



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES "DR. ANTONIO FRAGA MOURET"
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"**

**EXPRESIÓN DEL COMPLEJO INFLAMASOMA NLRP3 EN CÉLULAS
ENDOTELIALES DE LAS ANASTOMOSIS MICROVASCULARES COMO
FACTOR PREDICTOR DE TROMBOSIS**

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

**PRESENTA:
DRA. CLAUDIA GARCÍA FRANCO**

**ASESORES:
DR. ALEJANDRO CRUZ SEGURA
DRA. MARIA DEL PILAR CRUZ DOMÍNGUEZ
DR PEDRO GRAJEDA LOPEZ**



CIUDAD DE MÉXICO; JUNIO 2018



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.

ÍNDICE

Portada.....	1
Resumen	3
Abstract.....	4
Antecedentes	5
Material y Métodos.....	9
Resultados	11
Discusión	17
Conclusiones	18
Bibliografía	19

RESUMEN

Expresión del complejo inflamasoma NLRP3 en células endoteliales de las anastomosis microvasculares como factor predictor de trombosis.

Material y métodos: Se realizó un estudio transversal, comparativo, descriptivo y prospectivo para comparar la expresión del inflamasoma NLRP3 medido mediante PCR, en las células endoteliales de las anastomosis microvasculares que se complicaron con trombosis arterio-venosa comparada con aquellas anastomosis sin trombosis en la medición preanastomosis. Se realizó un muestreo probabilístico por conveniencia de mayo de 2017 a marzo de 2018 en el Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret” del Centro Médico La Raza, se incluyeron 27 pacientes. Se realizó estadística descriptiva sobre el grupo de pacientes incluidos en este estudio y sobre las características del paciente y del colgajo se analizaron *Prueba Chi cuadrada* entre el grupo con trombosis y el grupo sin trombosis.

Resultados: Se obtuvieron muestras de vasos sanguíneos de 26 intervenidos a reconstrucción con colgajos libres. 19 pacientes (73%) fueron mujeres y 7 (27%) hombres. Los colgajos realizados con mayor frecuencia fueron DIEP 11 (40.7%), Anterolateral de muslo (ALT) 3 (11.5%), peroné libre 3 (11.5%), Gracilis 2 (7.69%), paraescapular extendido 2 (7.69%), TRAM MS2 2 (7.69%), escapular extendido 1 (3.84%), radial 1 (3.84%).

Dentro de los factores de riesgo estudiados como factor predictor de trombosis se presentó Diabetes Mellitus tipo 2 en 6 (23.07%), tabaquismo 5 (19.23%). Las complicaciones fueron trombosis 1 (3.84%), necrosis grasa < 20% en 1 (3.84%), necrosis cutánea < 20% en 1 (3.84%) y dehiscencia de herida en 1 paciente (3.84%).

Conclusiones: La identificación de factores de riesgo asociados a la obstrucción de las microanastomosis vasculares mejora el entendimiento del mecanismo de trombosis y ofrece el mejor tratamiento y en el menor tiempo posible logrando incremento en la tasa de supervivencia de los colgajos.

Palabras clave: Palabras clave: inflammasoma, trombosis microvascular, caspasas, apoptosis, NLRP3.

SUMMARY

Expression of the NLRP3 inflammatory complex in endothelial cells of the microvascular anastomosis as a predictor of thrombosis.

Material and methods: A cross-sectional, comparative, descriptive and prospective study was carried out to compare the expression of NLRP3-measured inflammatory cells measured by PCR in the endothelial cells of the microvascular anastomosis, which will be complicated by arteriovenous thrombosis compared to those without anastomosis without thrombosis. Preanastomosis measurement. A probabilistic sampling was performed for convenience, 27 patients were included at the time.

Results: Blood samples were obtained from 26 patients undergoing reconstruction with free flaps. 19 patients (73%) were women and 7 (27%) were men. The most frequent flaps were DIEP 11 patients (40.7%), Anterolateral thigh (ALT) 3 (11.5%), free fibula 3 (11.5%), Gracilis 2 (7.69%), extended paraescapular 2 (7.69%), TRAM MS2 2 (7.69%), extended scapular 1 (3.84%), radial 1 (3.84%).

Among the risk factors studied as a predictor of thrombosis, Type 2 diabetes mellitus was present in 6 patients (23.07%), smoking 5 (19.23%). The complications were thrombosis 1 (3.84%), fat necrosis <20% in 1 patient (3.84%), cutaneous necrosis <20% in 1 (3.84%) and wound dehiscence in 1 patient (3.84%).

Conclusions: The identification of risk factors associated with the obstruction of vascular microanastomosis improves the understanding of the mechanism of thrombosis and offers the best treatment and in the shortest possible time, increasing the survival rate of the flaps.

Key words: inflammatory, microvascular thrombosis, caspases, apoptosis, NLRP3.

ANTECEDENTES

La “*cirugía microvascular*” se refiere a la coaptación quirúrgica de vasos de pequeño calibre (desde 0.3 a 2.0 mm de diámetro) realizada bajo magnificación e iluminación especial. En un ambiente clínico, este término, es comúnmente usado como sinónimo de “*microcirugía reconstructiva*”, el cual abarca a los *reimplantes* y *la transferencia de tejido libre (también llamados colgajos libres o colgajos microquirúrgicos)*.¹

La técnica de cirugía microvascular se considera una técnica indispensable en cirugía plástica ya que permite la reconstrucción de defectos extensos y complejos.

El perfeccionamiento de estos colgajos ha originado un aumento significativo en la tasa supervivencia, siendo de más del 95% en la mayoría de los grandes centros hospitalarios.⁵⁻⁸ Los factores que han intervenido para lograr estos resultados son entre otros, el perfeccionamiento de la técnica quirúrgica, la adecuada selección de los pacientes y los cuidados perioperatorios a los que son sometidos dichos pacientes.

La clave para mejorar la tasa de éxito de los colgajos libres es la detección temprana de obstrucción vascular y el salvamento de los colgajos afectados mediante una *reintervención urgente* (como máximo dentro de las 6 primeras horas de iniciada la trombosis) , ya que posterior a dicho lapso la probabilidad de salvar el colgajo se reduce significativamente.⁹ La tasa general de obstrucción vascular (trombosis o compresión extrínseca) es de alrededor de 20% en los colgajos microvasculares¹⁰

El “*estándar de oro*” para la monitorización de los colgajos libres es la observación clínica de la coloración y del llenado capilar. Se ha reportado una sensibilidad del 100% con 36% de falsos positivos.¹¹ Sin embargo este método es subjetivo y

observador dependiente. Incluso el personal médico bien entrenado puede ser incapaz en algunas ocasiones de detectar una trombosis de la anastomosis lo suficientemente temprana para salvar el colgajo.¹²

Debido a lo anterior han surgido muchos métodos para la monitorización de los colgajos en el periodo posoperatorio, cada uno con ventajas y múltiples desventajas, sin embargo la tasa de trombosis en las anastomosis se ha mantenido constante.

Complejo inflammasoma y trombosis vascular

Recientemente han existido avances cruciales en la patogénesis de la aterotrombosis, aterosclerosis y las complicaciones trombóticas. Tanto la inflamación como la apoptosis tienen roles críticos en la progresión e inicio de la aterotrombosis.¹³ La apoptosis o muerte celular programada es esencial en el desarrollo de los procesos homeostáticos de los organismos multicelulares. Además, es un componente muy importante en la respuesta celular a la lesión, incluyendo la lesión endotelial.¹⁴

A pesar del inicio del proceso de muerte celular, las células apoptóticas están implicadas en procesos inflamatorios por medio del reclutamiento de otras células inflamatorias. Además de sus características inmunogénicas e inflamatorias, las células apoptóticas poseen un alto potencial trombogénico que puede agravar la falla en las fístulas arteriovenosas.¹⁴

La activación de las caspasas ha emergido como el evento molecular central que conduce a la apoptosis, precediendo a la degradación del DNA, y al desarrollo de la morfología apoptótica.¹⁵ Por lo tanto la expresión de la caspasas en muestras de tejido indica la activación del proceso de apoptosis.

La apoptosis puede ser el vínculo entre la inflamación y la trombosis.¹⁴

Las citocinas proinflamatorias IL-1B e IL-18 son activadas mediante escisión proteolítica de precursores inactivos por medio de la caspasa 1. Después de una lesión, la expresión de la caspasa 1 está sobrerregulada, conduciendo a la generación de una proteína activa por medio de la oligomerización de moléculas de procaspasa 1. Este proceso involucra la formación de un complejo macromolecular intracitosólico conocido como inflamasoma.¹⁶

En este momento, tres diferentes tipos de inflamasoma han sido descritos, NLRP1, NLRP3 y NLRC4, siendo el inflamasoma NLRP3 el más caracterizado.

Este subtipo está formado por la proteína NALP3, la cual interactúa con dos proteínas adaptadoras, llamadas ASC (apoptosis-associated speck-like protein) y CARDINAL que permiten el reclutamiento de caspasas 1; la proteína ASC está constituido por un dominio Pirina (PYD) y un dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) que interacciona con la pro caspasa-1, liberando su forma activa, caspasa-1. Por otro lado, CARDINAL está formada por un dominio FIIND y otro CARD que interacciona con una segunda molécula de pro caspasa-1. A su vez, NALP3 posee un dominio C-Terminal con repeticiones ricas en leucina (LRR), capaces de sensor señales y un dominio pirina (PYD), el cual es fundamental en esta cadena, ya que interactúa con el dominio PYD de la proteína ASC. Es así como el inflamasoma NALP3 se estimula liberando formas activas de caspasas-1 a través de estas proteínas adaptadoras, clivando unidades de pro IL-1 β y liberandola finalmente en su forma activa, potente estimulador de procesos inflamatorios. Además, se estimularía la liberación de IL-18 y al Factor Nuclear Kappa β (FN- $\kappa\beta$). Por otro lado, el inflamasoma NALP3 es regulado a través de la inhibición de ASC por una proteína pirina intracelular¹⁷.

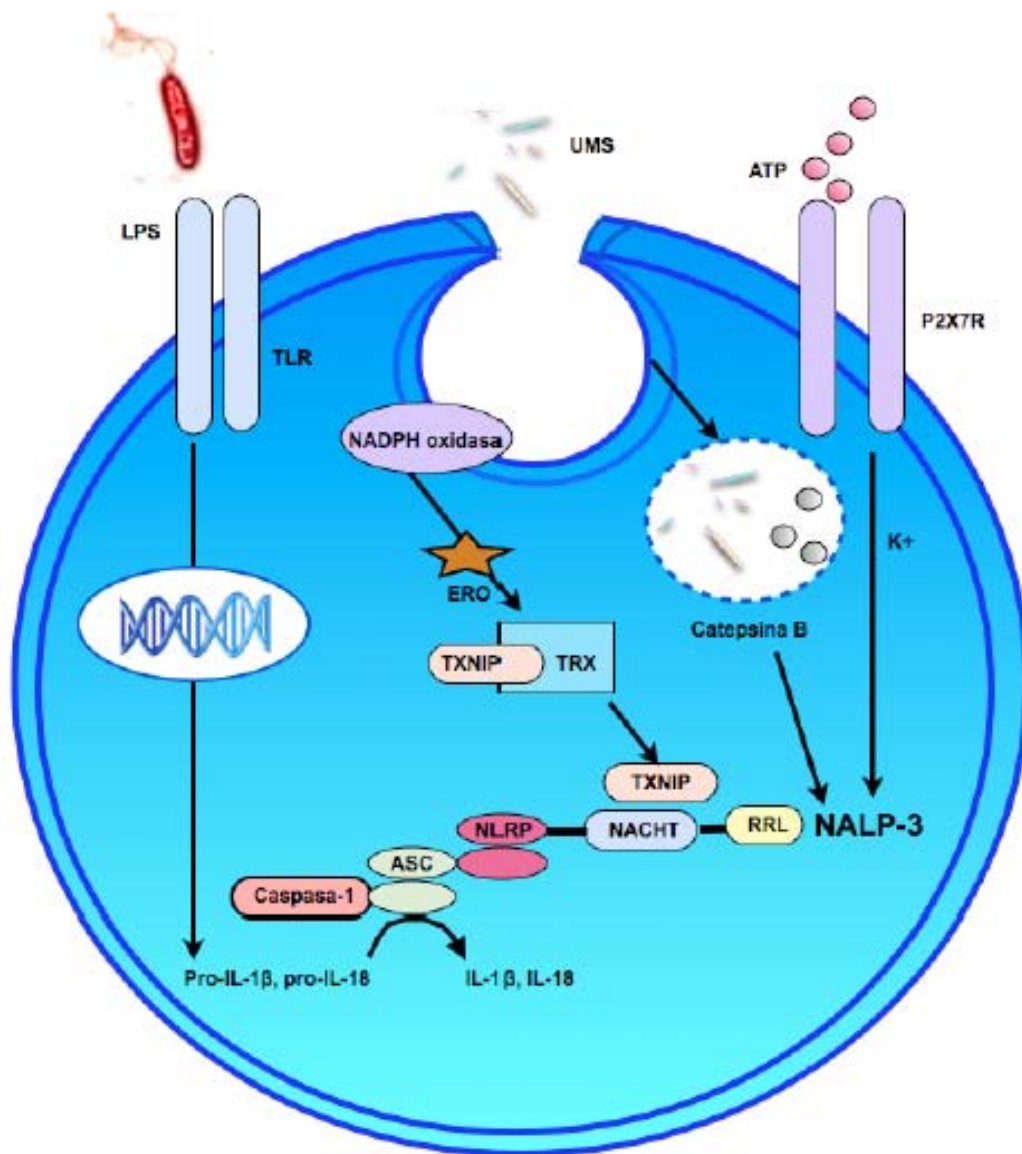


FIGURA 1. Mecanismos propuestos para la señalización intracelular a través de NLRP-3.
 LPS: Lipopolisacárido, TLR: receptor tipo Toll, UMS: urato monosódico, ATP: adenosin trifosfato, P2X7R: receptor purinérgico P2X, canal iónico activado por ligando 7, ERO: especies reactivas de oxígeno, TXNIP: proteína de interacción con tioredoxina, TRX: tioredoxina, ASC: proteína adaptadora asociada a partículas apoptóticas, NACHT: dominio central de unión y oligomerización de nucleótidos, RRL: dominio rico en leucinas. Adaptado de la Referencia 16.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, comparativo, prospectivo, descriptivo, se incluyeron pacientes con patología diversa, programados para reconstrucción microquirúrgica con colgajos libres programados durante el periodo comprendido de Septiembre del 2016 a Agosto del 2017 en el servicio de Cirugía Plástica del Hospital de Especialidades, CMN La Raza.

Se consideraron como criterios de inclusión: pacientes mayores de 16 años, derechohabientes del IMSS, ambos sexos, patología diversa, programados para reconstrucción microquirúrgica con colgajos libres, Se consideraron criterios de no inclusión: Inflamación aguda de tejidos blandos tanto en sitio receptor como donador, osteomielitis, enfermedad vascular periférica, vasculitis, enfermedad renal o hepática crónica y disfunción cardíaca.

Durante el periodo transoperatorio se tomó una muestra de 0.5 centímetros de longitud tanto del vaso donador como del receptor, el cual se almacenó con solución preservadora de RNA (RNAlater). Dicho frasco fué enviado al laboratorio de biología molecular de la Escuela Superior de Medicina del IPN para su procesamiento. Se corroboró la presencia de dicha información y fue vaciada en la base de datos diseñada exprofeso.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó mediante de los datos provenientes de la hojas de recolección de datos diseñadas e impresas por el investigador. En dichas hojas se recabaron de manera escrita los datos obtenidos de la valoración clínica y doppler en una, y los obtenidos mediante la valoración con la cámara en otra hoja. Los datos personales del paciente, así como sus antecedentes serán recabados en ambas hojas. Estos datos fueron vaciados en la matriz de datos del programa SPSS para MAC versión 22 y analizados posteriormente.

Se realizó estadística descriptiva sobre el grupo de pacientes incluidos en este estudio y sobre las características del paciente y del colgajo se analizaron *Prueba Chi cuadrada* entre el grupo con trombosis y el grupo sin trombosis.

RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de vasos sanguíneos de 26 pacientes intervenidos a reconstrucción con colgajos libres. 19 (73%) fueron mujeres y 7 (27%) hombres.

Los colgajos realizados con mayor frecuencia fueron DIEP 11 (40.7%) de los cuales 1 ameritó reconstrucción con colgajo DIEP bilateral (3.84%), Anterolateral de muslo (ALT) 3 (11.5%), peroné libre 3 (11.5%), Gracilis 2 (7.69%), paraescapular extendido 2 (7.69%), TRAM MS2 2 (7.69%), escapular extendido 1 (3.84%), radial 1 (3.84%).

Dentro de los factores de riesgo estudiados como factor predictor de trombosis (diabetes mellitus tipo 2 y tabaquismo) se presentó Diabetes Mellitus tipo 2 en 6 pacientes (23.07%) y tabaquismo en 5 pacientes (19.23%).

Dentro de las complicaciones que se presentaron fueron: trombosis 1 (3.84%), la cual se resolvió mediante re intervención quirúrgica en tiempo menor a 1 hora de identificada la trombosis clínicamente, necrosis grasa < 20% en 1 (3.84%), necrosis cutánea < 20% en 1 y dehiscencia de herida en 1 (3.84%).

Con respecto a la expresión del complejo inflammasoma NLRP3 en las muestra de vasos no se han completado los estudios de biología molecular, éste análisis está en proceso mediante el apoyo del departamento de biología molecular de la Escuela Superior de Medicina del IPN. Una vez recabada la información serán publicados los resultados.

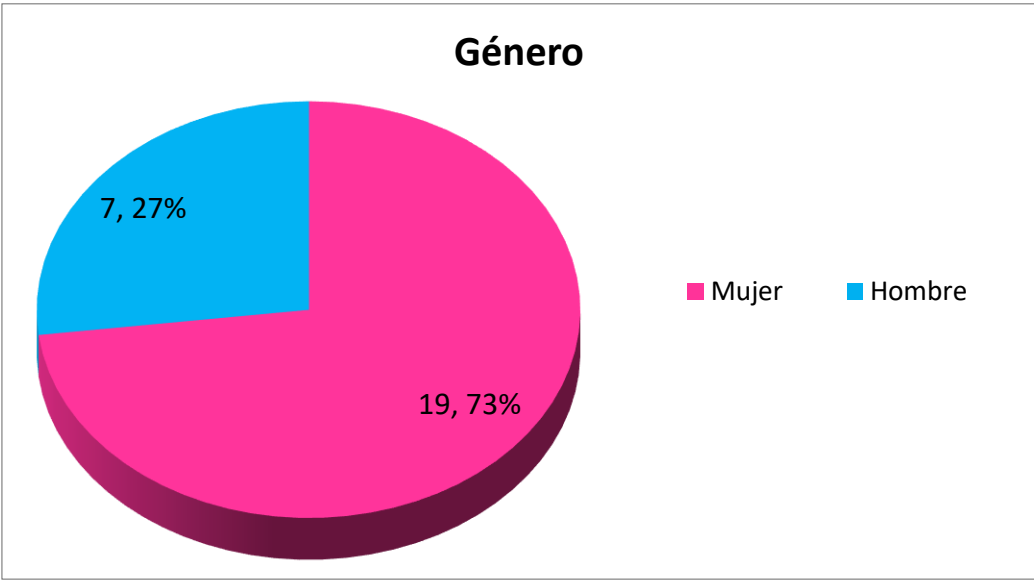


Fig. 1. Relación de Mujeres: Hombres incluidos en el análisis.

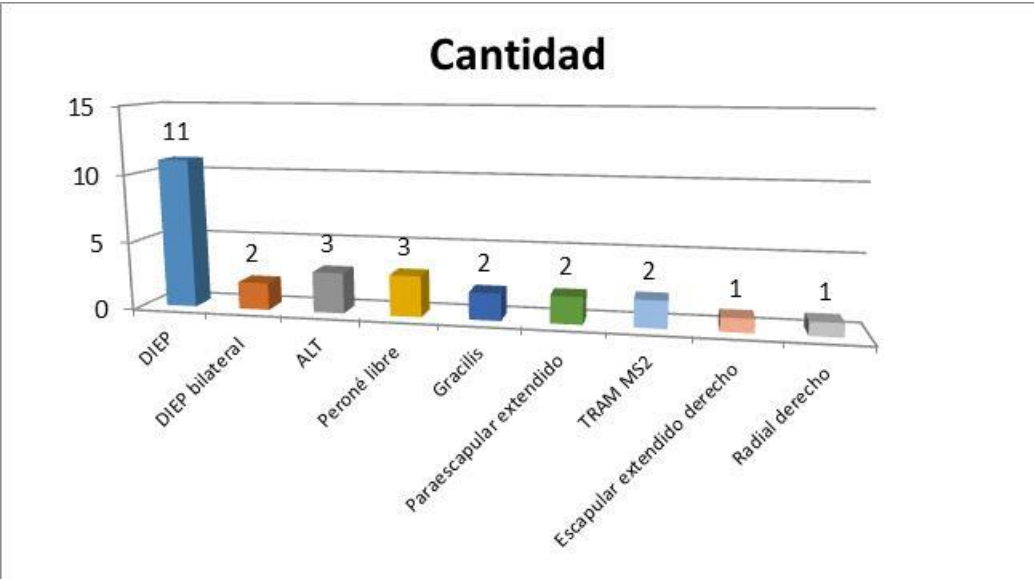


Fig. 2. Tipo de colgajos realizados para reconstrucción

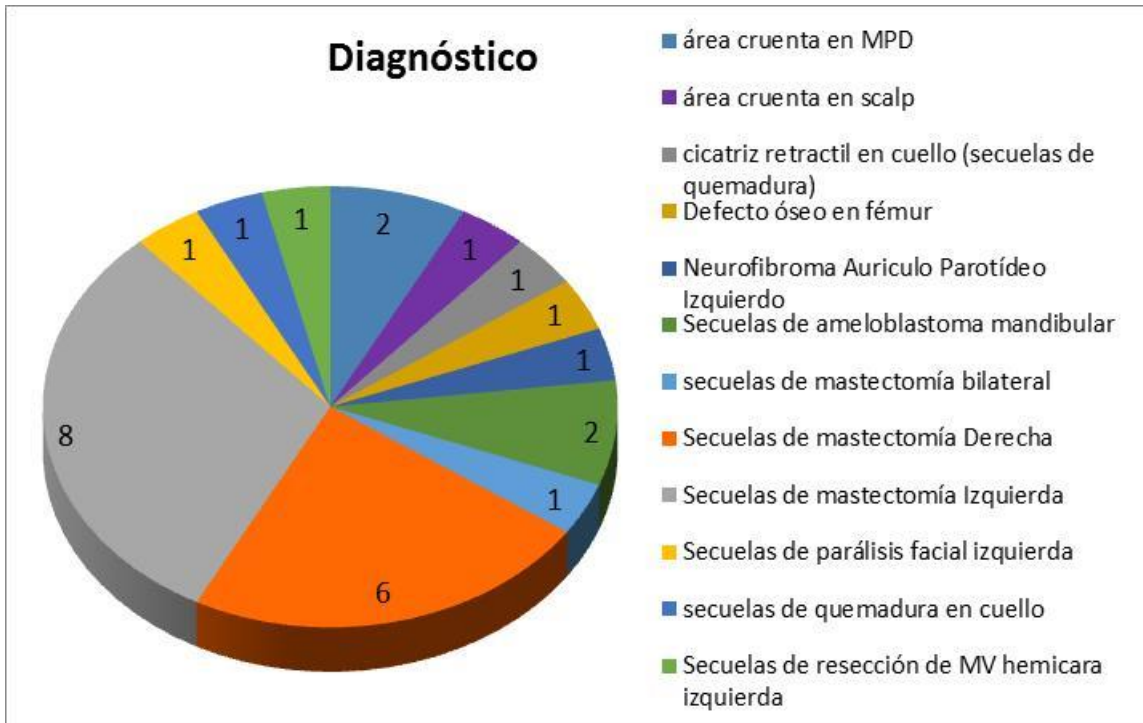


Fig 3. Diagnósticos más frecuentes encontrados en los pacientes estudiados

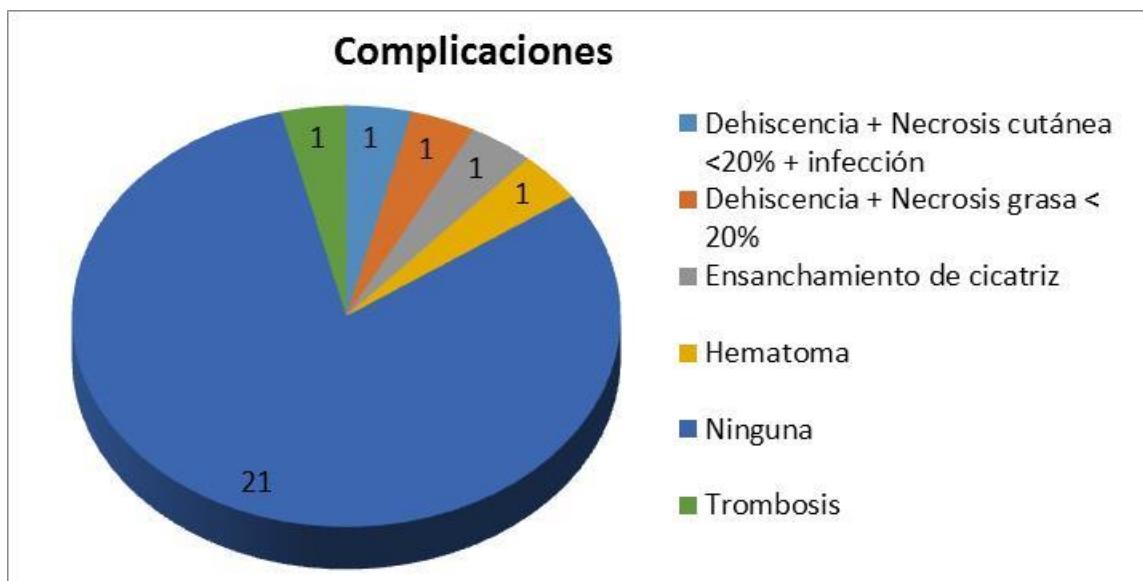


Fig. 4. Complicaciones presentadas en los pacientes estudiados.

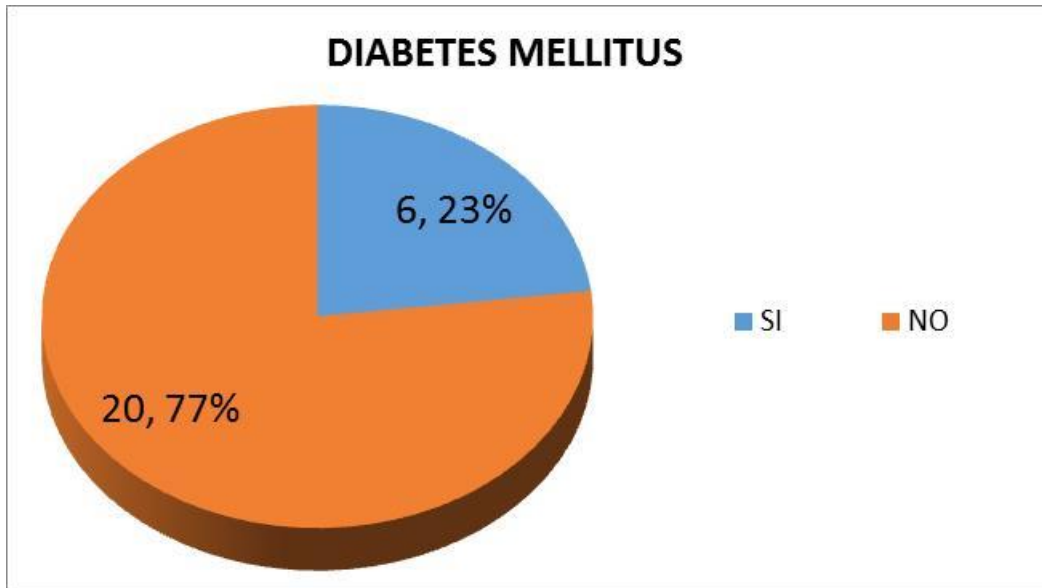


Fig. 5. Pacientes con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 2

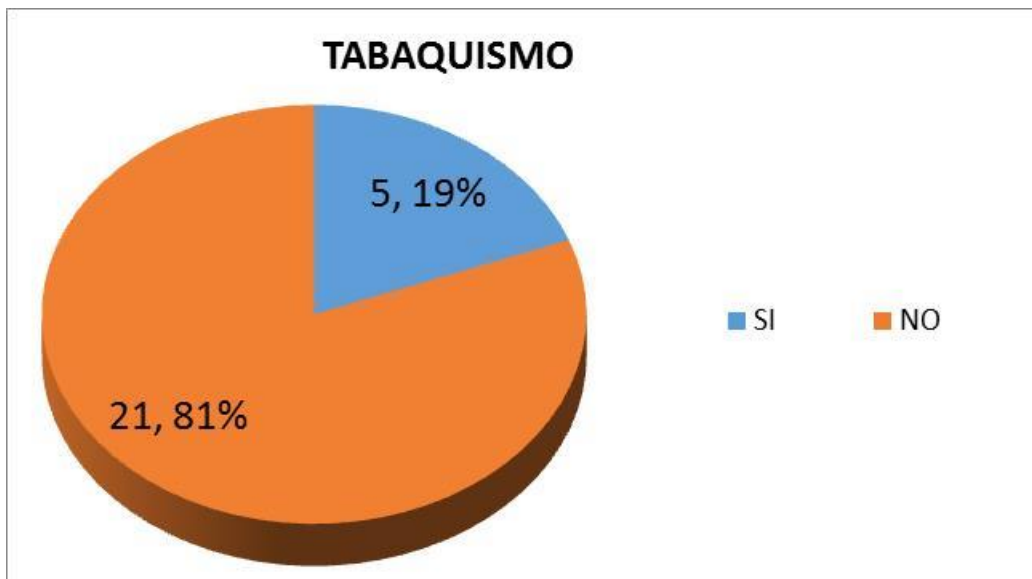


Fig. 6. Pacientes con hábito tabáquico encontrados en el estudio



Fig. 7. Pacientes con presencia de trombosis durante el estudio.

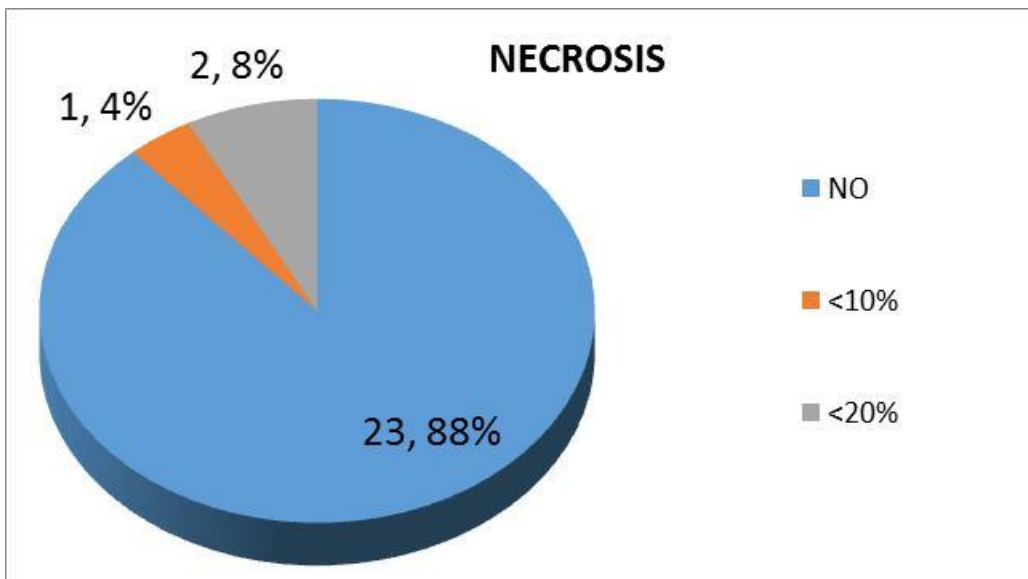


Fig. 8. Pacientes con presencia de necrosis (grasa y cutánea < 20%).

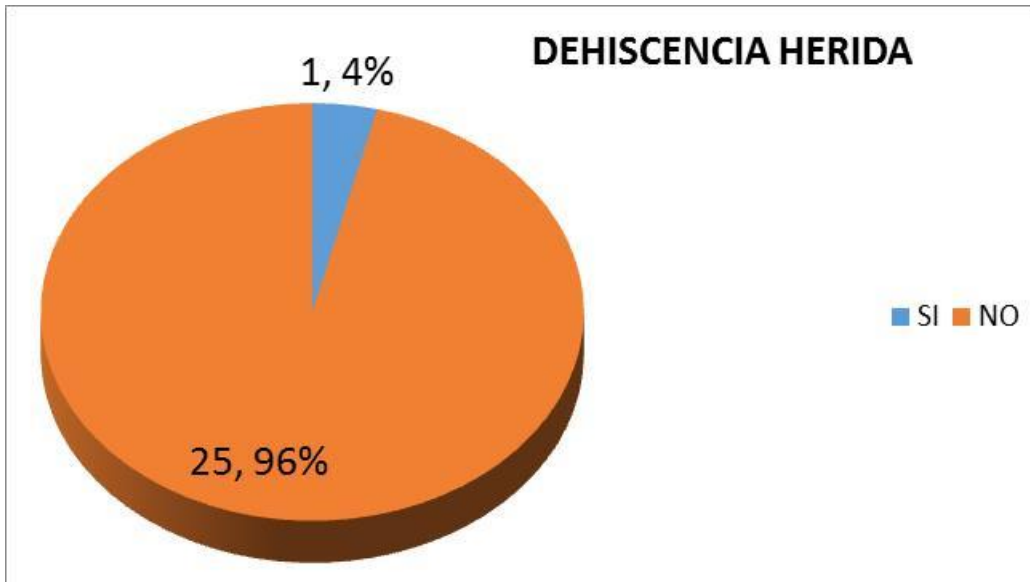


Fig. 9. Pacientes con dehiscencia de herida durante el estudio.

DISCUSIÓN

En la actualidad, la tasa de trombosis vascular en nuestros colgajos durante el periodo trans y posoperatorio es de alrededor del 15-20 %. En la mayoría de las ocasiones no existe un factor identificable que explique dicha trombosis. Nos propusimos identificar en este estudio la expresión del complejo inflamasoma en endotelio de las anastomosis que se complicaron con trombosis comparadas con las que no sufrieron trombosis. Además de comparó la expresión del inflamasoma con el mismo tejido una vez que se estableció la trombosis. Esto es importante dado que puede funcionar como un factor predictor de trombosis microvascular.

No existe ningún estudio en la actualidad que investigue la expresión de este complejo en anastomosis microvasculares.

La identificación del complejo inflamasoma expresado en los vasos sanguíneos de las anastomosis puede ayudar a mejorar el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad y con ello reducir la tasa de complicaciones de los colgajos microquirúrgicos en todos los pacientes que son sometidos a reconstrucción microquirúrgica.

CONCLUSIONES

Predominó el género femenino en paciente sometidos a reconstrucción con colgajos microquirúrgicos con un N = 19 pacientes (73%) y 7 (27%) hombres.

Los colgajos realizados con mayor frecuencia fueron DIEP 11 pacientes (40.7%) Anterolateral de muslo (ALT) 3 pacientes (11.5%), peroné libre 3 (11.5%), Gracilis 2 (7.69%), paraescapular extendido 2 (7.69%), TRAM MS2 2 (7.69%), escapular extendido 1 (3.84%), radial 1 (3.84%).

Los diagnósticos encontrados con mayor frecuencia en los pacientes estudiados fueron secuelas de mastectomía por enfermedad neoplásica, seguido por defectos en cabeza y cuello secundarios a malformaciones, resección de tumores y secuelas de quemaduras.

Dentro de los factores de riesgo estudiados como factor predictor de trombosis se presentó Diabetes Mellitus tipo 2 en 6 pacientes (23.07%) y tabaquismo en 5 pacientes (19.23%) sin encontrarse expresadas en aquellos pacientes que presentaron complicaciones como trombosis, necrosis grasa, necrosis cutánea y dehiscencia de herida.

Dentro de las complicaciones que se presentaron en los pacientes fueron: trombosis 1 paciente (3.84%), la cual se resolvió mediante reintervención quirúrgica en tiempo menor a 1 hora de identificada la trombosis clínicamente, necrosis grasa < 20% en 1 paciente (3.84%), necrosis cutánea < 20% en 1 paciente y dehiscencia de herida en 1 paciente (3.84%). Las complicaciones como necrosis grasa y cutánea así como la dehiscencia parcial de la herida se resolvieron mediante curaciones diarias y cierre por segunda intención.

BIBLIOGRAFIA

1. Neligan P, Gurtner G. Plastic Surgery Principles. 2013. Volume 1. Third Ed. Elsevier. Pp 587
2. Jacobson JH, Suarez EL. Microsurgery in anastomosis of small vessels. Surg Forum 1960;11:243–245
3. Malt RA, McKhann CF. Replantation of severed arms. JAMA. 1964;189:716–722. McLean DH,
4. Buncke HJ Jr. Autotransplant of omentum to large scalp defect with microsurgical revascularization. Plast Reconstr Surg. 1972;49:268–274.
5. Brands MT, van den Bosch SC, Dieleman FJ, Bergé SJ, Merks MA. Prevention of thrombosis after microvascular tissue transfer in the head and neck: A review of the literature and the state of affairs in Dutch Head and Neck Cancer Centers. Int J Oral Maxillofac Surg. 2010;39:101–106.
6. Kroll SS, Miller MJ, Reece GP, et al. Anticoagulants and hematomas in free flap surgery. Plast Reconstr Surg. 1995;96:643–647.
7. Khouri RK, Cooley BC, Kunselman AR, et al. A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. Plast Reconstr Surg. 1998;102:711–721.
8. Salemark L. International survey of current microvascular practices in free tissue transfer and replantation surgery. Microsurgery 1991;12:308–311.
9. Martin-Granizo R, Gomez F, Perez MC, Falahat F, Martinez L, Berguer A. Secondary ischemic tolerance of the fasciocutaneous radial forearm free flap. Plast Reconstr Surg 1999; 103:1797–1798.
10. Bui D, Cordeiro P, Disa J. Free flap reexploration: Indications, Treatment, and Outcomes in 1193 Free flaps. Plast. Reconstr. Surg. 2007; 119: 2092
11. Cho BC, Shin DP, Byun JS, Park JW, Baik BS. Monitoring flap for buried free tissue transfer: its importance and reliability. Plast Reconstr Surg 2002; 110(5): 1249–1258.
12. Cheng K. Recent advances in postoperative free microvascular flap monitoring. Formosan journal of Surgery. 2013; 46, 145-148
13. Wu KK. Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. J Formos Med Assoc 1996;95:661±6.
14. Chu PH, Jung SM, Yeh CH, Wu HH, Shiu TF, She HC, Tseng NM. Expression of caspase-3-dependent apoptosis in mural thrombi leukocytes. APMIS 2008;116:995±9.
15. Garrity MM, Burgart LJ, Riehle DL, Hill EM, Sebo TJ, Witzig T. Identifying and quantifying apoptosis: navigating technical pitfalls. Mod Pathol 2003;16:389±94.

16. DP Abulafia et al. Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2009; 29, 534–544
17. Church J, Cook G, McDermott M. Primer: Inflammasomes and interleukin 1 in inflammatory disorders. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2008;4:34-42.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
19. Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. Development and validation of realtime quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 1999; 270: 41-9.