM + verde dirigido al endotelio vascular del ratón I: a) campo claro. b, c y d): no existe fluorescencia en los 3 campos y sin un patrón estructural del tejido adiposo.

Figura 13: Mediante tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo PECAM + verde dirigido al endotelio vascular del ratón II: a) campo claro se limita el tejido adiposo, b, c y d): existe fluorescencia en los 3 campos (Flecha) y con un mejor patrón estructural del tejido adiposo (Estrella).

Figura 14: Mediante tinción de inmunofluorescencia con anticuerpo PECAM + verde dirigido al endotelio vascular del ratón III: a) campo claro se limita el tejido adiposo, b, c y d): existe mayor fluorescencia (Flecha) en los 3 campos y con un mayor patrón estructural del tejido adiposo (Estrella).

Resultados de la medición por **densitometría** en los 3 ratones del grupo de estudio con anticuerpo PECAM.

Ratón	Anticuerpo	Área	Mean
I	Pcam	14,564	61,080
	Pcam	14,564	39,628
	Pcam	14,564	55,246
II	Pcam	14,564	46,002
	Pcam	14,564	49,688
	Pcam	14,564	49,077
III	Pcam	14,564	46,276
	Pcam	14,564	47,327
	Pcam	14,564	46,285

Tabla 9. Resultados de la densitometria en los 3 ratones con anticuerpo PCAM.

NO hubo diferencia significativa entre los 3 ratones en la valoración por la densitometría con PCAM (**P= 0,721**)

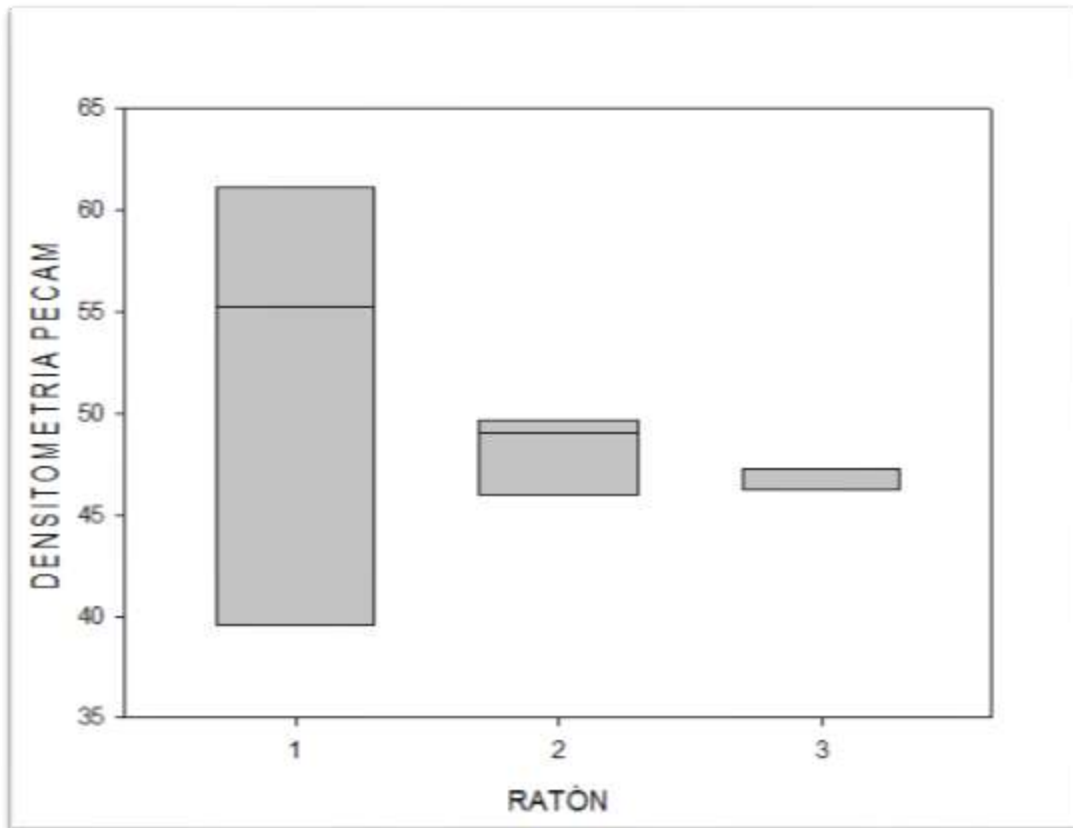


Figura 15. Densitometría de la presencia de vasos sanguíneos con PECAM en los injertos de los 3 ratones de los grupos de estudio.

Figura 15. Se observa el patrón de la mediana entre los 3 ratones en su valoración por densitometría, teniendo intersección entre los 3 grupos.

Discusión

Durante los últimos años se ha popularizado el manejo con injerto graso por los cirujanos plásticos, debido a las patologías como la lipodistrofia facial que implican un déficit de volumen [9,13], pero durante este tiempo se han tenido resultados poco estables debido a la tasa tan variable de sobrevida del injerto graso [14,15], durante estos años se han realizado investigaciones encaminadas a aumentar o estabilizar esta sobrevida del injerto graso, sin encontrar técnicas accesibles o estandarizadas que permitan aumentar las tasas de sobrevidas [12, 21,22].

Actualmente a pesar de los conocimientos actuales, la tasa de sobrevida del injerto graso es tan impredecible (20 al 90 %) [9, 14,15]. Debido a esto parte del protocolo de manejo con injerto graso comprende la utilización de infiltraciones seriadas para lograr el resultado final, esto comprende a un aumento de los costos y una disminución en la satisfacción del paciente al procedimiento [10,11, 14, 15].

Es aceptado actualmente que la sobrevida del injerto graso en el sitio receptor se debe tanto a células adiposas maduras que sobreviven, así como la formación de nuevos preadipocitos que se diferenciaron en el nuevo sitio receptor gracias a procesos de diferenciación y desdiferenciación a partir de células precursoras del tejido injertado [11,17], en este estudio in vivo el injerto se comportó histológicamente similar a lo encontrado en seres humanos (figuras 3-7).

Se encontró que el periodo de adaptación de más de 4 días es el más adecuado, se realizó el manejo de las jaulas, alimento, agua, viruta mediante esterilización al vapor durante 15 Lb/in² de presión, 121°C por 15 min., para impedir que el alimento y materiales presentara pérdida de nutrientes y dejara de ser palatable, o el daño de los mismos. El cambio de las jaulas y alimento se realizó cada 4 días, en la campana de flujo laminar y vestimenta estéril, llevando a cabo este manejo no se produjo morbilidad en la heridas ni infecciones ni factores que alteraran el desarrollo del modelo en estudio (Figuras 1).

Se realizó una estandarización del estudio en un modelo animal, se presentó una sobrevida del 100% de los animales sin morbilidad (Figuras 2), se adecuó el manejo de animales de experimentación, resultando un modelo experimental adecuado reproducible y con validez para valorar la sobrevida del injerto graso, ya que presenta las mismas respuestas clínicas de sobrevida (Figuras 2) (tabla 6: ratón I, menos 31,57%, ratón II, menos 63,41% y ratón III, mas 456%) y cambios histológicos reportados en modelos humanos como son integración de tejido graso, necrosis o apoptosis y fagocitosis por histiocitos (Figuras de la 3-7) [18,19]. En el tejido graso que sobrevivió se encontró gran proceso inflamatorio.

El modelo de ratones NU/NU es adecuado para el desarrollo de este estudio ya que permite una cantidad adecuado de tejido graso tomándolo de la región inguinal bilateral y pre vesical, así como su alimentación y adaptación se llevó acabo de forma adecuada (figuras 1), no se presentó datos de infecciones en herida quirúrgica, a pesar de ser modelos animales con baja o nula producción de células linfocíticas, por tener ausencia de timo [28,31], pero esta característica permitió que en nuestro estudio la toma de un aloinjerto, sin riesgo de rechazo; en los resultados se encontró que la perdida heterogenia del injerto graso fue similar a la encontrada en los seres humanos (30 a 60%) (Tabla 3 y 6), sin ser el modelo con ratones NU/NU un factor de variabilidad ya que es un modelo de homogeneidad genética [31]. A diferencia del estudio de Kyung y Cols. (2009), utiliza ratones C57/BL6, los cuales son de mayor tamaño, requieren de mayores áreas de trabajo, uso de fármacos a mayor dosis, alimentos en mayor cantidad y con los mismo resultados.

El peso del ratón al inicio y al final de las 9 semanas de mantenerlos en las mismas condiciones no fue un factor que determinara la sobrevida del injerto $p=0,184$ (Tabla 4).

La preparación del injerto fue sin realizar liposucción ni con centrifuga, evitando así el trauma del tejido adiposo y siendo éste un factor no controlado para valorar la sobrevida, además que la cantidad de tejido fue en promedio de 0.20g., siendo un volumen similar al encontrado en una cánula de 1mm., como en la técnica de

Coleman [12] y los postulado por Kanchala (2008), que volúmenes pequeños permiten una mejor sobrevida, se siguió este parámetro.

La sobrevida del injerto graso, tratando de seguir cada uno de ellos; se realizó la manipulación del injerto evitando el traumatismo del tejido, colocando en un área receptora con adecuada vasculatura (plano submuscular), como lo refiere Matsuto y Naguyen [14, 15].

En el estudio se encontró que la arquitectura celular en su valoración macroscópica con la tinción con HE y rojo oleoso se presentaron los cambios histológicas visto por PEER (sobrevida de tejido graso, sustitución por histiocitos, y necrosis) así como gran proceso inflamatorio local [19].

Una parte esencial de la integración de los injertos, se determina en los primeras 48 horas de su colocación y es que su sobrevida está dada gracias a vías de difusión [12, 16,19], y éstas son indispensables para su sobrevivencia, parte de que esto se realiza con un selección adecuada del lecho receptor bien vascularizado, libre de infecciones y estable [12,16]. En el estudio se realizó la colocación del injerto graso a nivel submuscular ya que ésta es la que permite la mejor integración del injerto (Smahel J.) [20], así como el área de colocación se propuso la región dorsal fuera de la región cervical y deltoidea porque éstas últimas presentan mayor movilidad, en este estudio no se compara con otros sitios o con factores que influyeran sobre la movilidad muscular, considerando la movilidad como un factor importante para la estabilidad del injerto y mejor integración, se requerirán buscar factores que produzcan una estabilidad del área receptora para valorar si este es una factor de integración adecuada, como los realizados con toxina botulínica por Baek y Jung [35, 36].

La angiogénesis es el factor más determinante para la integración de los injertos (Kim y cols.); en estudios de expresión inmunohistoquímica del endotelio vascular realizados por Pusztaszeri [25], se ha determinado que a nivel del endotelio

vascular tiene un papel causal en el crecimiento de los adipocitos, regresión y funciones de control fisiológico de los vasos, así como células progenitoras que existen en el endotelio vascular [24]. Al igual en un estudio, Pusztaszeri señala que la hipoxia a nivel del tejido graso produce un proceso inflamatorio, que aumenta la expresión de factor de transcripción 1 y otros factores relaciones con la angiogénesis, en los estudios realizados sobre la sobrevida del injerto graso mediante la aplicación de eritropoyetina (EPO) realizados por Saher Hamed, encontró que el producir mayor angiogénesis local provocaba mayor integración del injerto graso, esto sería adecuado valorarlo en un modelo *in vivo*, ya sea con EPO o con toxina botulínica con factores que favorecen localmente la angiogénesis, aunque con mayores limitaciones en el uso del EPO por su diversidad de efectos sistémicos .

En el reporte de rojo oleoso y hematoxilina eosina se encontró que en cada uno de los grupos una tasa variable de proceso inflamatorio agudo y crónico así como angiogénesis como lo describen Cao y Pusztaszeri [24,25]. Un factor importante para estimular la angiogénesis en área receptora (Señalado en los trabajos de Duan y Chenwang) [33,34] y accesible es la aplicación de toxina botulínica como lo postulan en estudios *in vivo* en los trabajo de Baek y Jung [35,36].

En este estudio no se encontró diferencia significativa en la valoración por densitometría (figuras 8-13) de la angiogénesis en tejido injertado (CD34 **p= 0,196** y PCAM **p= 0,721**), aunque esta valoración es subjetiva, por la fluorescencia emitida por los anticuerpo dirigidos al endotelio vascular. Aunque en la valoración macroscópica se encontró gran cantidad de tejido adiposo en campo oscuro que altera la valoración por densitometría ya que al ser este un estudio de respuesta de luminiscencia, al tener campo oscuro se altera el resultado, la medición sería adecuada mediante medición por área por campo determinado y en tinción inmunoperoxidasa que no se realizó en este estudio.

Conclusiones

- El desarrollo de la metodología de obtención y colocación del tejido injertado aplicada en este modelo de experimentación fue adecuado para el estudio, ya que se presentó una sobrevida del 100% sin morbilidad.
- El ratón NU/NU es un modelo experimentación adecuado, reproducible y valido para la aplicación de un aloinjerto, ya que presenta una respuesta clínica, histológica, similar a la del injerto graso en humanos.
- El peso del ratón al inicio y al final del experimento no es una variable que correlacione con la sobrevida del injerto graso.
- Este estudio no se encontró que la angiogénesis fuera un factor de impacto en la sobrevida del injerto graso, sería adecuado valorarlo con otras metodologías (inmunoperoxidasa y conteo por campo).
- En próximos estudios sería conveniente valorar en modelos *in vivo* factores que permitan mejorar la sobrevida, inhibiendo la movilidad y aumentando la vascularidad del área receptora con factores externos, para valorar su importancia en la sobrevida del injerto graso.

Bibliográfia

1. Capeau J, Magré J, Caron-Debarle M, Lagathu C, Antoine B, Béréziat V, Lascols O, Bastard JP, Vigouroux C. Human Lipodystrophies: genetic and acquired diseases of adipose tissue. *Endocr Dev.* 2010; 19:1-20.
2. Herranz P. MD*, De Lucas R, MD, Pérez L., MD, Matías Mayor MD. *Dermatol Clinic* 2008; 26:569-578.
3. Garg A. Lipodystrophies *Am J Med* 2000Feb; 108:143-524.
4. Chen D, Misra A, Garg A. Clinical Review: Lipodystrophy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Nov; 87(11):4845-56
5. Holstein A. Plaschke A, Egberts EH. Lipodystrophy and metabolic disorders as complication of antiretroviral therapy of HIV infection. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001; 109(8) 389-92
6. Anil K. Agarwal, Abhimanyu Garg. Genetic Basis of Lipodystrophies and Management of Metabolic Complications. *Annu. Rev. Med.* 2006. 57; 297-311
7. Gavrilova, O, Marcus- Samuel SB, Graham D, et al 2000. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. *J. Clin. Invest.* 105: 271-78
8. Carr A, Workman C, Carey D, et al. No effect of rosiglitazone for treatment of HIV-1 lipoatrophy: randomized, double-blind, placebo-controlled trial *Lancet*, 363 (2004), pp. 429–438
9. Alencar JC; Andrade SH; Pessoa, Salustiano GP, Días, IS. Autologous fat transplantation for the treatment of progressive hemifacial atrophy (Parry-Romberg syndrome: case report and review of medical literature. *An. Bras. Dermatol.* 2011, Jul-Aug; 86 (4 Suppl 1) 85-8.
10. Billings E Jr, May JW Jr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1989; 83:368–381.
11. Illouz YG. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3,000 cases. *Plast Reconstr Surg.* 1983; 72:591–597.
12. Coleman SR. Structural fat grafting. *Aesthet Surg. J.* 1998; 18:386–388.

13. Obagi S. Autologous fat augmentation: a perfect fit in new and emerging technologies. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2007; 15:221–228.
14. Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, Hassett CA, Argenta LC. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 85:378–386.
15. Matsudo PK, Toledo LS. Experience of injected fat grafting. *Aesthetic Plast Surg.* 1988; 12:35–38.
16. Ratner D. Skin grafting: from here to there. *Dermatol Clin.* 1988; 16:75–90.
17. Chiu DT, Edgerton BW. Repair and grafting of dermis, fat, and fascia. *Plastic Surgery.* 1990, 226–238.
18. Chan CW, McCulley SJ, Macmillan RD. Autologous fat transfer: a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2008; 61:1438–1448.
19. Peer LA. Loss of weight and volume in human fat grafts with postulation of cell survival theory. *Plast Reconstr Surg.* 1950; 5:217–230.
20. Smahel J. Experimental implantation of adipose tissue fragments. *Br J Plast Surg.* 1989; 42:207–211.
21. Rohrich RJ, Sorokin ES, Brown SA. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 113:396–397.
22. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000; 28:875–884.0
23. Nguyen PS, Desouches C, Gay AM, Hautier A, Magalon G. Development of micro-injection as an innovative autologous fat graft technique: the use of adipose tissue as dermal filler. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012; 65:1692-1699.
24. Cao Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:107-115.
25. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54:385-395.

26. Zuñiga J, Tur M, Milocco S, Piñeiro R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. México: McGraw-Hill Interamericana, 2001; p.682
27. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Institute of laboratory animals National Research Council. México: Academia Nacional de Medicina, 2002, p. 148
28. Hernández, S., El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*, 2006. 2(3): p. 252-256
29. Atchley W, Fitch W. Genes trees and the origins of inbred strain of mice. *Science* 1991; 254: 554-558.
30. Benavides F, Guénet J. Manual de genética de roedores de laboratorio: principios básicos y aplicaciones. Alcalá: Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SE- CAL) Universidad de Alcalá, 2003; 312.
31. Carbone Cecilia, Fabricio Maschi. El ratón nude (NU/NU) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva*. 2006. 1 (5) 19 – 23
32. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg*. 2001 Jan; 28(1):111
33. Ersek RA. Transplantation of purified autologous fat: a 3-year follow-up is disappointing. *Plast Reconstr Surg*. 1991 Feb; 87 (2):219-221
34. Duan C, Xu G, Zhou J, Wei G, Li S. The effect of botulinum toxin A on skin flap survival in rats. 2011 Jan; 27(1):31-35 Chinese.
35. Chenwang D, Shiwei B, Dashan Y, Qiang L, Bin C, Muxin Z, Pengcheng L, Senkai L. Application of botulinum toxin type A in myocutaneous flap expansion. *Plast* 2009 Nov; 124(5):1450-7.
36. Baek RM, Park SO, Jeong EC, Oh HS, Kim SW, Minn KW, Lee SY. The effect of botulinum toxin A on fat graft survival. *Aesthetic Plast Surg*. 2012 Jun; 36(3):680-6.
37. Jung MK, Song SB, Cheon SY, Park Y, Park H, Kim C, Cho BJ, Lee WJ, Bang JW, Bang SI, Cho D. Botulinum toxin enhances the implantation effect of adipocytes in C57/BL6 mice. *Aesthetic Plast Surg*. 2009 Sep; 33(5):722-9.

Anexos

Aspectos éticos

Los procedimientos propuestos estarán de acuerdo a las normas éticas, y en apego a la ley general de salud en materia de investigación para la salud así como en el apartado referente al manejo de pequeñas especies y animales en experimentación (NOM-062-ZOO-1999.) y con los códigos y normas internacionales vigentes de las buenas prácticas de la investigación clínica.

El estudio se apegará a las normas y reglamentos institucionales y a los de la ley general de salud, así como al programa de microcirugía para residentes de cirugía plástica y reconstructiva.

Los riesgos inherentes al estudio están correctamente previstos, al contar con el área, medicamentos, material y personal adecuado y capacitado para cada uno de los procesos de este proyecto.

Aspectos de bioseguridad.

El protocolo se sujetará a la norma oficial mexicana vigente actualmente señalada anteriormente en los aspectos de bioseguridad (NOM-062-ZOO-1999).

En los cuales no sujetaremos a la norma en todos los apartados enunciados a continuación y en concordancia con el estudio a realizar.

3.14. Bienestar: asegurando las condiciones biológicas, ambientales y psicológicas que requiere un animal para el desarrollo como animal de laboratorio. Así como el apartado **3.15.** Bioseguridad: cumpliendo con una metodología, técnicas, aparatos e instalaciones destinados a salvaguardar la salud, la vida de las personas, animales de laboratorio. Desglosando cada uno en los apartados siguientes.

El precepto **3.16** se cumplirá al realizar el proyecto en una instalación adecuada como es en el bioterio y laboratorio que cumplen con las especificaciones para el cuidado y desarrollo de animales en estudio. Y teniendo un médico veterinario zootecnista capacitado para la atención y manejo de animales en cada uno de los procesos **(4.2).**

4.4. Obtención de animales. Todos los animales se adquirirán conforme a la norma en una unidad establecida y con la documentación apegada a las normas legales de alojamiento (bioterio del INNSZ) acompañándose de la información que describa el estatus microbiológico y genético de sus colonias o de los animales. Y se cumplirá con las especificaciones de traslado y adaptación (mínimo 4 días) de los animales en estudio, acompañados durante el mismo por el medio veterinario. El apartado **4.5.** Certificado de salud y calidad, se solicitarán los mismos en el área de compra.

Nos sujetaremos a las características de alimentación señalados en el apartado **(4.7. Alimento)**, así como de su almacenamiento y cuidado; se destinará un espacio para su almacenamiento que cumpla con la humedad, temperatura adecuada y libre de animales para su adecuado almacenamiento. Se realizará el ajuste de las instalaciones (ventilación estéril, con una humedad controlada, ventilación con flujo estéril, extractor continuo, la iluminación adecuada con periodos de oscuridad programables, los cuales se cuentan en la instalaciones y esterilidad del área de forma periódica), así como tener el cuidado de proteger a los animales de la introducción de objetos u otros animales a su área que ocasionen su contaminación; así como el escape de los mismos, realizando el aislamiento de su área y asegurando la misma solo para el desarrollo de los animales y sólo la introducción en el área del personal autorizado, se cuenta con el equipo para esterilizar y cambiar periódicamente las jaulas, teniendo la cantidad de jaulas disponibles para su recambio 2 veces por semana y un área para su recambio estéril, que se realizará en la campana de flujo laminar y el equipo para su esterilización . El cuarto se mantendrá aislado casi la mayor parte del tiempo y se tendrá visualización a través de una ventanilla. El desecho de materiales se realizará periódicamente y se realizará su eliminación mediante incineración en el bioterio del IMSS.

5.1.2. En salud animal se mantendrá aislamiento total en el cuarto asignado para el estudio

5.1.3. Manejo. Alimentación y provisión de agua. El alimento será de libre acceso, palatable, de una fórmula nutricional constante y certificada en cuanto a su composición y estéril. El agua será potable, estéril y suministrarse a libre acceso durante toda la vida del animal.

El alojamiento será cumpliendo con las especificaciones de humedad, temperatura, aislamiento adecuado y en un área única de desarrollo, señalados en el apartado 6, así como el área de trabajo quirúrgico se realizara en un área especial (campana de flujo laminar y con esterilización previa, con un periodo de adaptación y recuperación posquirúrgica supervisada por un médico veterinario, se cuenta con áreas especial para el manejo de las jaulas y lavado de las mismas y almacenamiento y un área para el almacenamiento de alimentos y líquidos con los cuidados adecuado, en cumpliendo con lo estipulado en la norma. Dentro de la técnicas experimentales se realizara bajo anestesia y analgesia adecuada bajo la atención del médico veterinario capacitado en el uso de los fármacos para el mismo (ketamina, fenobarbital), acorde a la especie, peso y por vía IM. Y con la vigilancia posquirúrgica, teniendo atención a su entorno y medio ambiente durante todo el proceso.

La eutanasia se realizara cumpliendo la norma para evitar su sufrimiento, estrés y que la eliminación de tejidos cumpla con las especificaciones adecuadas y ética establecida, será realizada por el médico veterinario con los fármacos que induzcan la misma con el mínimo sufrimiento y estrés.