

11211

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
SERVICIO DE CIRUGIA PLASTICA

"EVALUACION ULTRAESTRUCTURAL DE PROTECCION
CELULAR A LA ISQUEMIA MEDIANTE LA PERFUSION
TRANSOPERATORIA DE COLGAJOS MICROQUIRURGICOS
CON SOLUCIONES PRESERVADORAS DE TEJIDOS"

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN CIRUGIA
PLASTICA ESTETICA Y RECONSTRUCTIVA

P R E S E N T A :
RAMIRO HESQUIO SILVA

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO



DIRECCION DE ENSEÑANZA

ASESOR DE TESIS: DR. NICOLAS SASTRE ORTIZ

DIRECTOR DE ESPECIALIDADES QUIRURGICAS DEL HOSPITAL
GENERAL DE MEXICO



MEXICO, D.F.

FEBRERO 2005

m342615



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.

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO

DR. EDUARDO DE ANDA BECERRIL



**Director de Enseñanza e Investigación
Hospital General de México**

A handwritten signature in black ink, appearing to be "E. de Anda Becerril", written over a horizontal line.

DIRECCION DE ENSEÑANZA

DR. NICOLAS SASTRE ORTIZ

**Director de Tesis
Profesor Titular del Curso de Especialización en Cirugía Plástica, Estética y
Reconstruativa**

A handwritten signature in black ink, appearing to be "N. Sastre Ortiz", written over a horizontal line.

DR. CARLOS DEL VECCHYO CALCANELO

**Jefe de Servicio de Cirugía Plástica
Hospital General de México**

A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. del Vecchyo Calcaneolo", written over a horizontal line.

DEDICATORIA

A la memoria de mi Madre.

A mi Padre y Hermanos, por que sin su apoyo y confianza no hubiera sido posible este logro.

A mis sobrinos, quienes son la razón de este esfuerzo.

A la Dra. Bertha Torres Gómez, quien es fuente de mi inspiración y ternura.

A mis Amigos: Dr. Amado Saúl Cano y Ronald Brian Barker, con quien he compartido mi crecimiento cotidiano.

Al Dr. Nicolás Sastre Ortiz, por ser un verdadero ejemplo a seguir.

A la Dra. Silvia Espinosa Maceda, por sus enseñanzas y consejos.

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros, quienes confiaron en lo que me podía llegar a convertir.

A todo el personal del Servicio de Cirugía Plástica, quienes hicieron factible este logro, y en especial a la Enfra. Guadalupe Castellanos Moreno.

Al Dr. Pedro Francisco Valencia Mayoral, quien confió y contribuyo ampliamente en esta tesis.

SERVICIOS PARTICIPANTES

- HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
 - o SERVICIO DE CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA
 - o SERVICIO DE CIRUGÍA EXPERIMENTAL
 - o SERVICIO DE PATOLOGÍA

- HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO, "FEDERICO GOMEZ"
 - o SERVICIO DE PATOLOGIA

INDICE

I.	RESUMEN	7
II.	STRUCTURING SUMMARY	8
III.	INTRODUCCION	9
IV.	ANTECEDENTE Y MARCO TEORICO	11
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	15
VI.	HIPÓTESIS	16
VII.	OBJETIVO	17
VIII.	DISEÑO Y DURACIÓN DEL ESTUDIO	18
IX.	MATERIAL Y MÉTODO	19
	a. FASE I	19
	b. FASE II	26
X.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
XI.	ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	29
XII.	RELEVANCIAS Y ESPECTATIVAS	30
XIII.	RESULTADOS	31
XIV.	ANALISIS ESTADISTICO	34
	a. FASE I	34
	i. Edema	34
	ii. Cariopignosis	35
	iii. Rbdomiolisis	36
	a. FASE II	38
	i. Mitocondria	38
	ii. Reticulo Endoplasmico Rugoso	39
	iii. Membrana Celular	40
	iv. Nucleo	41
	v. Lípidos intracelulares	42
XV.	DISCUSION	43
XVI.	CONCLUSIONES	46
XVII.	BIBLIOGRAFIA	47

I. RESUMEN

Las soluciones preservadoras de tejidos disminuyen las alteraciones de membrana celular, estabilizan las células, y previenen cambios irreversibles en tejidos sometidos a isquemia prolongada. Bajo la premisa de que las menos hipercálemicas como la solución de Custodiol ofrecen un nivel mayor de protección. Se realizó un estudio de tipo experimental con animales de laboratorio, prospectivo, comparativo, ciego, longitudinal y aleatorio, en dos fases. En la primera se comparó el daño celular estructural por isquemia prolongada en músculo estriado con microscopía óptica en 30 ratas divididas en 3 grupos: I control, II perfundido con solución Wisconsin, y grupo III con Custodiol. En la segunda fase, se compararon los cambios ultraestructurales a nivel mitocondrial, de retículo endoplásmico, y de membrana celular, con microscopía electrónica, y marcaje con caspasas para valorar apoptosis celular en 20 ratas divididas en dos grupos: I control y II perfundidas con Custodiol que en la primera fase demostró tener mayor protección celular a la isquemia. El análisis estadístico fue realizado con medidas de distribución por grupos y mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados obtenidos con un valor significativo de p menor a 0.05 demostraron que los grupos perfundidos con solución de Custodiol presentaron menos alteraciones estructurales y ultraestructurales que confirman una mayor protección celular a la isquemia prolongada en músculo estriado, por lo que concluimos que esta solución puede tener utilidad clínica en procedimientos microquirúrgicos con isquemia prolongada, para prevenir el daño celular irreversible.

II. STRUCTURING SUMMARY

The preserve solution of tissues diminish the alteration of membrane cellular, stabilise the cells and prevent irreversible changes in the tissues subject to prolong ischemic. Under the premise of less hiperkalemic solution, as an example, custodiol solution offer a high level of protection; we made an experimental study with laboratory animals, prospective, comparative, blind, longitudinal and random in two stageges. In the first stage we compared the structural cellular damage by long isquemic in the muscles with optic microscopy in thirty rats divided into three groups: I control, II protected with Wisconsin solution and III with Custodiol. In the second stage we compared the ultrastructural change at the mitochondrial level, rugos endoplasmic reticulo, and the cellular membrane, by the electronic microscopy and caspasas evaluation for seeing the level of cellular apoptosis in twenty rats divided into two groups: I control and II protected with custodiol solution. The statistical analysis was made by Kruskal-Wallis test.

The results that we have shows a $p < 0.05$ in the custodiol group which means less structural and ultrastructural alterations. These result confirm a high cellular protection at the long ischemic in the muscles. From this we concluded that this custodiol solution could be a good clinical option in the microsurgery procedure with long ischemic to prevent the irreversible cellular damage.

III. INTRODUCCION

Las transferencias microquirúrgicas y el reimplante de tejidos, tienen en común que someten a los tejidos a isquemia fría y /o caliente en ocasiones prolongada, con tiempos de reperfusión variables que someten particularmente al tejido muscular, a cambios de daño celular estructurales y ultra estructurales reversibles o muchas veces irreversibles, que afectan su función y sobrevida (1).

El tiempo límite para evitar cambios irreversibles por isquemia ha sido estudiado por varios autores como Spega (2), Concannon (3) y Farber (4), gracias a sus aportaciones sabemos que la piel y el tejido subcutáneo son relativamente resistentes a la anoxia y presentan cambios celulares aun reversibles a las 24 horas, mientras el músculo estriado es poco tolerante a la isquemia y puede presentar cambios irreversibles entre 90 y 240 minutos. La isquemia, con la consecuente disminución del ATP intracelular, afecta de un modo particular a la célula del músculo estriado debido a que esta condición provoca la formación de complejos actina-miosina irreversibles, que con el tiempo deja células musculares vivas, pero sin contractibilidad (5). Chavarría y Sastré demostraron que la isquemia prolongada por más de 3 horas favorece daño intracelular con cambios bioquímicos e histológicos característicos que se manifiestan con cambios estructurales de edema, cariopicnosis y rabdomiolisis (6).

Cuándo no es posible reducir el tiempo de isquemia en el periodo pre o transoperatorio como sucede en el caso de reimplantes o cuándo existe alguna complicación transoperatoria en una transferencia tisular microquirúrgica, con el fin de prevenir cambios celulares irreversibles se han utilizado soluciones de uso habitual como Ringer, y dextran.

La inmersión e irrigación de órganos de transplante con soluciones preservadoras de tejidos como las de Wisconsin (7, 8), Eurocollins, Stanford , Beyersdorf (9), y más recientemente el Custodiol o solución HTK (10) mejoran la prevención del daño celular y su sobrevida a las 24 horas. Su efecto sobre el endotelio vascular ha sido estudiado por varios autores como Cartier, Hollmann, Pelleerin, etc.; pero su efecto en la prevención de daño por isquemia prolongada sobre el músculo estriado fue estudiado por primera vez en forma experimental en nuestro servicio en el año 2001 mediante la perfusión de colgajos microquirúrgicos con solución de Wisconsin. La cual previene el daño celular, porque disminuye las alteraciones de membrana celular, y estabiliza las células de tejidos musculares sometidos a isquemia con una p significativa de 0.05, aunque no altera el grado de rabiomolisis ni el edema (11)

IV. ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO

En un estudio previo, realizado en el servicio de Cirugía Plástica del Hospital General de México, se demostró que por sus componentes la solución de Wisconsin previene el daño celular irreversible por isquemia prolongada en colgajos microquirúrgicos, tiene un pH a temperatura ambiente de 7.4 y contiene una gran concentración de agentes impermeantes, como el ácido lactobiónico 100 mmol/L y la rafinosa 30 mmol/L; contiene hidroxietilo 50 gm/L para suprimir el edema celular secundario a hipotermia, adenosina 5.0 mmo/L para estimular la regeneración de ATP, glutation 3.0 mmol/L para suprimir el daño por radicales libres de oxígeno durante la reperfusión, alopurinol 1.0 mmol/L para la supresión de xantinoxidasa, 30 mEq/L de sodio, y 5 mmol/L de magnesio, para mantener un ambiente externo fisiológico y fosfatos para su utilización como un amortiguador de pH. Sin embargo, tiene la desventaja de tener un alto contenido en potasio de 128 mEq/L que puede ser nocivo para el endotelio vascular. Por esta razón esta solución ha sido remplazada actualmente en la conservación de órganos de trasplante por otras soluciones menos hipercalémicas como la de histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) de Bretschneider o Custodiol, la cual contiene 9 mmol/L de cloruro de potasio, así como un pH de 7.2, con una osmolaridad de 310 mosmol/Kg., en 1000 ml de agua inyectable: 0.8766 g de cloruro de sodio (15mmol/L), 1842 g de bi-2-ketoglutarato potásico (1 mmol/L), 0.8132 g de cloruro de magnesio-6 H₂O (4 mmol/L), 3.7733g de histidina HCL-H₂O (18mmol/L), 27.9289 g de histidina (180mmol/L), 0.4085 g de triptofano (2mmol/L), 5.4651 g de

manitol (30mmol/L), 0.0022 g de cloruro de calcio (0.015 mmol/L), y Anion CL 50 mEq. (12,13,14,).

Esta solución se ha convertido en la primera elección para cardioplejia, así como para protección de órganos a transplantar como corazón, riñón, e hígado, y para la protección de trasplantes de injertos arteriales y venosos.

Aunque los cambios celulares estructurales con microscopía óptica son orientadores para predecir el daño por isquemia prolongada, un método de evaluación mas objetivo de los mismos es el análisis ultraestructural con microscopía electrónica (21,22), y la determinación de la apoptosis celular con diferentes tipos de caspasas activadas(27).

La apoptosis (muerte celular programada) consiste en una serie de cambios bioquímicos y morfológicos estereotipados, que llevan a la condensación de la cromatina y a la fagocitosis segura y remoción de los detritus celulares por células no inflamatorias. Señalizaciones activas de receptores muertos, como el CD95/Fas y monitores celulares de daño del DNA y funciones mitocondriales inducen la cascada de proteáceas específicas-cisteina aspartato (Caspasas), que son marcadores de apoptosis. Las caspasas, una familia de proteácea cistina ácida, son el centro regulador de la apoptosis. Los iniciadores de caspasas (incluyendo 8,9,10 y 12) están cerca de receptores de señales proapoptóticas.

Una vez activadas las caspasas actúan sobre el citoesqueleto y proteínas nucleares como PARP, alfa-Fodrin, DFF y laminina A, induciendo la apoptosis. Estímulos proapoptóticos, incluyen el FasL, TNF-alfa, daño al DNA y retículo endoplasmico rugoso. FAS y TNFR activan la caspasa 8 y 10. La relación del citocromo C mitocondrial activa la caspasa 9. El daño al DNA también activa la caspasa 9; el Retículo endoplásmico rugoso mediante el calcio activa la caspasa 12. La familia de proteínas inhibidoras de apoptosis incluye XIAP y Survivin, y sus funciones son inhibir las caspasas. Smac, es una proteína mitocondrial que es vertida en el citosol cuando la célula se encuentra es estrés compitiendo con las caspasas por los inhibidores de las mismas.(23,24,25,26).En los casos de actividad del ligando Fas, se produce una interacción del dominio de muerte que se torna en reclutamiento y actividad de la caspasa 8. La actividad de la apoptosis es mediada por receptores en la selección negativa de linfocitos T y en la apoptosis mediada por p53.

La señal de apoptosis también emana de la mitocondria cuando tiene un defecto funcional. Estos defectos son censados y señalizados por el balance de una familia de pro- y antiapoptosis Bcl-2/Bad. Un cambio en este balance de señales letales (Bad, Bax) resulta en citocromo C y en una relación de especies reactivas de oxígeno y activación de caspasas efectoras, como la caspasa-3, -6, y -7. La señalización de las caspasas es iniciada y propagada por una autocatálisis proteolítica y una fragmentación de las caspasas y sus sustratos. El balance preciso de señales de sobrevida y muerte pueden ser alterados por defectos que

causen un cambio inadecuado en cualquier dirección. Como en los desbalances que ocurren en neuropatologías en donde existe un exceso de muerte celular, y en los desordenes autoinmunes que son causados por deleción inefectiva de linfocitos, por otra parte todos los cánceres dependen en bloque de la apoptosis que permite a las células malignas sobrevivir debido a una transformación genética y morfológica. Existe una gran necesidad terapéutica de promover o inhibir la apoptosis en estas enfermedades. El descubrimiento de estas terapéuticas, se realizará una vez dilucidadas las señales apoptóticas dentro de las señales propias celulares, esto permitido por los anticuerpos, para detectar los caminos de la apoptosis y su activación proteolítica (27). Por lo anterior consideramos que la determinación de la apoptosis celular por medio de las caspasas activadas en el miocito sometidos a isquemia nos determina el valor real del daño celular así como la predicción del número de células isquémicas que ya desencadenaron este proceso a un nivel irreversible y que por otro método es casi imposible valorar este nivel de daño intracelular.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Hasta la fecha el único estudio reportado sobre la utilidad de soluciones preservadoras de tejidos para prevenir el daño irreversible por isquemia prolongada ha sido con la solución de Wisconsin; sin embargo, consideramos que por su menor contenido en potasio el Custodiol puede ofrecer mayor protección celular con menos efectos secundarios.

Esto nos llevó a diseñar este estudio en dos fases, en la primera fase se incluyeron tres grupos, un grupo control, uno con solución de Wisconsin y otro con solución de Custodiol, los cuales se analizaron bajo microscopía óptica, y una vez comprobada la protección significativa del custodiol sobre la solución de Wisconsin, se realizó la segunda fase, en la que se incluyeron dos grupos, uno control y otro con solución de Custodiol, para verificar los datos de lesión mitocondrial, del retículo endoplásmico rugoso, de la membrana, núcleo y la cantidad de lípidos y glucógeno, que traducen indirectamente el mecanismo anaeróbico desencadenado en la célula como respuesta a la isquemia. Todos estos datos fueron evaluados mediante microscopía electrónica, y se determinó el grado de apoptosis celular en el músculo sometido a la isquemia mediante mediciones de caspasas activadas.

VI. HIPÓTESIS

Si el custodiol es una solución hipocalémica preservadora de tejidos, entonces puede prevenir en mayor grado el daño celular de los miocitos sometidos a isquemia prolongada.

VII. OBJETIVO

Demostrar que la solución de Custodiol por su menor contenido en potasio, protege en un mayor porcentaje el daño celular por isquemia prolongada sobre el tejido muscular estriado en procedimientos microquirúrgicos.

VIII. DISEÑO Y DURACIÓN DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio de investigación de tipo experimental en dos fases con animales de laboratorio; para su estructuración se retomaron elementos de carácter prospectivo, comparativo, ciego, longitudinal y aleatorio.

El estudio se llevó a cabo de agosto a noviembre del 2002, en las instalaciones de microcirugía del Servicio de Cirugía Experimental y de Patología del Hospital General de México así como en el Servicio de Patología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” para el análisis ultraestructural con microscopía electrónica.

IX. MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se dividió en dos fases.

FASE I

En la primera fase se utilizaron 30 ratas hembras, homogénicas, microbiológicamente convencionales, de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 250 gramos cada una. Los animales se dividieron en forma aleatoria en 3 grupos: el grupo control (I n = 10), el grupo irrigado con solución Wisconsin (II n = 10), y el grupo irrigado con solución de Custodiol (III n = 10).

Grupo #1:

3,9,1,19,15,12,21,25,27,30

Grupo #2:

2, 5, 7, 20, 16,13,11,22,24,28

Grupo #3:

4,6,8,10, 17,18,14,23,26,29

Método. Con la supervisión de los médicos veterinarios, para poner bajo anestesia general con Rompum y Ketamina, a 2mg/100mg P.V. y xilazina a 20 mg/100mg P.V. a cada una de las ratas de los diferentes grupos. Se realizó bajo magnificación con un microscopio y equipo de microcirugía, la amputación de la extremidad posterior derecha. Se separaron meticulosamente todos los elementos de sostén a nivel de la articulación de la cadera, respetando únicamente la vena y la arteria femorales (fig.1).



Figura 1: Separación completa de la extremidad, conservando únicamente la arteria y vena femoral.

Una vez disecado el miembro posterior y los vasos mencionados, previa exanguinación mecánica, se provocó isquemia definitiva en la totalidad de la extremidad, mediante el pinzamiento de los vasos femorales por espacio de 120 minutos (fig.2).

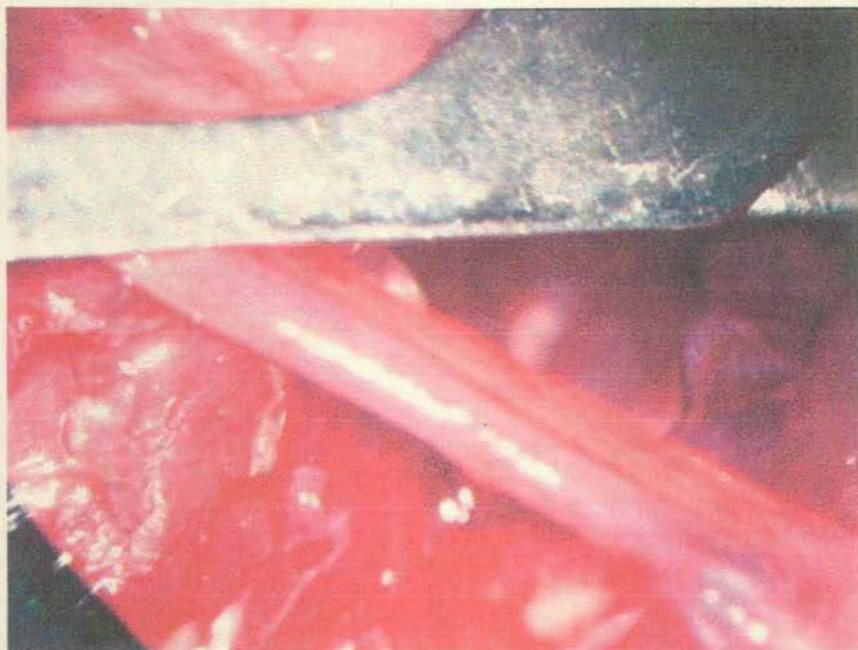


Figura 2: Pinzamiento de los vasos femorales por 120 minutos.

Inmediatamente después de pinzar, en el grupo II se canalizó la vena y la arteria femorales con agujas hipodérmicas del número 28, a través de las cuales se irrigó el miembro en dirección anterógrada con 10 ml de solución de Wisconsin a temperatura ambiente; al grupo III se le irrigó con 10 ml de solución de Custodiol a una temperatura entre 8° y 15° (fig. 3), y al grupo control (I) no se le perfundió ninguna solución.

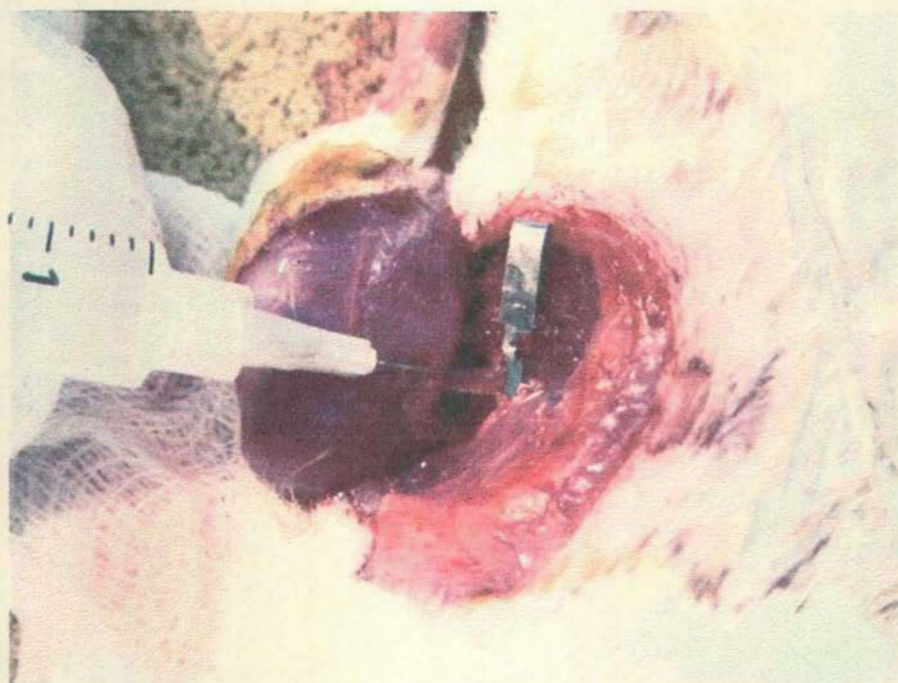


Figura 3: Irrigación del miembro, con 10 ml de la solución del tipo correspondiente al grupo en estudio.

En los casos en que persistió el orificio de canalización en cualquiera de los vasos, éste se reparo con puntos simples de nylon 10-0. Una vez que se cumplió el periodo de isquemia, se despinzaron los vasos femorales para permitir la re-perfusión de la extremidad, por un periodo de 90 minutos (fig.4).



Figura 4: Despinzamiento de los vasos femorales con reperfusión por 90 minutos.

Al completar la isquemia y re-perfusión conforme al protocolo, se tomaron de inmediato las muestras del músculo cuádriceps de la rata, de 3 mm cúbicos aproximadamente que se fijaron en una solución de formaldehído al 10% (fig.5).



Figura 5: Toma de biopsia de músculo esquelético del miembro en estudio.

Las muestras de músculo estriado fueron preparadas con tinciones de hematoxilina- eosina y Masón, estas fueron analizadas con un microscopio óptico. Posteriormente cada uno de los animales fue sacrificado mediante una sobredosis de anestésico. Un patólogo del Hospital General de México calificó en forma ciega cada uno de los cambios estructurales por daño celular considerando como variables de estudio : edema, cariopicnosis, y rbdomiolisis. El mismo observador calificó, conforme a su magnitud a cada variable como cambios ausentes (0%), leves (25%), moderados (50%) y severos (mas del 75%).

FASE II.

Se utilizaron 20 ratas hembras, homogénicas, microbiológicamente convencionales, de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 250 gramos cada una. Los animales se dividieron en forma aleatoria en 2 grupos: el grupo control (I n = 10), y el grupo irrigado con solución de Custodiol (II n = 10).

Grupo #1:

1,5,3,7,11,12,15,16,19,20

Grupo #2:

2,4,6,8,9,10,13,14,17,18

Modelo experimental. En esta fase se realizó el mismo modelo de isquemia que en la fase I. Al completar la isquemia y re-perfusión, se tomaron de inmediato las biopsias del músculo cuádriceps de la rata, de 1 mm cúbico colocándolo en un fijador universal para posteriormente realizar preparación de las muestras y lectura de las mismas con un microscopio electrónico de transmisión bajo la técnica habitual (24,25); así mismo se congeló un fragmento de tejido para realizar posteriormente determinaciones de caspasas y de esta manera medir el nivel de apoptosis desencadenado. Posteriormente cada uno de los animales fue sacrificado mediante una sobredosis de anestésico. Un patólogo de la Unidad de Patología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” que no tenía conocimiento del grupo al que pertenecía cada muestra verificó en un

microscopio electrónico de transmisión las variables de daño celular como son: alteraciones mitocondriales, de retículo endoplásmico rugoso, membrana celular, núcleo y el grado de consumo de lípidos y glucógeno intracelular; así mismo, se realizaron determinaciones de caspasas en cada uno de los tejidos congelados, para determinar el nivel de apoptosis desencadenado con la isquemia producida en el modelo experimental.

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Un investigador en Salud Pública analizó los resultados obtenidos mediante una prueba estadística de distribución de grupos y de varianza múltiple de Kruskal-Wallis, con el fin de poder comparar los grupos en cada fase del protocolo, dándole a la p un valor significativo de 0.05.

X. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

En el estudio se utilizaron animales de laboratorio, y sustancias que son de uso cotidiano en la práctica clínica, por lo que no representan peligros de bioseguridad. Del mismo modo, los sujetos de experimentación fueron sometidos a los procedimientos mediante anestesia general, con medicamentos de uso cotidiano, para evitarles sufrimiento. El trato a los animales se realizó de acuerdo con la ley de protección animal del DF publicada en 1988, así como con el reglamento interno de manejo de animales de experimentación, del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital General de México.

XI. RELEVANCIAS Y ESPECTATIVAS

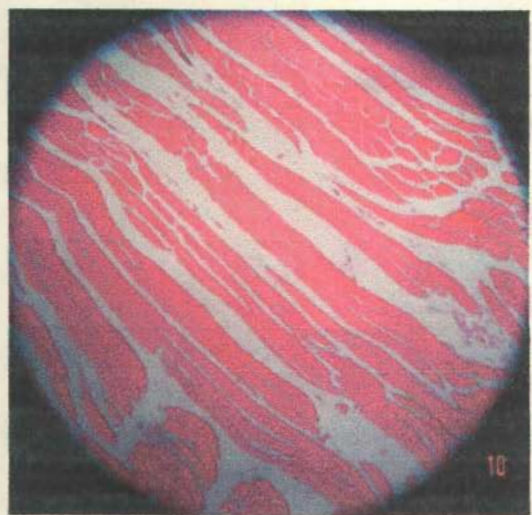
El presente trabajo constituye, una aportación al área de la cirugía de reconstrucción microquirúrgica, ya que son los primeros trabajos que estudian el uso exitoso de soluciones preservadoras de tejidos para prevenir el daño muscular por isquemia prolongada o con múltiples periodos de isquemia, que son situaciones que hoy en día, a pesar de los avances tecnológicos, son de frecuente presentación y favorecen complicaciones postoperatorias que incluso pueden culminar en la pérdida de los colgajos. Este estudio pretende aportar una evidencia fidedigna del daño celular a nivel del grado de apoptosis desencadenado por la isquemia y el grado de protección del mismo con el uso de la solución de custodiol como solución protectora a la isquemia. No existen estudios que valoren el daño a un nivel tan específico como lo es el análisis del nivel de caspasas activadas, ya que a un nivel de activación, estos cambios pueden ser reversibles con la reperfusión tisular y no pueden ser valorados por ningún otro método conocido hasta el momento.

XIII. RESULTADOS

FASE I (fig.6 y 7)			
RATA	EDEMA	CARIOPICNOSIS	RABDOMIOLISIS
GRUPO CONTROL			
1	MODERADO	MODERADO	MODERADO
3	LEVE	MODERADO	LEVE
9	MODERADO	MODERADO	LEVE
12	MODERADO	LEVE	MODERADO
15	MODERADO	MODERADO	MODERADO
19	MODERADO	LEVE	MODERADO
21	MODERADO	MODERADO	LEVE
25	MODERADO	LEVE	LEVE
27	MODERADO	MODERADO	MODERADO
30	MODERADO	MODERADO	MODERADO
RATA	GRUPO CON SOLUCION WISCONSIN		
2	MODERADO	MODERADO	MODERADO
5	LEVE	LEVE	MODERADO
7	MODERADO	MODERADO	MODERADO
11	MODERADO	LEVE	LEVE
13	MODERADO	LEVE	LEVE
16	MODERADO	LEVE	LEVE
20	LEVE	LEVE	MODERADO
22	LEVE	LEVE	LEVE
24	LEVE	MODERADO	MODERADO
28	MODERADO	MODERADO	MODERADO
RATA	GRUPO CON SOLUCION CUSTODIOL		
4	LEVE	LEVE	LEVE
6	LEVE	MODERADO	LEVE
8	MODERADO	LEVE	MODERADO
10	LEVE	MODERADO	LEVE
14	MODERADO	LEVE	LEVE
17	MODERADO	LEVE	LEVE
18	LEVE	LEVE	LEVE
23	MODERADO	LEVE	LEVE
26	LEVE	LEVE	LEVE
29	MODERADO	LEVE	MODERADO



Figuras 6: RATA 12



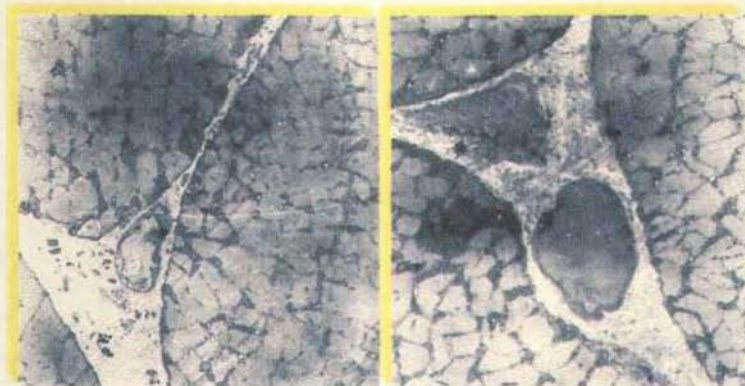
Figuras 7: RATA 10

FASE II (Fig.8 y 9)							
RATA	MITOCONDRIA		RER	MEMBRANA		NUCLEO	LIPIDOS
	EDEMA	CRESTAS	DILATADO	DISCONTINUA	VESICULADA		
		Grupo Custodiol					
2	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	AUSENTES
4	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NO VALORABLE	AUSENTES
6	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	ESCASOS
8	PRESENTE	DISMINUIDAS	PRESENTE	NORMAL	PRESENTE	NORMAL	ESCASOS
9	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	NO VALORABLE	NO VALORABLE	NORMAL	AUSENTES
10	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	NORMAL	NORMAL	NORMAL	AUSENTES
13	PRESENTE	DISMINUIDAS	PRESENTE	NO VALORABLE	NO VALORABLE	NO VALORABLE	AUSENTES
14	AUSENTE	NORMALES	PRESENTE	NORMAL	NORMAL	NO VALORABLE	LEVE
17	PRESENTE	DISMINUIDAS	PRESENTE	NO VALORABLE	NO VALORABLE	NORMAL	LEVE
18	PRESENTE	DISMINUIDAS	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	NO VALORABLE	AUSENTES
RATA		Grupo Control					
1	PRESENTE	DISMINUIDAS	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	NORMAL	AUSENTES
3	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	PRESENTE	PRESENTE	NO VALORABLE	AUSENTES
6	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	PRESENTE	PRESENTE	NORMAL	AUSENTES
7	PRESENTE	DISMINUIDAS	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	NORMAL	AUSENTES
11	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	PRESENTE	PRESENTE	NORMAL	AUSENTES
12	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	PRESENTE	PRESENTE	NO VALORABLE	AUSENTES
15	PRESENTE	DISMINUIDAS	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	NORMAL	AUSENTES
16	PRESENTE	DISMINUIDAS	PRESENTE	PRESENTE	PRESENTE	NORMAL	AUSENTES
19	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	PRESENTE	PRESENTE	NO VALORABLE	AUSENTES
20	PRESENTE	DISMINUIDAS	NORMAL	PRESENTE	PRESENTE	NORMAL	AUSENTES

Figuras 8 y 9

RATA 6

RATA 12



XII. ANALISIS ESTADISTICO

FASE 1

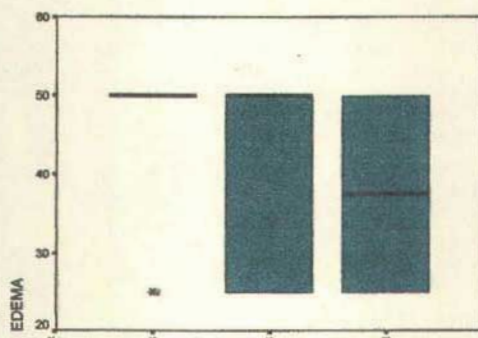
En el análisis estadístico se observó una clara diferencia entre la distribución del grupo control con los grupos de estudio con soluciones preservadores.

El grupo de custodiol tiene una media diferente, por lo que se realizó una prueba de diferencia de medias de Kruskal-Wallis con los siguientes resultados:

Edema.

El grupo que presentó menor edema fue el de custodiol y de acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis con una significancia de $p < 0.05$; se rechaza la hipótesis nula de que los grupos producen el mismo efecto, por lo tanto se confirma la hipótesis de que la irrigación con custodiol disminuye la presentación de edema intercelular. (Grafica 1)

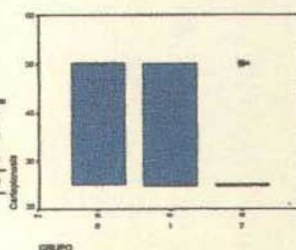
	NIVEL DE EDEMA		Total	GRUPO	Numero de observaciones	de Media del grupo
	25	50				
Control	1	9	10	Control	10	19
Wisconsin	4	6	10	Wisconsin	10	14.5
Custodiol	5	5	10	Custodiol	10	13
Total	10	20	30	Total	30	



Cariopincosis

Se puede observar en la siguiente tabla que tanto Wisconsin como Custodiol muestran menor cariopincosis que el grupo control, de hecho la mayor parte de las muestras irrigadas con soluciones preservadoras tienen su mediana en nivel leve y el grupo control en un nivel moderado (Grafica 1). Si se observa detalladamente las barras se puede ver que solamente se presenta un caso atípico en el grupo de custodiol, por lo que no se toma en consideración dicho resultado.

	Nivel de cariopincosis		Total
	25%	50%	
Control	3	7	10
Wisconsin	6	4	10
Custodiol	8	2	10
Total	17	13	30



Analizando la diferencia de medianas se encontró que los grupos son diferentes. Los valores de las medias por grupos se proporcionan en la siguiente tabla, en la cual se puede observar que la media disminuye del grupo control a Wisconsin y de Wisconsin a Custodiol. Se puede concluir que es efectivo utilizar soluciones preservadoras para prevenir cariopincosis y que de estas la mas efectiva es el Custodiol.

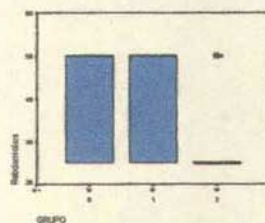
GRUPO	Numero de observaciones	de Media del grupo
Control	10	19.5
Wisconsin	10	15
Custodiol	10	12
Total	30	

Rabdomiolisis

Con el analisis descriptivo se encontró que el grupo control y el de Wisconsin tienen la misma distribución, pero el grupo de Custodiol sí presentó diferencias (Grafica 2).

Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis con un valor de $p < 0.05$ existe una diferencia significativa del grupo HTK Vs el control y Wisconsin (Grafica 1). En la siguientes barras se observan las medias por grupo:

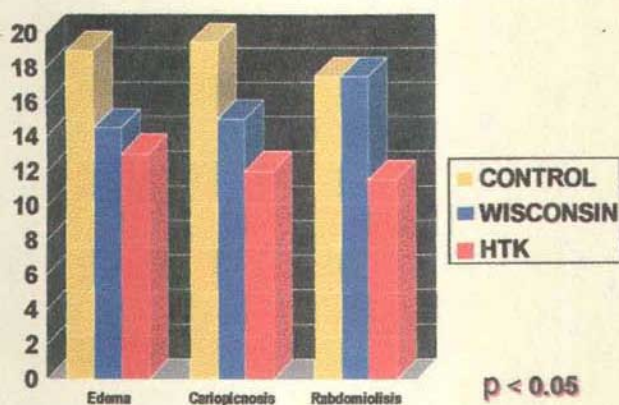
	Nivel de Rabdomiolisis		Total
	25%	50%	
Control	4	6	10
Wisconsin	4	6	10
Custodiol	8	2	10
Total	16	14	30



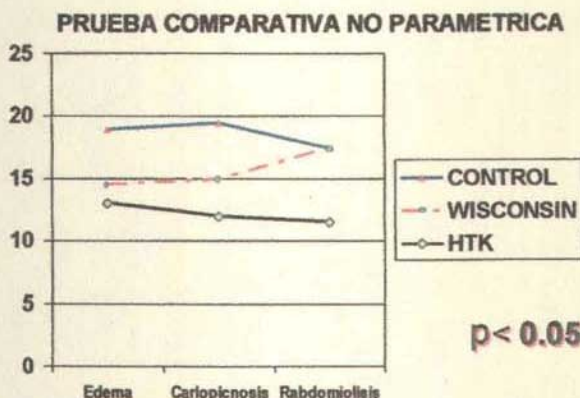
Al comparar el grupo control con Wisconsin con el mismo nivel de significancia de p no se encontraron diferencias de medias pero el grupo de custodiol mostró que produce menor rabdomiolisis.

GRUPO	No. de observaciones	Media del grupo
Control	10	17.5
Wisconsin	10	17.5
Custodiol	10	11.5
Total	30	

-PRUEBA DE VARIANZA MULTIPLE "KRUSKAL-WALLIS"



GRAFICA 1: El grupo control presentó mas edema, así como cariopcnosis con $p < 0.05$ significativa en relación a los grupo irrigados con soluciones preservadoras.



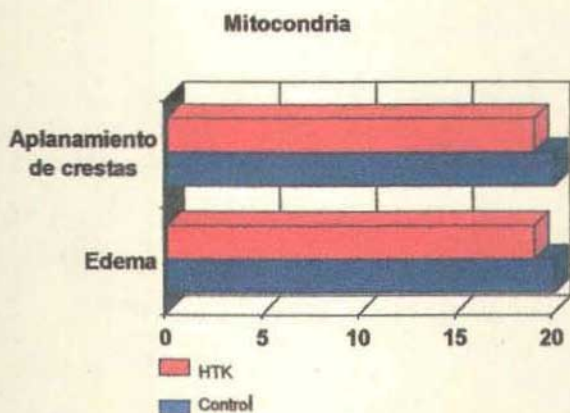
GRAFICA 2: Se observó una disminución de la media del grupo control a wisconsin y de wisconsin a HTK en edema y cariopcnosis; en cuanto a la rabdomiolisis, la solución de HTK mostró con diferencia significativa ser la única que ofrece protección.

FASE II

Se realizaron pruebas de T con las variables recodificadas para observar la forma en la que se pueden relacionar las medias con la obtención de los siguientes resultados.

Mitocondria

En el caso de edema se cuenta con un solo caso, dentro de un total de veinte, que presenta edema ausente (éste se encontró en el grupo de custodiol). Ahora bien, tomando en cuenta a las crestas se muestra exactamente el mismo resultado: un solo caso presenta cresta normal mientras los 19 restantes la presentan disminuida, éste caso es el mismo que fue tratado con custodiol y presentó edema ausente. con una p menor a 0.05 no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos en cuanto aplanamiento de las crestas y edema mitocondrial (grafica 3).



Grafica 3: No encontrando diferencia significativa en este organelo

Reticulo Endoplasmico Rugoso (RER)

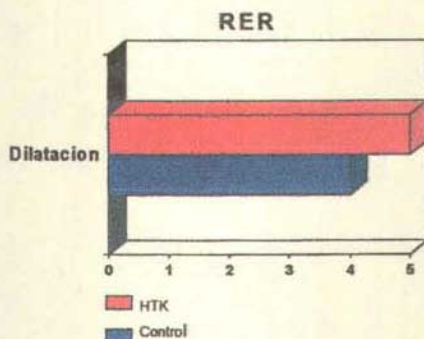
En una tabla comparativa se observó la diferencia entre la dilatación y la normalidad del RER y se encontro una diferencia entre el grupo de custodiol y el grupo control, los resultados se muestran en la siguiente tabla

	Normal	Presente
Control	6	4
Custodiol	5	5
	11	9

Realizando una prueba de comparación de medias se concluye que hay diferencia significativa entre las medias de los grupos. Se recodificó tomando como normal al valor 0 y como presente al valor 1 y las medias, que fueron diferentes significativamente, fueron las siguientes:

GRUPO	Media
Control	0.4
Custodiol	0.5

El resultado del analisis mediante Kruskal Wallis se muestra en la grafica 4



Grafica 4: No se observó diferencia significativa

Membrana Celular

1. Discontinua

En el caso de membrana discontinua se tuvo un total de tres observaciones no valorables y el resto de ellas presentan una diferencia entre los grupo, en el grupo control se encontró en la mayoría de los casos discontinuidad en la membrana celular y en grupo de custodiol en la mayoría de los casos estuvo preservada. Por lo que se concluye con el mismo nivel de significancia de p que existen diferecias significativas. Se realizó una codificación análoga a la anterior (normal 0 y presente 1) y las medias fueron las siguientes.

	Normal	Presente	Total
Control		10	10
Custodiol	6	1	7
	6	11	17

GRUPO	Observaciones	Media
Control	10	1
Custodiol	7	0.1429

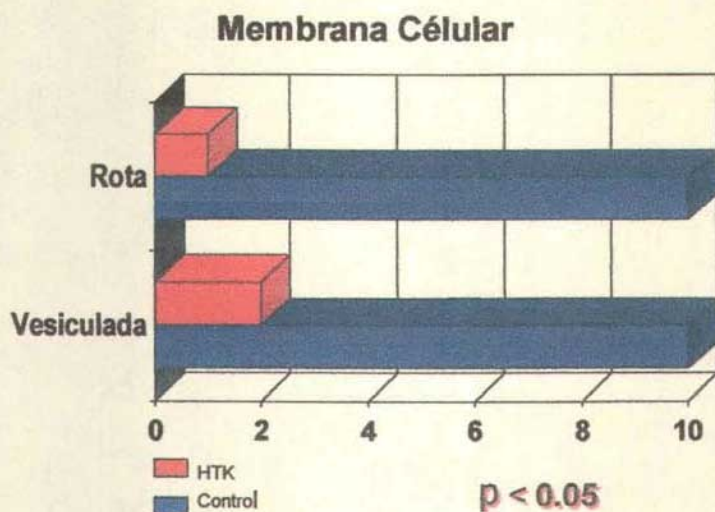
2. Membrana vesiculada

De igual manera a lo que pasó en el caso anterior hay tres observaciones no valorables en el grupo de custodiol y se observo una clara diferencia con el grupo control. En el primero todos las muestras presentaron membrana vesiculada y en el segundo grupo el mayor porcentaje presento una membrana normal.

	Normal	Presente	TOTAL
Control		10	10
Custodiol	5	2	7
	5	12	17

Se realizó una prueba de T para comparar las medias y se encontró que sí hay una diferencia significativa, entre los grupos con una p menor de 0.05 (Grafica 5), con los valores que se observan en la siguiente tabla.

GRUPO	Individuos	Media
Control	10	1
Custodiol	7	0.2857



Grafica 5: El grupo control presentó discontinuidad de la membrana de manera significativa, sobre el grupo irrigado con HTK. Esta observación también se produjo, en el análisis de la presencia de vesículas en la membrana

Núcleo celular

En el núcleo se tuvieron un total de 14 muestras valorable, 7 de cada grupo y 6 no valorables, y se encontraron todas normales, por lo que no se realizó ninguna otra prueba.

Lípidos intracelulares

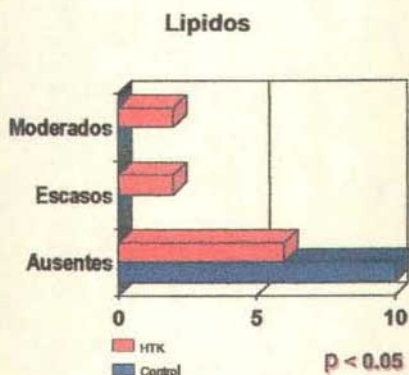
En la siguiente tabla se muestra la distribución que tuvieron los lípidos intracelulares en los dos grupos. En el caso del grupo control todos las muestras presentaron ausencia de lípidos y en el grupo de Custodiol el 40% de las muestras se encontraron presentes.

Grupo	Ausente	Escasos	Leve	Total
Control	10			10
Custodiol	6	2	2	10
Total	16	2	2	20

Se recodificaron los datos de la siguiente manera

0=Ausentes 1=Escasos 2=Leve

Con esta codificación se llevó a cabo la prueba de diferencia de medias, con varianzas constantes y un valor de p menor a 0.05 (Grafica 6). Se rechaza la hipótesis nula de que las medias son iguales, se puede considerar que hay una diferencia significativa en el contenido de lípidos entre los grupos.



Grafica 6: Se rechazamos la hipótesis nula de que las medias son iguales, y, en cambio consideramos que hay una diferencia significativa en el contenido de lípidos

XV. DISCUSION

El éxito clínico de los tejidos sometidos a isquemia depende básicamente de la respuesta del endotelio vascular y de su resistencia al daño por radicales libres de oxígeno así como de la reversibilidad de los cambios estructurales y ultraestructurales de los mismos. Uno de los efectos más temidos, por su alta morbilidad en procedimientos que se realizan bajo isquemia, es el "fenómeno de no reflujo" (20); que se relaciona a una respuesta celular inflamatoria acrecentada en el endotelio vascular con la subsecuente agregación plaquetaria intravascular, la formación de trombos, la fuga de líquido al espacio intersticial y los cambios del pH celular, que en menos de 12 horas pueden hacer que la pérdida de los tejidos afectados sea irreversible (18). Se ha reportado que este fenómeno puede ocurrir en el 30% de los tejidos musculares, independientemente del tiempo de isquemia al que fueron sometidos. Lo anterior ha propiciado el estudio de sustancias como trombolíticos, antiinflamatorios no esteroideos, y el uso de técnicas como las de enfriamiento, para tratar de mejorar la tolerancia a la isquemia de todos los tejidos (19).

En nuestro servicio considerando la relevancia de lo mencionado anteriormente, se ha seguido una línea de investigación que utilizó por primera vez sustancias preservadoras de tejidos para prevenir los cambios por isquemia prolongada en colgajos microquirurgicos. En un estudio previo se demostró científicamente que la solución de Wisconsin es efectiva para prevenir las alteraciones de membrana, disminuye la

aparición de rhabdmiolisis y cariopcnosis en el daño por isquemia aunque no reduce el edema intercelular. No obstante algunos autores cuestionan el uso de esta solución por el riesgo de producir daño endotelial por su alto contenido en potasio(14). Esto nos llevó a la búsqueda de una solución preservadora menos hipercalémica, y con mejores efectos.

La solución HTK o Custodiol fue seleccionada por ser la que tiene la mayor aceptación clínica en procedimientos de transplantes y cuyos componentes aseguran un nivel bajo de potasio que evitan el daño endotelial, pero permiten la inactivación transitoria de las funciones celulares, para prevenir su daño y sus componentes aminoácidos la convierten en un excelente buffer que permite una mayor tolerancia a la isquemia al agregarle triptofano, lo que aumenta su efecto en la protección de membrana y el alfa-fetoglutarato sirve como un sustrato para la producción aeróbica de energía. Como contiene manitol, se encuentra balanceada su presión osmótica y es capaz de disminuir el edema celular e inhibir los radicales libres y los derivados de oxígeno como el superóxido. Como se perfunde a una temperatura de entre 8° y 15°C, tiene la ventaja adicional de producir un efecto hipotérmico que contribuye a disminuir el gasto metabólico celular y la acidosis intracelular. No se le han encontrado efectos tóxicos y en comparación con otras soluciones preservadoras de tejidos para transplante ofrece un mayor efecto protector (15,16,17).

Con base en la presente investigación los resultados son concluyentes en la primera fase, en cuanto a que la solución de Custodiol comparada con la solución de Wisconsin muestra una diferencia significativa (p menor

0.05) en la presencia de edema intracelular, cariopícnosis y rhabdomiólisis, las cuales se observaron en menor porcentaje en el grupo de Custodiol, lo cual traduce que esta solución preservadora es más efectiva para prevenir los daños celulares estructurales en el músculo estriado bajo isquemia prolongada. En la segunda fase al comparar el grupo de Custodiol con un control y analizar los cambios ultraestructurales bajo microscopio electrónico a nivel mitocondrial de retículo endoplásmico rugoso, de membrana celular, alteración del núcleo celular y contenido lipídico, se encontró con un nivel de significancia de p menor a 0.05, que demuestra que el Custodiol no previene los cambios mitocondriales a nivel de núcleo celular en forma significativa, pero sí previene los cambios sobre el retículo endoplásmico rugoso y preserva la membrana celular. El mayor contenido lipídico en el grupo de Custodiol, traduce un menor estrés celular, a diferencia del grupo control que llegó a un nivel anaeróbico consumiendo toda su reserva lipídica.

XVI. CONCLUSIONES

La perfusión transoperatoria con solución de Custodiol en colgajos microquirúrgicos sometidos a isquemia prolongada, es la más efectiva, por que disminuye en mayor grado los daños estructurales y ultraestructurales.

Por lo anterior concluimos que la solución de custodiol hace menos severos los cambios por daño celular secundarios a isquemia prolongada, y previene los cambios irreversibles a nivel ultraestructural.

La aportación en el área de cirugía microquirúrgica consiste en proponer el uso del Custodiol como una medida de salvamento en caso de procedimientos en los que sea imposible reducir el tiempo de isquemia, situaciones que hoy en día, a pesar de los avances tecnológicos continúan presentando una alta incidencia.

XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Norden, M, Rao V. *Improved preservation of rat hindlimbs with the University of Winsconsin solution and butanedione monoxime*. *Plas Reconstr Surg* 1998; 100: 957-965.
- 2 Sapega A, Heppenstall B, *Oplimizing tourniquet applicafion and release times in extremity surgery*. *J Bone Joint Surg* 1985; 67-A:987-996.
- 3 Concannon M, Garrison K. *Patterns of free-radical production after tourniquet ischemia. Implicationsfor the hand surgeon*. *Plas Reconstr Surg*, 1992; 89 :546556.
- 4 Farber J, Chien K. *The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia*. *Am J Pathol* 1981;102 :481-497.
- 5 Ekcer P, Schnackertz K, *Ischemic tolerance of human skeletal muscle*. *Ann Plast Surg* 1991; 26: 71-80.
- 6 Chavarría G, Sastré N. *Daño muscular por isquemia y reperfusion repeddas. Problemática del análisis histopatológico*. *Cirugía Plástica*. 1995 5:3:92-95.
- 7 Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Sauthard IH, Belzar FO. *Seventy two hour preservation of the caninepancreas transplantation*. 1987;43:5-8.
- 8 D'alessandro F, Hoffman A, *Current status of organ preservation with University of Winsconsin solution*. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115: 89-97.

- 9 Beyersdorf F, Unger A, *Studies of reperfusion injury in skeletal muscle: preserved cellular viability after extended periods of warm ischemia.* J Cardiovasc Surg 1991; 32: 664-676.
- 10 Doetsch, N. HTK solution and L-tryptophan. Questions and answers. Eurotransplant. Newsletter 76:22-24. 1990
- 11 Torres GB, Rodríguez M, Sastre N. *Perfusion de colgajos musculares microquirurgicos con solución de Wzsconsin para prevenir el daño celular en casos de isquemia prolongada.* Publicación en trámite en el Plastic Surgery. 2002
- 12 Bretschneider, H.J. Organübergreifende Prinzipien zur Verlängerung der Ischämietoleranz Leopoldina (R.3) 1992; 37:161-174.
- 13 Bretschneider H.J. et al. Cardioplegia. Principles and Problems. Physiol. And Pathophysiology of the Heart. M Nijhoff Public. 1984. Boston pp 505-616.
- 14 Bretschneider H. J. Myocardial Protection. Thorac cardiovasc Surg. 1980 28:295-302
- 15 Gebhard, M.,M et al Bretschneider's Histidine Buffered Cardioplegic Solution, Concept Application and Efficiency. In: Myocardial Protection in Cardiac Surgery. Ed. A.J. Roberts, Marcel Dekker Inc, New York- Basel (1 987), p. 95-119.
- 16 Preusse, C.J. Cardioplegia with an intracellular formulation. In: Ischemia/Reperfusion in cardiac Surgery. Piper H. M and Preusse C.J. eds Kluwer Acad. Publishers 1993-107-134.
- 17 Gu K et al. HTK Solution is more effective than UW Solution for Cardiac preservation. Transpl. Proceedings 1996;28. 1906-1907.

- 18 Drinkwater D.C., Rudis E. Laks H, Ziv E, Marino J. *University of Wisconsin Solution versus Stanford Cardioplegic Solution and the Development of Cardiac Allograft Vasculopathy*. The J of Heart and Lung Transplantation. 1995;14;5
- 19 Shapiro R, Cerra F, *A new model for replantation and transplantation of a complex organ: the rat hindlimb*. J Surg Res 1978; 24: 271-287
- 20 Ames A 111, et al: *Cerebral ischemia: II The no-reflow phenomenon*. Am J Pathol 1968;52:437.
- 21 Slayter, E.M. and M.S.slayter 1992. Light and electron microscopy. Cambridge, Inglan. Cambridge University Press.
- 22 Phillips J, Poucell S, Paterson J, and Valencia P. The Liver an atlas and text of ultrastructural pathology. Ralen Press, New York, 1987.
- 23 Budihardjo, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 1999 15:269-90
- 24 Deveraux, Q.L. et al, IAPs Block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. EMBO. J.1998 17(8), 2215-23
- 25 Li F. et al Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. Nature 1998 396 (6711):580-4
- 26 Du, C. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 2000, 102 (1):33-42
- 27 Rotonda, J et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32 a key mediator of apoptosis. Nat Struct Biol 3(7): 619-625