



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

TÍTULO

INCREMENTO DE LA DENSIDAD VASCULAR CAUSADO POR EL EFECTO
ADITIVO PRODUCTO DE LA CONJUNCIÓN DE LOS METODOS DE
REVASCULARIZACION MIOCARDICA INDIRECTA EN CORAZONES
NORMALES DE RATAS.

**TESIS QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS**

PRESENTA

DR. CARLOS RIERA KINKEL

TUTOR(ES):

**DR. RUBÉN ARGÜERO SÁNCHEZ
FACULTAD DE MEDICINA UNAM
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO**

MÉXICO D.F. ENERO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE		Página
	RESUMEN EN ESPAÑOL	3
	RESUMEN EN INGLÉS	4
I.	ANTECEDENTES.....	5
II.	JUSTIFICACION	14
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
IV.	OBJETIVOS	15
V.	HIPÓTESIS	15
VI.	DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES	16
VII.	DISEÑO EXPERIMENTAL EXPLICATIVO	16
VIII.	TAMAÑO DE MUESTRA	16
IX.	MATERIAL Y METODOS.....	16
	a) CRITERIOS DE SELECCIÓN	16
	b) DESCRIPCION OPERATIVA	17
X	PATOLOGIA	21
XI.	ANALISIS ESTADISTICO	22
XII.	CONSIDERACIONES ETICAS	22
XIII.	RECURSOS	22
XIV.	RESULTADOS	23
XV.	DISCUSIÓN	37
XVI.	BIBLIOGRAFIA.....	44
XVII.	ANEXOS	56

(RESUMEN)

Introducción. Existen en la literatura una multitud de estudios que analizan el uso de métodos de revascularización miocárdica indirecta, tal es el caso de la revascularización con láser, que sin duda sustentan un beneficio clínico, a pesar de su alto costo, por lo que la búsqueda de métodos alternativos asociados a la revascularización miocárdica directa (RVMD) , podría incrementar no solo el flujo coronario efectivo sino además aumentar el área vascular total por medio de la revascularización miocárdica indirecta (RVMI), y lograr con ello una revascularización miocárdica integral (RVMIInt). Dichos artículos estudian el efecto angiogénico pero en asociación con isquemia, variable que no se puede controlar adecuadamente, pues esta tiene también un efecto inflamatorio que participa de la neo-angiogenesis.

Material y métodos. Mediante un diseño factorial de 4x3 en 11 grupos, de 5 ratas (SD) sacrificadas 45 días después del procedimiento, con una evaluación de 10 observaciones por cada variable y por cada rata.

En el primer nivel factorial se integran las maniobras de revascularización miocárdica indirecta (Punción miocárdica, epicardiotomía, juntas y por separado), en el segundo nivel factorial se asocian las combinaciones del primer nivel con un sello de fibrina, y en el tercer nivel factorial los grupos control. La magnitud del efecto neo-angiogenico fue evaluada mediante la medición categórica de la expresión inmunohistoquímica de VEGF, FGF, flk-1 y la medición del área vascular por medio de morfometría computarizada (células cebadas). La magnitud de la interacción fue evaluada tanto por inmuno-expresión de VEGF, FGF, flk-1 así como de la medición del área vascular ambas medidas de manera objetiva por morfometría computarizada.

Resultados. Los resultados demostraron el incremento de la expresión inmunohistoquímica y del área vascular en proporción directa con la interacción, encontrando la suficiente evidencia estadística (ANOVA $p < 0.0001$), como para afirmar que existe tanto diferencias entre los grupos, como que la interacción de todas las maniobras se logra el efecto máximo, pero se logra la mejor interacción por medio de la unión de AES (acupuntura, Epicardiotomía y sello de fibrina).

Conclusiones. 1. **Área vascular:** el efecto máximo se obtiene de la interacción de epicardectomia+punción mecánica+sello de fibrina, sin diferencias significativas con la maniobra completa (+ omento u epiplón), por lo que el uso de epiplón no es un factor importante en el modelo de corazón normal; 2. El **factor vascular de crecimiento derivado del endotelio** tiene significancia máxima a pesar de que la evaluación fue a los 45 días de epicardectomia +punción mecánica +sello de fibrina+ epiplón; 2': VEGF es un factor que a pesar de que es un factor que solo se expresa en las primeras fases (por que en este estudio podríamos eliminarla). El **Factor de crecimiento de fibroblastos solo mostró diferencias** con A y C por lo que sería igual realizar epicardectomia+punción mecánica+sello de fibrina que epicardectomia+punción mecánica+epiplón+sello de fibrina, datos que coinciden con los resultados en el área vascular; 4. El **flk-1** hay diferencias con todos los grupos, pero sin diferencias con la presencia de epiplón, lo que sustenta que el epiplón no es un factor significativo en el modelo de corazón normal. Se demuestra que la revascularización miocárdica indirecta tiene un peso específico dentro de la revascularización miocárdica, lo cual podría sustentar la

reincorporación de dichos procedimientos a la revascularización miocárdica directa, pues esta no solo incrementa el flujo coronario efectivo, sino que aumenta el área vascular total aún en corazones normales, y generar con ello este concepto de revascularización miocárdica integral.

Palabras clave. Revascularización miocárdica indirecta; epicardiotomía; punciones mecánicas; sello de fibrina; injerto de epiplón; factor vascular de crecimiento derivado del endotelio; Factor de crecimiento de fibroblastos; Flk-1.

(SUMMARY)

Introduction. The interaction of methods of myocardial revascularization can both increase the effect neo-angiogenic, determined by the physiological effect before the opening of collateral vessels, both the vasogenic effect and whose end result is the increase in the functional vascular area. Experimental studies on rat hearts without ischemia give sufficient information on the interaction of methods such as myocardial revascularization: epicardiectomy, mechanical punctures, grafting of omentum and seal of fibrin.

Material and methods. Using a design factorial of 4x3 in 11 groups, five rats each, ten samples by rat, demonstrates the interaction in the factorial first level, evaluated to 45 days of postoperative period, with the following surgical combinations: epicardiectomy, mechanical punctures, epicardiectomy+mechanical punctures, epicardiectomy+mechanical punctures+grafting of omentum; While the factorial second level consists of the same surgical combinations but in the presence of a seal of fibrin; the third factorial level are the controls for each level and the control-control. The magnitude of interaction was assessed both by immuno-expression of VEGF, FGF, flk-1 and factor VIII, as well as the measurement of the vascular area, both measured objectively by computerized Morphometry.

Results. Results showed increased immunohistochemical expression and vascular area in direct proportion with the interaction, finding sufficient statistical evidence (ANOVA $p < 0.0001$), as to say that there is much difference between the groups, as to the interaction of all the manoeuvres is achieved the maximum effect.

Conclusions. 1. **Vascular area:** the maximum effect of angiogenesis is epicardectomy+punción mecánica+sello of fibrin without significant differences with the full move (+ omentum or omentum). The use of omentum is not an important factor in the model of normal heart; 2. The **vascular endothelium-derived growth factor** has maximum significance while the evaluation was to the 45 days of epicardectomy+punción mecánica+ seal of fibrin +epiplón; 3 Single **Fibroblast Growth Factor** showed differences with A and C it would be like making epicardectomy+mechanical punctures+fibrin seal to epicardectomy+mechanical punctures + grafting of omentum +fibrin seal, data matching results in the vascular area; 4. The flk-1 there are differences with all groups, but no difference with presence of omentum, which sustains the omentum is not a significant factor in the normal heart model. Demonstrates that the indirect myocardial revascularization have a specific weight within the integral myocardial revascularization with a real impact on the cost-benefit and cost-effectiveness.

Key words. Indirect myocardial revascularization; epicardiectomy; mechanical punctures; seal of fibrin; graft of omentum; vascular factor of growth resulting from endothelium; Fibroblast growth factor; FLK-1.

I. ANTECEDENTES

Las enfermedades cardiovasculares son en la actualidad la primer causa de muerte.¹ Los eventos nosológicos que de ella se originan, tales como la **cardiopatía isquémica** han sufrido notables cambios en las últimas décadas, derivados de las modificaciones tanto de los hábitos higiénico-dietéticos, como del entorno bio-psico-social de las comunidades, especialmente en aquellas que están en vías desarrollo como México.

En los Estados Unidos de Norteamérica en 1983 se reportaron 180,000 nuevos casos de cardiopatía isquémica, y 10 años más tarde se reportaron 300,000 casos, lo cual demuestra un crecimiento importante de la incidencia y en consecuencia de la demanda de tratamiento, los cuales generan un costo promedio anual de 50 billones de dólares.²

La tasa de mortalidad por cardiopatía isquémica en México (1999) fue del 1/44.9 pacientes, en donde se reportaron 44,070 nuevos casos, de los cuales 11,418 pacientes se encontraban en edad productiva.³ El registro más grande realizado en los Estados Unidos de Norteamérica reporta que de 1984 a 1990 se integró el diagnóstico de cardiopatía isquémica a 894,223 pacientes, de los cuales 684,286 (77%) requirieron tratamiento quirúrgico. Tal circunstancia ha repercutido en el incremento de la frecuencia del número de métodos de revascularización, de los cuales conocemos dos tipos: **Revascularización miocárdica directa (RVMD)** y **Revascularización miocárdica indirecta (RVMI)**;¹ este último ha sido desplazado por la revascularización miocárdica directa (revascularización miocárdica con puentes aorto-coronarios y cardiología intervencionista), debido al éxito terapéutico que ha mostrado; sin embargo a principios de la década de los ochentas se replantearon las técnicas de revascularización miocárdica indirecta, con el objetivo de solucionar la angina rebelde a tratamiento médico, en el 24% de los pacientes sin la opción de tratamiento quirúrgico, así como la incorporación de nuevos casos aún más complejos, que provoca revascularización miocárdica incompleta.⁴

El objetivo de la RVMD es incrementar el **flujo coronario efectivo**, sin modificar el área vascular.⁶ Mientras que la revascularización miocárdica indirecta esta

dirigida a incrementar el **área vascular, derivado del proceso inflamatorio**, y facilitar los mecanismos fisiológicos que garanticen la apertura de colaterales, restableciendo entonces la proporción entre área vascular y masa ventricular irrigada.⁴

Ambos procedimientos encuentran sus limitaciones en la naturaleza progresiva de la enfermedad aterosclerótica, la cual se manifiesta en la **revascularización miocárdica directa** a largo plazo, con la necesidad de re-intervención (40% a 10 años; n = 165) y la sobrevida (40% a 10 años; n = 2,429).⁴ El incremento del flujo coronario efectivo de manera abrupta, condiciona la reducción del 30% de los vasos colaterales, lo cual podría ser la responsable de la mayoría de los infartos perioperatorios.¹ Por otra parte la **revascularización miocárdica indirecta** puede ser más lenta, pero sus efectos son más duraderos, mismo que podrían repercutir notablemente en los periodos libres de enfermedad y en la sobrevida de los pacientes. De tal forma que la neutralización lógica a ambas limitaciones es la implementación conjunta de ambos procedimientos, dirigiéndose hacia el concepto moderno de **Revascularización miocárdica integral (RVMINT)**, la cual no solo se enfoque a incrementar rápidamente el flujo coronario efectivo, sino a no perder los vasos colaterales, e incrementar lentamente el **área vascular funcional**, equiparando la proporción entre masa irrigada y área vascular e irrigación.

La controversia, así como el interés en la cardiología actual en torno a este tema, otorgan la suficiente congruencia y consistencia, como para justificar la re-utilización de los métodos de revascularización miocárdica indirecta, solos o en conjunto con la revascularización miocárdica directa, en la medida de que esta, establezca los suficientes argumentos causales que expliquen la razón de sus efectos, y que planteen conclusiones que se apoyen tanto la solidez metodológica, como el rigor estadístico, y con ello demuestren su validez. Sin embargo todos los modelos relacionados con la RVMi, incorporan como variables a la isquemia, variable que no puede medirse con certeza, debido a que las condiciones de circulación colateral son inherentes a cada especie y a cada sujeto.

En la década de los ochentas la implementación de la **revascularización transmiocárdica con Láser**,⁸ logró captar la atención internacional, no solo por su nombre tecnológicamente rimbombante, sino por el impacto que esta causa en el resurgimiento de los conceptos de antaño, sobre la circulación coronaria anormal, así como los intentos quirúrgicos por restablecerla^{9,10}. La búsqueda de métodos menos costosos, que pudieran equipararse con la **punción mecánica del corazón**,¹¹ la cual no emula experimentalmente la onto-filogenia del corazón de los reptiles, como había sido propuesto, sino que provoca el efecto neo-angiogenico incrementando el proceso inflamatorio.^{7,11-16}

A pesar de que sus argumentos fisiopatológicos tienen un carácter dudoso,¹⁷ la mejoría de los pacientes con revascularización transmiocárdica con Láser es clínica y estadísticamente significativa en estudios multicéntricos ($p < 0.001$, $n = 200$),¹⁸ fundamentado por la mejoría de la angina ($p < 0.05$),¹⁹ incremento de la contractilidad ventricular ($p < 0.05$),²⁰ y el flujo subendocárdico del 20 al 40% ($p < 0.001$).¹⁹ Sin embargo el escepticismo continua siendo manifiesto pues existen otros autores que explican sus efectos en base ya sea al “efecto placebo”, o bien a la denervación miocárdica.²¹ Por otra parte los altos costos que esta tiene, limita la implementación rutinaria y extendida en la mayoría de las instituciones.²²⁻³⁰

Algunos investigadores se han dado a la tarea de encontrar la causa de la mejoría de los pacientes, concluyendo que sus efectos no radican en la formación de canales, pues estos desaparecen a los dos meses del procedimiento³¹ sino que es producto del proceso inflamatorio que origina la neo-angiogénesis y/o el reclutamiento de vasos colaterales,³² efecto que se resume en el incremento del área vascular funcional. Estos efectos pueden ser equiparables experimentalmente al someter a puercos bajo isquemia crónica a diez disparos con láser *versus* diez punciones mecánicas, en donde el láser es mejor ($n=20$; $p < 0.001$), pero tan solo con incrementar el número de punciones mecánicas a 30 en otro grupo, la diferencia desaparece ($n=10$, $p = NS$),³³ logrando como efecto adicional la mayor protección miocárdica, al evitar la quemadura excesiva del tejido y de reducir las complicaciones como la micro-embolia aérea y las arritmias por el uso del láser.⁴ Aunque existe un reporte experimental en 25 puercos, divididos en

cinco grupos con isquemia crónica, sometidos a 22 disparos de láser, cinco punción mecánica caliente, cinco en normotermia, y cinco con aguja ultrasónica; midiendo el área vascular, en donde el uso del láser fue superior ($p < 0.05$).³⁴

Los otros métodos de revascularización miocárdica indirecta se fundamentaron en favorecer ya sea la circulación colateral intramiocárdica y/o extramiocárdica. Los primeros propuestos se dirigieron a incrementar la circulación extramiocárdica por medio del aumento de la circulación vicariante o pleuro-pericárdica, ocasionando la abrasión del epicardio o **epicardiectomía**, cuyo efecto ocasionaba el incremento del proceso adherencial y la neovascularización del pericardio al miocardio o bien mediante la reducción de la estimulación simpática.⁵ La circulación intramiocárdica era supuestamente incrementada en base a dos sistemas: el sinusoidal o “lagos transmiodiárdicos”, o bien el sistema trabecular “golfos endomiocárdicos”, ambos sistemas incrementan la superficie de contacto entre la sangre y el miocardio.^{5, 9}

Dentro de esta misma lógica, Vineberg fue el primero en proponer el uso conjunto de estos procedimientos para provocar el efecto sinérgico, utilizando **epicardiectomía con un injerto libre o pediculado de epiplón**, asociado a la implantación de arteria mamaria intramiocárdica, con buenos resultados clínicos.^{5,10,12}

El análisis deductivo y la congruencia de los trabajos experimentales y clínicos nos demuestran que los efectos de las diferencias de los métodos radican en la magnitud del **efecto lesivo sobre el corazón** (epicardiectomía, punción mecánica, láser), el cual desencadena un proceso inflamatorio y de reparación, que condiciona la liberación de factores intermediarios de crecimiento celular como: **Factor Vascular de crecimiento derivado del endotelio (VEGF)**,^{33, 35,36} **factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)**,^{7,37,38} **Factor de transformación beta**,^{39,40} **Factor de crecimiento derivado de las plaquetas**,⁴¹⁻⁴³ **factor de crecimiento derivado del corazón (HDGF)**.⁴⁴

La expresión del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio y del factor de crecimiento de fibroblastos se obtiene a través de un receptor de tirosina llamado **flk-1** ó **KDR**.⁴⁵ Estos factores pueden ser producidos por el corazón en

respuesta a una lesión o bien donados por el epiplón activado,⁴⁶⁻⁴⁹ los cuales favorecen el proceso neo-angiogénico por medio del incremento de la transcripción y transducción genética,⁵⁰⁻⁵³ aumento de la síntesis de ADN,^{52,53} y la expresión proteica por medio del RNA mensajero y ribosomal,⁵⁴⁻⁵⁶ lo cual repercute en la capacidad endotelial de proliferar y migrar en una matriz extracelular,^{50,51,57-59} la cual es esencial para los mecanismos de nutrición, sostén y adhesividad.^{60,61} De la misma forma se ha demostrado el incremento de las isoformas de actina,^{62,63} y la reducción de la proteólisis del factor de crecimiento de fibroblastos,^{65,66} cuyas consecuencias finales contribuyen a la remodelación cardiaca.

En segundo lugar están los **efectos fisiológicos**, los cuales promueven la apertura de vasos colaterales, reclutando el mayor número de vasos en el territorio afectado e incrementando el área vascular funcional.⁵ Estos efectos están asociados a la acción paracrína y autocrína del óxido nítrico y el factor de transformación beta.^{39,40, 67-70} Dichos factores han sido incorporados a la clínica mediante la aplicación intracoronaria o por inyección directa al miocárdio, pero hasta el momento con resultados clínicos no satisfactorios y de muy alto costo.²²⁻³⁰ De tal forma que para poder establecer adecuadamente una asociación causal, no es posible realizarla en base a la medición del número de vasos, pues esta puede ser producto de la apertura de colaterales y no de la neo-angiogénesis, funcionando entonces como un sesgo importante, al igual que la isquemia; pues ambas variables intermedias están igualmente implicadas (VEGF y FGF, TGF- β). Sin embargo si se mide el área vascular funcional a través de la densidad vascular se puede evaluar los efectos tanto morfológicos como los funcionales.

Cabe destacar que la variable de confusión **isquemia**, es un efecto lesivo que no se puede controlar, pues existe una variabilidad biológica ante la respuesta a la ligadura coronaria, que en consecuencia, el efecto final desarrollado, se verá amplificado, enmascarando el efecto, que **aunque leve es real**. Por tal circunstancia y en congruencia con algunos estudios experimentales en donde no se incluye la isquemia es posible obtener información útil sobre la expresión del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de

fibroblastos, FVIII y la densidad vascular, demostrando el gradiente biológico del efecto.⁷¹

Los pasos que derivan en la neo-angiogénesis se dividen en dos etapas, una inicial llamada **vasogénesis** que se caracteriza por diferenciación, proliferación y migración celular; controlada primordialmente por la presencia del factor Vascular de crecimiento derivado del endotelio, y la segunda etapa o **angiogénesis**, la cual se refiere a la formación de un primordio vascular y maduración del mismo, o bien la extensión de un vaso ya existente a otro territorio,^{72,73} determinada primordialmente por la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos.^{74,75}

La asociación entre el fenómeno lesivo y la angiogénesis ha encontrado sus evidencias en base a la determinación intrapericárdica del factor de crecimiento de fibroblastos en pacientes que han padecido un infarto del miocárdio,⁷ además de que se ha demostrado mediante inmunohistoquímica la expresión tanto de Factor Vascular de crecimiento derivado del endotelio como del factor de crecimiento de fibroblastos, evaluadas de manera objetiva por medio de morfometría computarizada, cuyo método ha sido validado por varios investigadores, representa el método más fehaciente en la actualidad.^{33,75}

En la literatura se puede observar esta relación lógica, que determina la congruencia que propone la adición de métodos de revascularización miocárdica indirecta, tal es el caso del uso de epicardiotomía e injerto de epiplón y la revascularización transmiodiárdica con Láser e injerto de epiplón; o bien la revascularización miocárdica directa más revascularización transmiodiárdica con Láser, para evitar la revascularización incompleta.⁴

Dado que el proceso neoangiogénico es dinámico, se cae en la disyuntiva de cuando evaluar sus efectos, sin embargo estos pueden presentarse ya sea durante el proceso vasogénico en el que se encuentran más evidencias dirigidas a aspectos morfológicos (Proliferación celular), sin embargo se infiere que durante el proceso angiogénico se pueda ya encontrar vasos en fase de maduración, lo cual habla de un proceso más funcional (densidad vascular), el cual justifica de manera más importante su utilidad terapéutica.

La asociación entre los elementos hemostáticos y la angiogénesis esta bien demostrada; tal es el caso de la actividad conjunta anti-trombótica del factor de crecimiento de fibroblastos con los factores Xa y II,⁷⁶⁻⁷⁸ así como su interacción con el factor plaquetario con la actividad de los macrófagos y fibroblastos.
37,42,43,77,78

De la misma forma se puede resaltar que existen otros factores que de manera individual pueden participar en el proceso neo-angiogénico, en su interacción con una **matriz extracelular**. Tal es el caso del **Factor VIII**, el cual, aumenta el grado de mitosis y además de funcionar como un determinante de la actividad proteolítica de la fibrina y del fibrinógeno, la cual es trascendental para la migración endotelial.⁷⁴

La asociación entre **trombina** y el proceso neo-angiogénico fue reportada por primera vez de forma espuria por Trousseau en 1872, quien describió el efecto procoagulante asociado a tumores de tipo sarcomatosos,^{45,79} cuya capacidad metastásica e invasividad, depende de la formación de la neo-angiogénesis. Aunque dicha asociación se correlaciona en el terreno de la cardiología ante la observación que demuestra el incremento de la angiogénesis o la apertura de colaterales en pacientes con infartos transmurales con un trombo asociado.⁸⁰⁻⁸²

Algunos investigadores estudiaron esta asociación causal demostrando que la trombina tiene la misma capacidad de estimular el receptor flk-1, y lograr los mismos efectos que tienen el factor vascular de crecimiento derivado del endotelio y factor de crecimiento de fibroblastos.^{45,71,76,82}

La actividad proteolítica de la matriz extracelular constituye uno de los elementos más importantes en el proceso neo-angiogénico debido a que en las etapas iniciales es necesario preservar los constituyentes de la matriz extracelular, es por ello que la presencia de inhibidores de la actividad de las serin proteasas y/o Plasminógeno y trombina, como las aprotininas y el ácido transexámico, son fundamentales para establecer el equilibrio pro-angiogénico.^{74,75}

La participación de los sellos de fibrina emulando tanto los efectos de una matriz extracelular artificial, como los elementos individuales que los conforman son

claves para el proceso neo-angiogénico, es por ello que deben evaluarse en otro nivel factorial.

En la misma congruencia biológica y ante las propuestas de los diferentes usos de los sellos de fibrina en la medicina como: Coadyuvante de la Osteogénesis, vehículo de medicamentos como antibióticos y/o factores de crecimiento como el Factor Vascular de crecimiento derivado del endotelio,⁸³⁻⁸⁶ o bien de evitar el sangrado después de una abrasión del miocárdio,⁸⁷ resumen que los sellos de fibrina no solo tienen propiedades hemostáticas y de adhesión, sino que además podrían funcionar como **vehículos de sustancias, células** y participar como una adecuada **interfase entre tejidos** para facilitar su unión, la cual a su vez se establece por medio de la creación de vasos sanguíneos ($p > 0.05$).⁸⁸

Los utilidad de sellos de fibrina como interfase de tejidos ha sido demostrado experimentalmente en ratas, aumentando la capilaridad entre aorta y miocardio o en zonas de unión, permitiendo el crecimiento endotelial ($n=10$ $p < 0.05$),⁸⁸ ya sea de tejidos diferentes; músculo estriado al miocárdio⁸⁹ o epiplón a las anastomosis bronquiales.⁹⁰

Sin embargo ya sean los sellos de fibrina de fabricación casera o bien industrial existe la suficiente congruencia como para poder pensar que podrían incorporarse al efecto aditivo neo-angiogénico. La elección de los sellos de fibrina de fabricación industrial son de dos tipos: **1. Los que utilizan productos de origen bovino**, el cual incorpora aprotininas a su composición, los cuales son capaces de producir discrasias sanguíneas muy importantes relacionadas a la producción de anticuerpos anti-factor V,⁹¹ o bien producir una reacción anafiláctica inmediata o en una segunda aplicación, lo cual limitaría su uso o bien la transmisión de priones capaces de producir la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob,⁹² variante humana de la enfermedad de las vacas locas. **2. Sellos de fibrina de origen humano**, los cuales al no ser productos de tan amplia purificación contienen todos los elementos existentes en el plasma humano como integrinas, las cuales son glicoproteínas esenciales para la adhesión celular,⁹³ además de las altas concentraciones de trombina, fibrinógeno, y factor VIII, los cuales están contenidos en los sellos de fibrina.

Existe suficiente coherencia biológica como para pensar que podría existir un efecto sinérgico entre los métodos de revascularización miocárdica indirecta en conjunción con un sello de fibrina, los cuales podrían tanto aumentar el efecto o acelerar el mismo. Es por ello que desde el punto de vista de las pruebas experimentales, el efecto aditivo puede ser valorado mediante un **diseño factorial**,⁹⁷ en donde el primer nivel está representado por aquellos elementos que incrementan la dotación y la donación de los factores de crecimiento y en donde el segundo nivel explore tanto la participación directa de la trombina y otros elementos de la hemostasia contenidos en el sello de fibrina que participen en la angiogénesis y/o como en forma indirecta, por medio de matriz extracelular, contrastando con ello todos los niveles de aditividad y la especificidad de los procedimientos al efecto, lo cual conforme la suficiente información que sustente las evidencias necesarias para establecer una adecuada fuerza de asociación, gradiente dosis respuesta y dado que los modelos murinos, tienen la suficiente plausibilidad biológica, aún en corazones normales, se puede establecer una adecuada analogía e inferencia estadística.^{94, 95}

Uno de los problemas en estos modelos experimentales radica en la temporalidad de la evaluación, pues se pueden obtener efectos muy distintos en cada etapa: En las etapas iniciales (9-15 días) en donde se lleva a cabo la proliferación y migración celular con una expresión mayor del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio sobre el factor de crecimiento de fibroblastos y de forma inversa, en etapas tardías (45 días), en donde se lleva a cabo el proceso de maduración del primordio vascular y con ello se obtienen tanto datos morfológicos como funcionales mucho más cercanos a la certeza biológica buscada.⁷⁵

Para poder establecer entonces una adecuada relación causal tanto de las variables intermedias como de la causa inicial es necesario el apoyo en métodos diagnósticos que se apeguen a las más estrictas condiciones de los criterios de calidad metodológica de las pruebas diagnósticas, lo cual otorgue la máxima verosimilitud del proceso. Es por ello que se eligió a la inmunohistoquímica como el método con la mayor especificidad, la cual depende de la reacción individual y

única con el antígeno siendo del 99%, mientras que la sensibilidad estará dada por la técnica de fijación y de la calidad del proceso inmuno-histoquímico.

La evaluación de los efectos también debe de ser tomada de forma muy estricta, incluyendo métodos de evaluación objetiva: morfometría computarizada, la cual ya ha sido ampliamente validada en la literatura, sin olvidar la ceguera de la misma y aunque esta sea ya objetiva. En esta misma tónica y con el deseo de utilizar variables con mayor peso se mide el efecto en escala numérica y porcentual, facilitando el manejo estadístico de los datos.

Una vez que se han establecido las variables y su aplicación al análisis estadístico es posible utilizar una prueba de ANOVA, para 11 grupos, con resultados numéricos continuos, para identificar si existe diferencia entre los grupos y un análisis POST-DOC, como la prueba de Turkey para identificar el grupo o grupos que hacen esta diferencia, además de la aplicación de intervalos de confianza que doten a los resultados de mayor peso específico. La correlación necesaria entre las variables intermedias y la de desenlace con propósitos predictivos puede ser aplicada mediante una regresión lineal. De acuerdo a los resultados se establecerá si es posible aplicar un análisis multi-variado, mediante correlación múltiple.^{96,97}

II. JUSTIFICACION

La implementación de pruebas experimentales con la suficiente plausibilidad biológica como para poder explicar la fuerza de asociación y el gradiente biológico de la magnitud y especificidad del efecto aditivo, producto de la conjunción de los métodos de revascularización miocárdica indirecta en asociación con un sello de fibrina y su correlación con las variables intermedias (Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y flk-1) en la cadena causal del proceso neo-angiogénico (Densidad vascular), en corazones normales es determinante para poder justificar su reutilización y sustentar la coherencia, analogía y consistencia existente entre la aplicación de estos y la mejoría clínica de los pacientes, en la medida de poder resolver tanto las limitantes propias de los procedimientos de revascularización miocárdica existentes, como de dotar de una alternativa terapéutica a pacientes fuera de ella;

o bien para proponer una revascularización miocárdica más integral, que permita aumentar la accesibilidad terapéutica y reducir el impacto epidemiológico de la cardiopatía isquémica.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál será la **magnitud del efecto** producto de la adición de los métodos de revascularización miocárdica en ratas sin isquemia, sobre el incremento de la proporción del área vascular efectiva (densidad vascular) a los 45 días del procedimiento?

SECUNDARIOS

¿Cuál será la **magnitud del efecto**, producto de la adición de los métodos de revascularización miocárdica en ratas sin isquemia, sobre el incremento de la proporción de la inmuno-expresión de los elementos intermediarios (Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos, Flk-1), a 45 días del procedimiento?

¿Cuál será la **correlación** entre la magnitud del incremento de la proporción del área vascular (densidad vascular) y la magnitud de la proporción de la inmuno-expresión del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y flk-1, en ratas sujetas al efecto conjunto de la adición de los métodos de revascularización miocárdica sin isquemia, a 45 días del procedimiento?

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la **magnitud del efecto**, consecuencia de la adición de los métodos de revascularización miocárdica en ratas sin isquemia, sobre el incremento de la proporción de área vascular efectiva (Densidad vascular), identificada mediante morfometría computarizada en campos de 400x, a los 45 días del procedimiento.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

Determinar la **magnitud del efecto**, consecuencia de la adición de métodos de revascularización miocárdica, en ratas, sobre la proporción de la inmuno-expresión de los elementos intermediarios (Factor Vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y flk-1), identificados

mediante morfometría computarizada en campos de 400x, a los 45 días del procedimiento.

Determinar la **correlación**, existente entre la magnitud del incremento de la proporción del área vascular efectiva y la magnitud del incremento de la proporción de la inmuno-expresión de elementos intermediarios (Factor Vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y flk-1), identificados mediante morfometría computarizada en campos de 400X, de corazones de rata sin isquemia sujetos al efecto conjunto de la adición de los métodos de revascularización miocárdica, a 45 días del procedimiento.

V. HIPOTESIS GENERAL

La **magnitud del efecto** consecuencia de la adición de los métodos de revascularización miocárdica en corazones de rata sin isquemia, será mayor que el efecto de cada método por separado, en el incremento de la proporción del área vascular efectiva a los 45 días del procedimiento.

HIPOTESIS SECUNDARIAS

La **magnitud del efecto**, consecuencia de la adición de los métodos de revascularización miocárdica en corazones de rata sin isquemia, será mayor que el efecto de cada método por separado, sobre la inmuno-expresión de los elementos intermediarios (Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y flk-1) a los 45 días del procedimiento.

La **correlación**, entre la magnitud del incremento de la proporción del área vascular efectiva y magnitud del incremento de la proporción de la inmuno-expresión de los elementos intermediarios será menor a 0.8 para el factor vascular de crecimiento derivado del endotelio y mayor a 0.8 para el factor de crecimiento de fibroblastos y flk-1, en corazones de rata sin isquemia, sujetos al efecto conjunto de la adición de los métodos de revascularización miocárdica indirecta, a los 45 días del procedimiento.

VI.DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

Ver anexo 2.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL EXPLICATIVO.

Ver anexo 3.

VIII.TAMAÑO DE LA MUESTRA

Ver anexo 4.

IX.MATERIAL Y METODOS

Lugar de Estudio: Departamento de Cirugía experimental. Bioterio del Centro Médico Nacional, Siglo XXI. **Patología:** Hospital de Oncología, CMN Siglo XXI, Departamento de Investigación en Enfermedades Oncológicas.

Modelo: Ratas Sprague-Dawley Macho y hembra de 250 a 300 g.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Ratas macho o hembras Sprague-Dawley, de peso entre 250 y 300 g.

Aleatorización.

Cumpliendo con los reglamentos de aseo y cuarentena

No embarazadas.

Todas las ratas sometidas al procedimiento quirúrgico.

CRITERIOS DE INCLUSION

Ratas que cumplan con los criterios de selección y sean sometidos al procedimiento quirúrgico.

CRITERIOS DE ELIMINACION

Ratas que no cumplieron con el tiempo post-quirúrgico esperado para la evaluación (45 días). Se considerara la mortalidad del procedimiento para el análisis (Esperada del 20-30%).

DESCRIPCIÓN OPERATIVA (PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO).Ver video.

A) ANESTESIA. Se realiza anestesia de la rata mediante la aplicación IM de: Ketamina: 90 mg/Kg; Xilacina:10 mg/Kg; Atropina: 0.25 mg, intraperitoneal.

B) PREPARACION DEL MODELO

1. Rasurado de cuello a abdomen o tórax según sea el caso del procedimiento.
2. Fijación de extremidades con tela adhesiva a elemento de fijación de neopreno.
3. Monitorización electrocardiográfica.

C) TRAQUEOSTOMIA

1. Incisión longitudinal de 1 cm.

2. Disección de músculos pre-traqueales.
3. Colocación de sedas de fijación.
4. Incisión transversal de traquea.
5. Introducción de cánula de silastic.
6. Se inicia ventilación mecánica con 2 cc de aire con mezcla del 60% de Oxígeno.

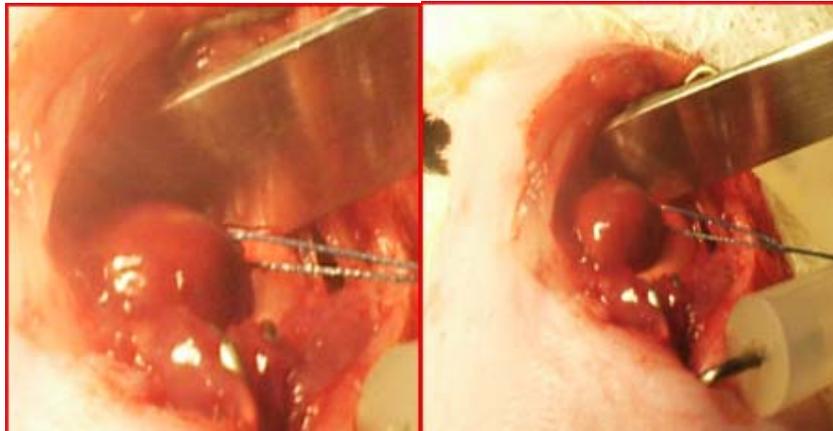


D) TORACOTOMÍA

1. Se realiza una incisión postero-lateral izquierda.
2. Disección por planos de elementos musculares, hasta alcanzar la parrilla torácica.
3. Apertura de músculos intercostales y fijación de parrilla costal con blefarostatos.

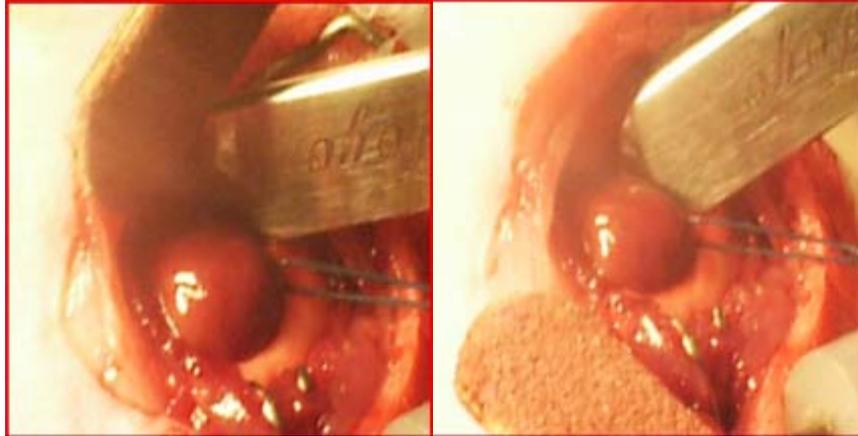
E) FIJACIÓN CARDIACA

Se coloca un punto sobre el ápex ventricular para fijar el corazón.



F) EPICARDIECTOMÍA

Mediante una lima de uñas se realiza abrasión del epicardio en cinco ocasiones.



G) PUNCIÓN MECÁNICA

Se realizan 10 punciones sobre el ápex ventricular (área de mayor tejido miocárdico), con jeringas de insulina de 1 mL y agujas # 25.



H) LAPAROTOMIA

1. Se realiza incisión sobre la línea media, con disección y corte por planos hasta alcanzar la cavidad abdominal.
2. Identificación del epiplón.
3. A través del tórax se pasa una pinza de mosquito para obtener el epiplón y pasarlo hacia la cavidad torácica.
4. Se realiza cierre de laparotomía mediante súrgete continuo de vicryl del 4-0 y cierre de piel con súrgete continuo de prolene del 4-0.

J) COLOCACION DE INJERTO DE EPIPLÓN

Se coloca el epiplón sobre la superficie manipulada previa aplicación del sello de fibrina como interfase.

K) APLICACIÓN DEL SELLO DE FIBRINA

Se colocan 2 gotas de sello de fibrina sobre la superficie miocárdica, de acuerdo a cual sea el caso.

L) CIERRE DE TORACOTOMÍA

1. Colocación de sondas de pleurostomía por contra-abertura previa colocación de puntos de Sarnoff sobre el sitio de incisión.
2. Se realiza cierre mediante súrgete continuo de Vicryl del 4-0.
3. Cierre de planos musculares continuando con la línea de sutura de Vicryl 4-0.
4. Se realiza maniobra de Valsalva y se extrae las sondas de pleurostomía con cierre de los puntos de Sarnoff.

M) CIERRE DE TRAQUEOSTOMÍA.

1. Se realiza extracción de tubo de silastic para ventilación mecánica, con la fijación de traquea.
2. Se colocan de dos a tres puntos separados de nylon del 10-0.
3. Cierre de planos musculares con Vicryl del 4-0, continuando con el cierre hasta la piel.

N) RECUPERACIÓN

Calor radiante con foco, para evitar la pérdida de la temperatura de la rata.

O) TIEMPO POST OPERATORIO

45 Días con los cuidados normales de alimentación y aislamiento, separando las ratas de acuerdo a los grupos de manipulación.

X.PATOLOGIA**Procuración de corazón:**

1. Anestesia mediante pentobarbital intraperitoneal.
2. Incisión abdominal media, con exposición de aorta abdominal.
3. Colocación de punzocat de 17 F, con paso de solución salina durante 10 minutos.

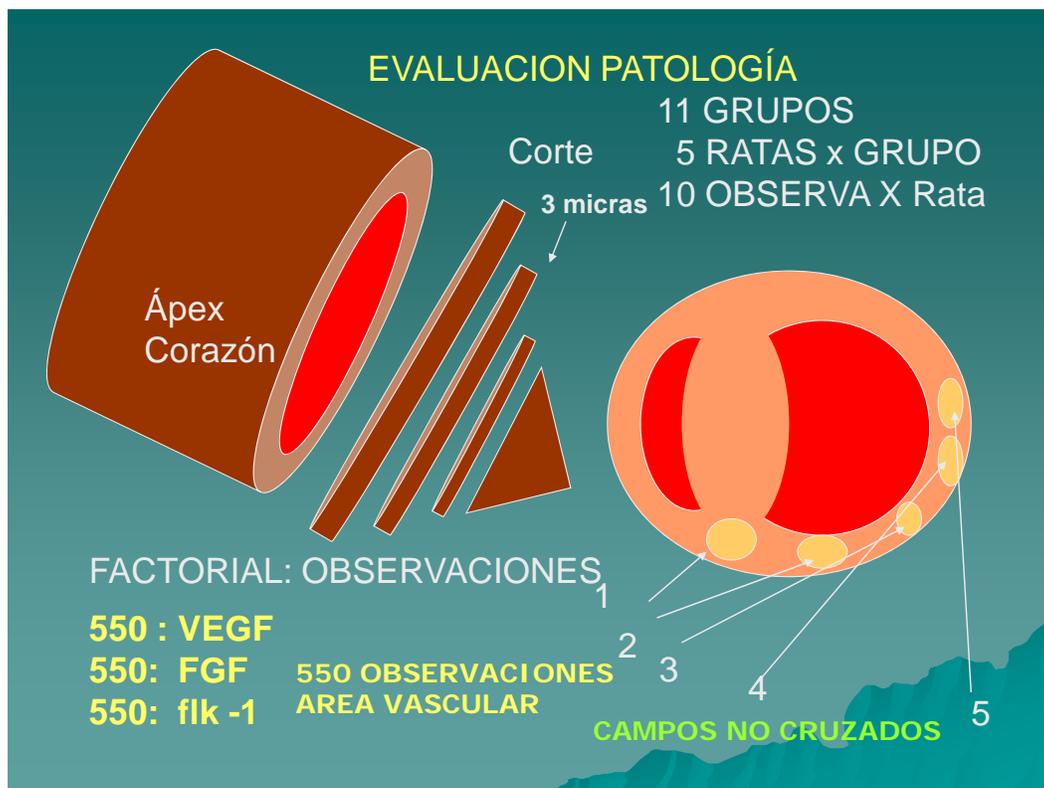
4. Apertura de tórax con sección de vena cava inferior para dejar el paso de solución.
5. Se instila por punzocat Formaldehído al 16% durante 10 minutos.
6. Se realiza procuración de pieza mediante sección superior a nivel de grandes vasos y sección de venas pulmonares; se deja pedículo de epiplón, con parte de diafragma.
7. Preservación de corazón en formaldehído al 16%, en refrigeración durante 24 horas.
8. Se pasan las piezas a formaldehído con buffer fosfatado.
9. Envió de la muestra al **Departamento de Patología**.
10. Se colocan en bloques de parafina.

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

Evaluación cegada por dos patólogos.

MICROSCOPIA DE LUZ

Cortes de corazón a 3 μ



Inmunohistoquímica (Anexo 6):

Adición de anti-VEGF, anti-FGF y anti-flk-1. Santa Cruz Biothecnology Inc. Santa Cruz, California.

Adición de Peróxido de Avidin, Biotina y Tritón X-100, incubado con peróxido de hidrogeno por 30 minutos, y posterior a 16 horas a 4 grados.

Adición de IgG con inmunoperoxidasa (vector ABC Elite Kit, Laboratorios Vector, Burlingame, CA)

Análisis subjetivo cegado: # de células que expresan la reacción (numérica).

MORFOMETRÍA COMPUTARIZADA (Anexo 7). (Software: SYS/ANALYSIS)

1. **Densidad vascular:** (escala numérica: %) Área total vs. Área vascular total de campos de 400x

2. **Inmunohistoquímica de VEGF, FGF, flk-1**

Medición objetiva: (ordinal: Leve, moderada, severa, nula), con la posterior conversión a porcentual, mediante el calculo automático del área por debajo de la curva.

XI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

ANÁLISIS SIMPLE (Estadística descriptiva): Medidas de tendencia central y desviación estándar (variabilidad de cada grupo). Determinar la magnitud del efecto.

ANALISIS BIVARIADO (Estadística inferencial): Anova de dos vías. 4 variables independientes (F). Determinar las diferencias entre los grupos. Búsqueda de efectos aditivos y multiplicativos. La variable de desenlace tanto de las variables intermedias como de la final se expresa de forma numérica porcentual, por lo que es posible emplear este estadístico.

Análisis Post-doc de HSD de Turkey (Diferencias honestamente significativas). Permite aumentar la potencia de la prueba. Se basa en el número de combinaciones de tratamientos. Es posible utilizar intervalos de confianza del 99% para esta prueba. Permite identificar de los grupos cual es el que hace la diferencia y efectos principales. Dependiendo de los resultados es posible también utilizar **la prueba de Dunnet** para compararlo con controles.

Regresión lineal: Establecer relaciones predictivas entre las variables intermedias y la final.

ANÁLISIS MULTIVARIADO. Correlación lineal simple y múltiple.

XII.CONSIDERACIONES ETICAS

La justificación de este trabajo es precisamente el realizarlo en animales, sin embargo se siguieron todas las normas y cuidados, de acuerdo a la declaración de Helsinki sobre el manejo de animales de experimentación.

XIII.RECURSOS

Físicos: Otorgados por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Materiales: Reactivos Inmunohistoquímica y Sello de Fibrina. Patrocinado por la empresa fabricante del sello de Fibrina: QUIXIL®.OMRIX. Biopharmaceutical.

Humanos: Científica: Tutor: Dr. Rubén Argüero Sánchez.

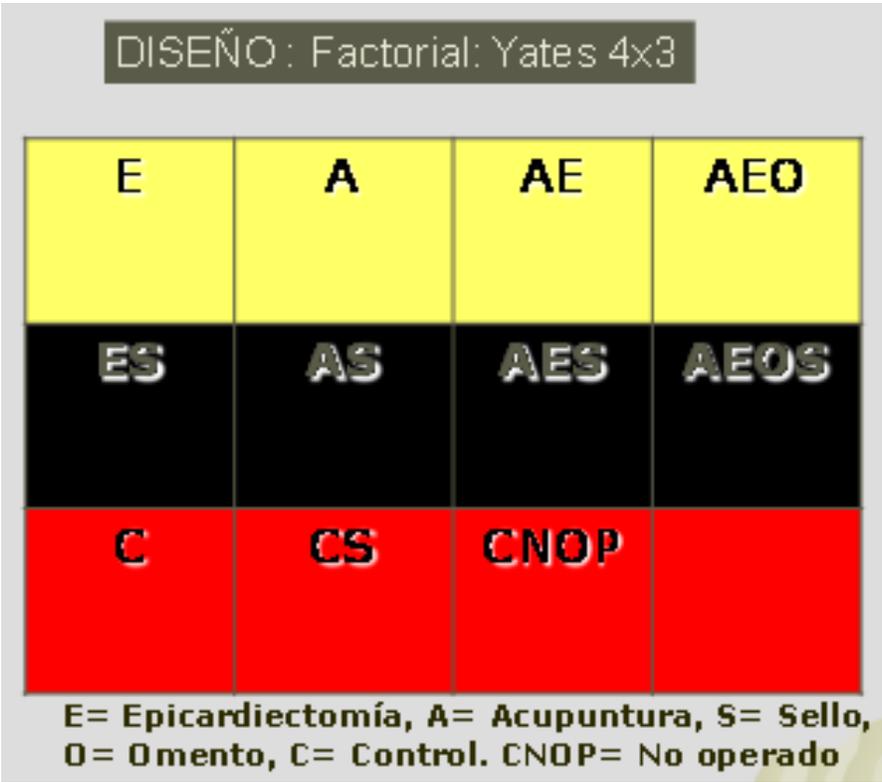
Técnica: Departamento de Cirugía experimental: Dr. Enrique Foyo Niembro.

Patología: Departamento de investigación en Enfermedades Oncológicas.

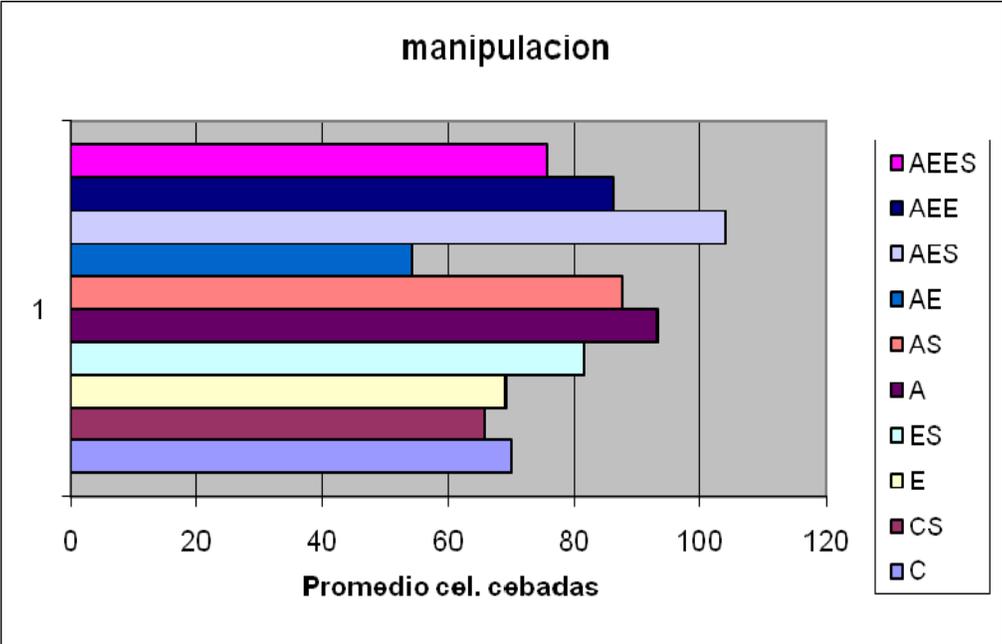
Dr. Emilio Castellanos.

XIV. RESULTADOS

En el presente estudio se obtuvieron 11 grupos (Diseño factorial de Yates de 4x3), de los cuales hubo 10 variaciones de la manipulación: 1) Epicardiectomía; 2) Punción mecánica (acupuntura); 3) Epicardiectomía+punción mecánica; 4) Epicardiectomía+punción mecánica+omento (epiplón); 5) Epicardiectomía+sello de fibrina; 6) Punción mecánica+sello de fibrina; 7) Epicardiectomía+punción mecánica+sello de fibrina; 8) Epicardiectomía+punción mecánica+sello de fibrina+omento; 9) Grupo control;10) Control+sello de fibrina; y un **11) Grupo control no operado**). Por lo tanto se operaron 55 ratas, de las cuales se realizaron 10 observaciones por espécimen, 50 por grupo siendo un total de 550 muestras. **Para fines didácticos solo se presentan los datos más relevantes.**



Cuadro 1. Células cebadas en relación con los diversos procedimientos



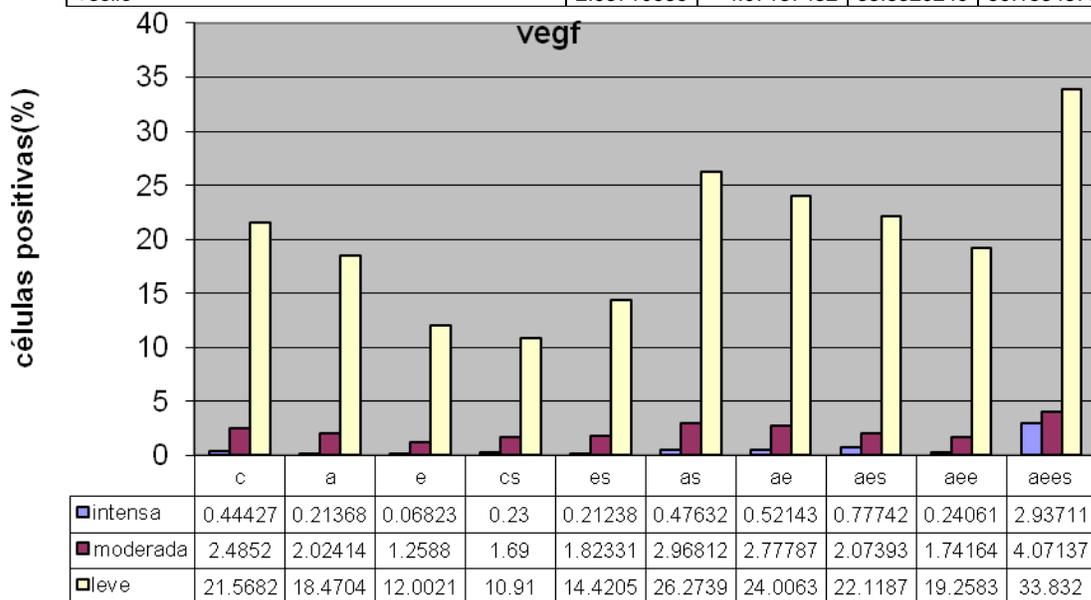
C	CS	E	ES	A	AS	AE	AES	AEE	AEES
70	65.8	69	81.6	93.2	87.5	54.2	104	86.2	75.8

Cuadro 2. Procedimiento realizado vs determinación de los diversos factores

	vegf	fgf	vegf / fgf	Flk-1	Vasos
Control	8.65	11.05	0.78	7.65	14.11
Punción mecánica	22.10	20.70	1.06	23.65	23.34
Epicardiotomía	7.20	5.25	1.30	14.30	21.44
Control+sello de fibrina	8.80	12.05	0.73	7.35	20.36
Epicardiotomía+Sello de fibrina	10.05	7.95	1.26	8.20	21.33
Punción mecánica +sello	9.42	13.19	0.71	19.44	24.69
Epicardiotomía+ Punción mecánica	16.29	10.92	1.49	12.21	23.89
Epicardiotomía+ Punción mecánica+sello	24.29	16.67	1.45	15.71	26.18
Acupuntura+epicardiotomía+omento	25.42	18.75	1.35	14.67	21.98
Punción mecánica+epicardiotomía+omento+sello	21.05	25.75	0.81	24.50	27.08

Cuadro 3. Procedimiento vs factor vascular de crecimiento del endotelio

	intensa	moderada	leve	Vasos
Control	0.44427135	2.48520113	21.5681824	75.4995172
Punción mecánica	0.21368114	2.02414319	18.4703760	79.3031775
Epicardiotomía	0.06823394	1.25880234	12.0020980	86.6711580
Control+sello	0.23000000	1.69000000	10.9100000	87.1600000
Epicardiotomía+Sello de fibrina	0.21237728	1.82331467	14.4204612	83.5370597
Punción mecánica +sello	0.47632014	2.96812437	26.2739360	70.2754467
Epicardiotomía+ Punción mecánica	0.52143190	2.77786723	24.0062630	72.7027088
Epicardiotomía+ Punción mecánica +sello	0.77741809	2.07393181	22.1186891	75.0320045
Punción mecánica +epicardiotomía+ omento	0.24061032	1.74164052	19.2583207	78.7588908
Punción mecánica +epicardiotomía+ omento +sello	2.93710686	4.07137432	33.8320249	59.1534878

**Fig.1 Factor vascular derivado del endotelio en relación al crecimiento celular de acuerdo al tipo de procedimiento.**

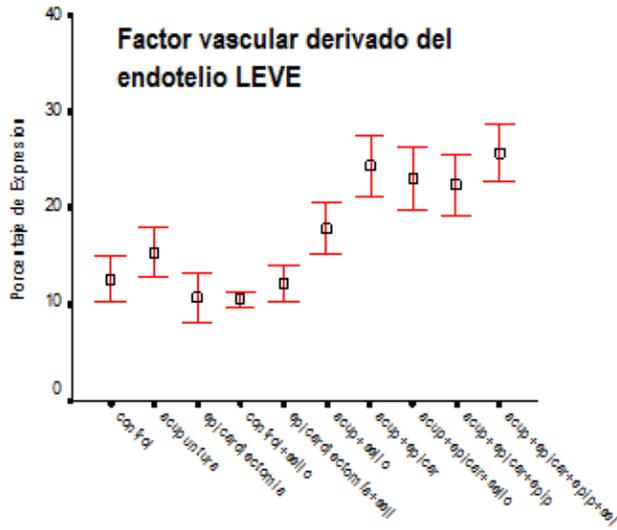


Fig.2 Factor vascular derivado del endotelio LEVE (Promedio±1DE) en relación a los procedimientos y el crecimiento celular.

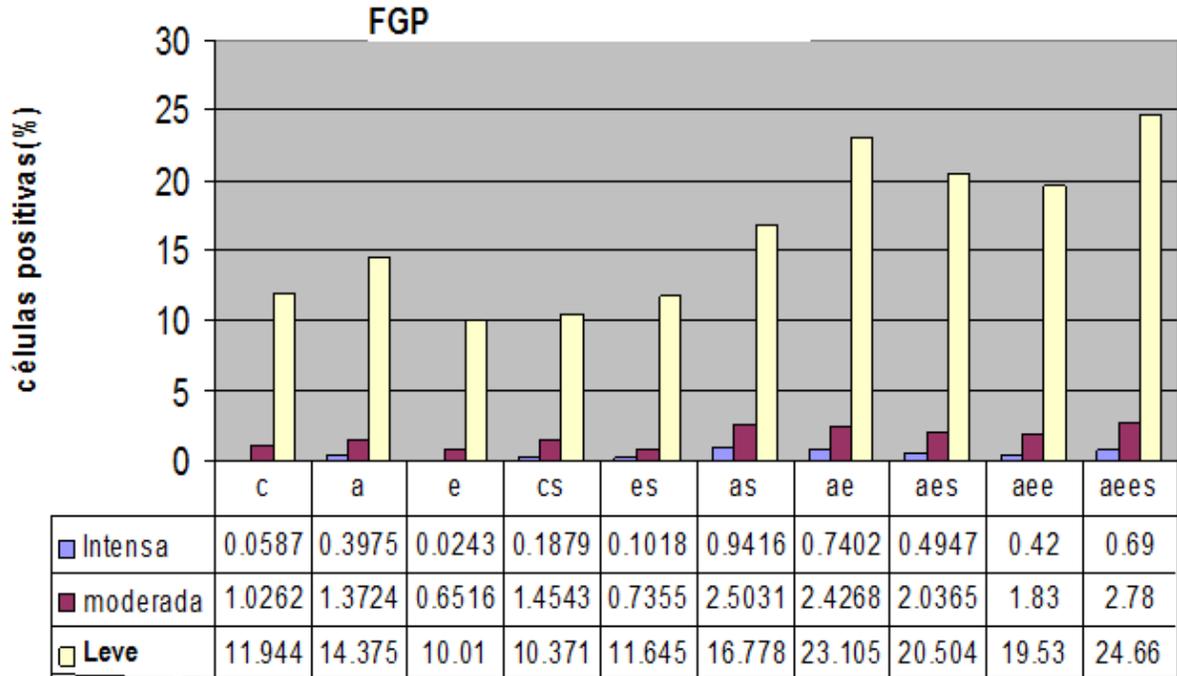


Fig. 3 Se presenta la respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos en relación a los procedimientos quirúrgicos.

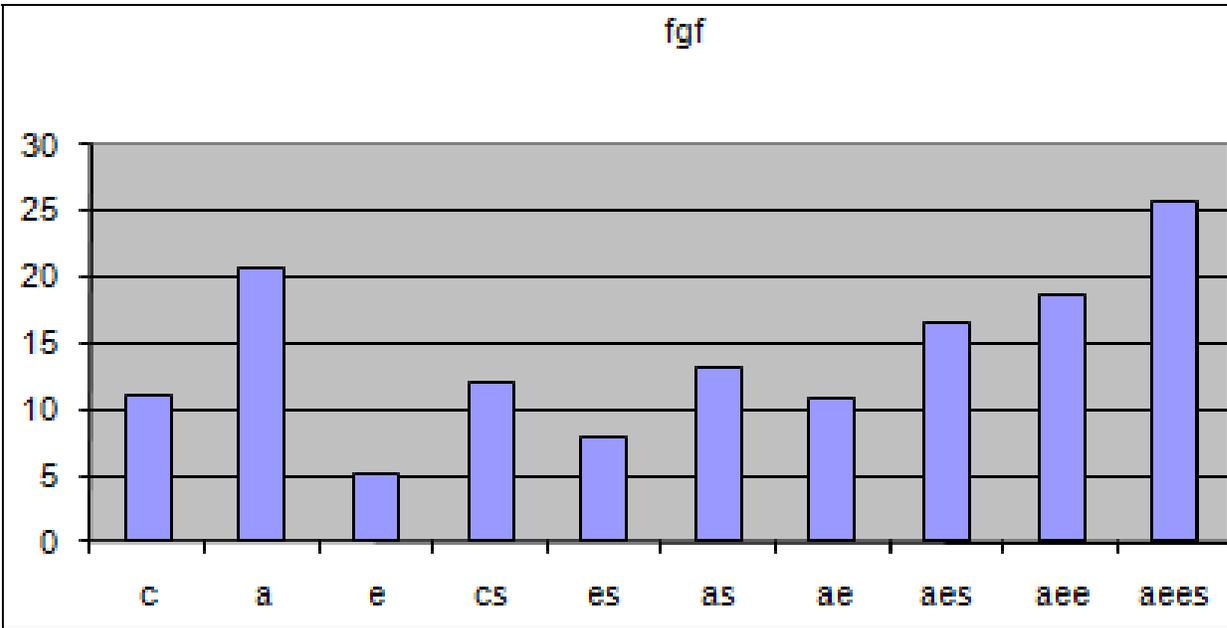


Fig. 4 Se presenta la respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos en relación a los procedimientos quirúrgicos.

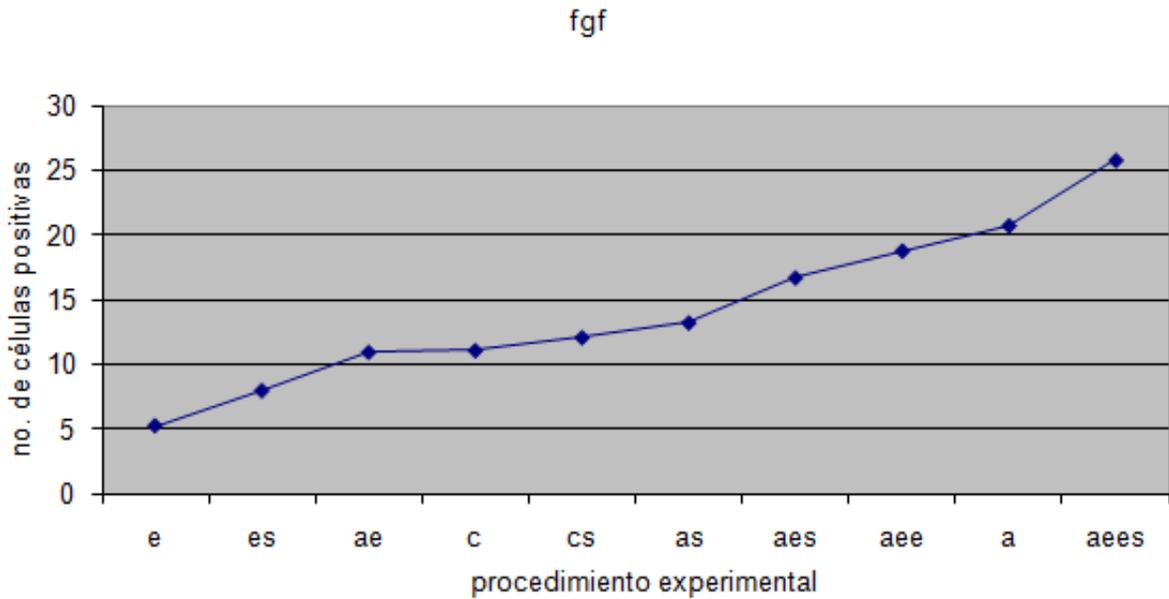


Fig. 5 Se presenta de otra manera la respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos en relación a los procedimientos quirúrgicos.

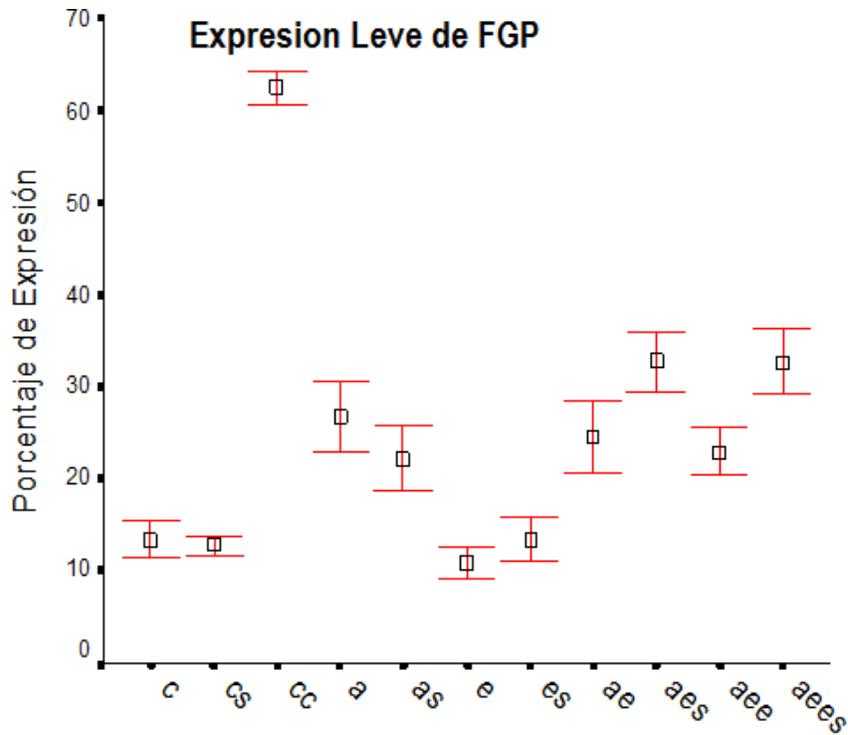


Fig. 6 Se presenta la respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos (Promedio±1DE) en relación a los procedimientos quirúrgicos.

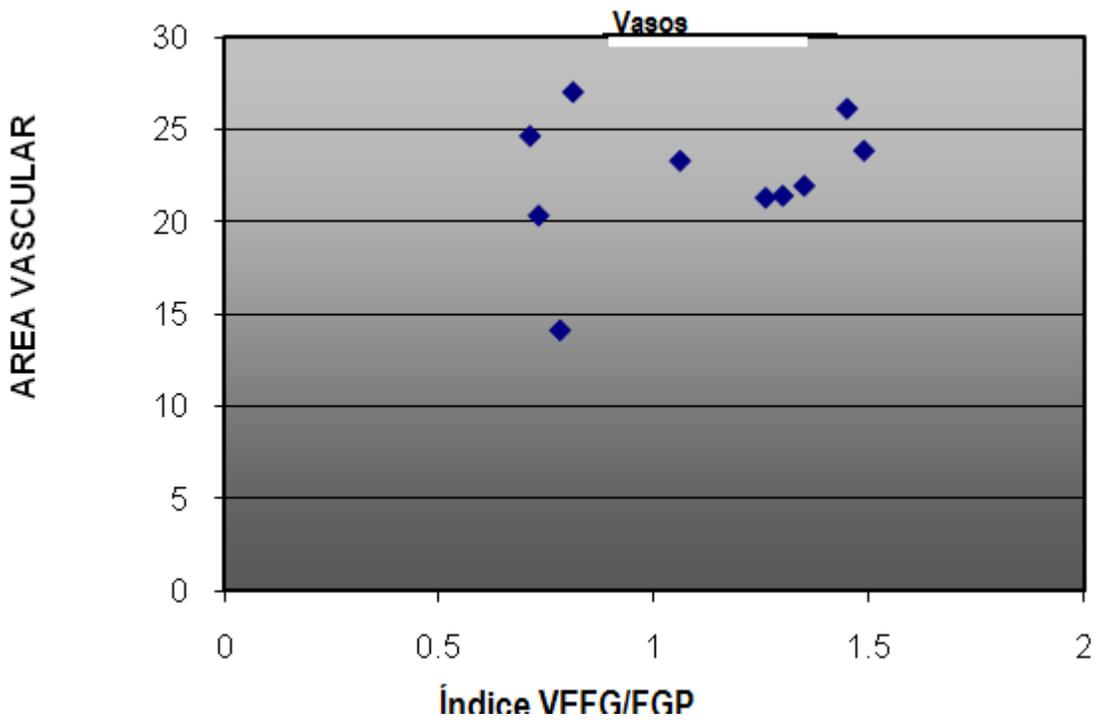


Fig.7 Índice del Factor vascular derivado del endotelio y factor de crecimiento de los fibroblastos en relación a la angiogénesis.

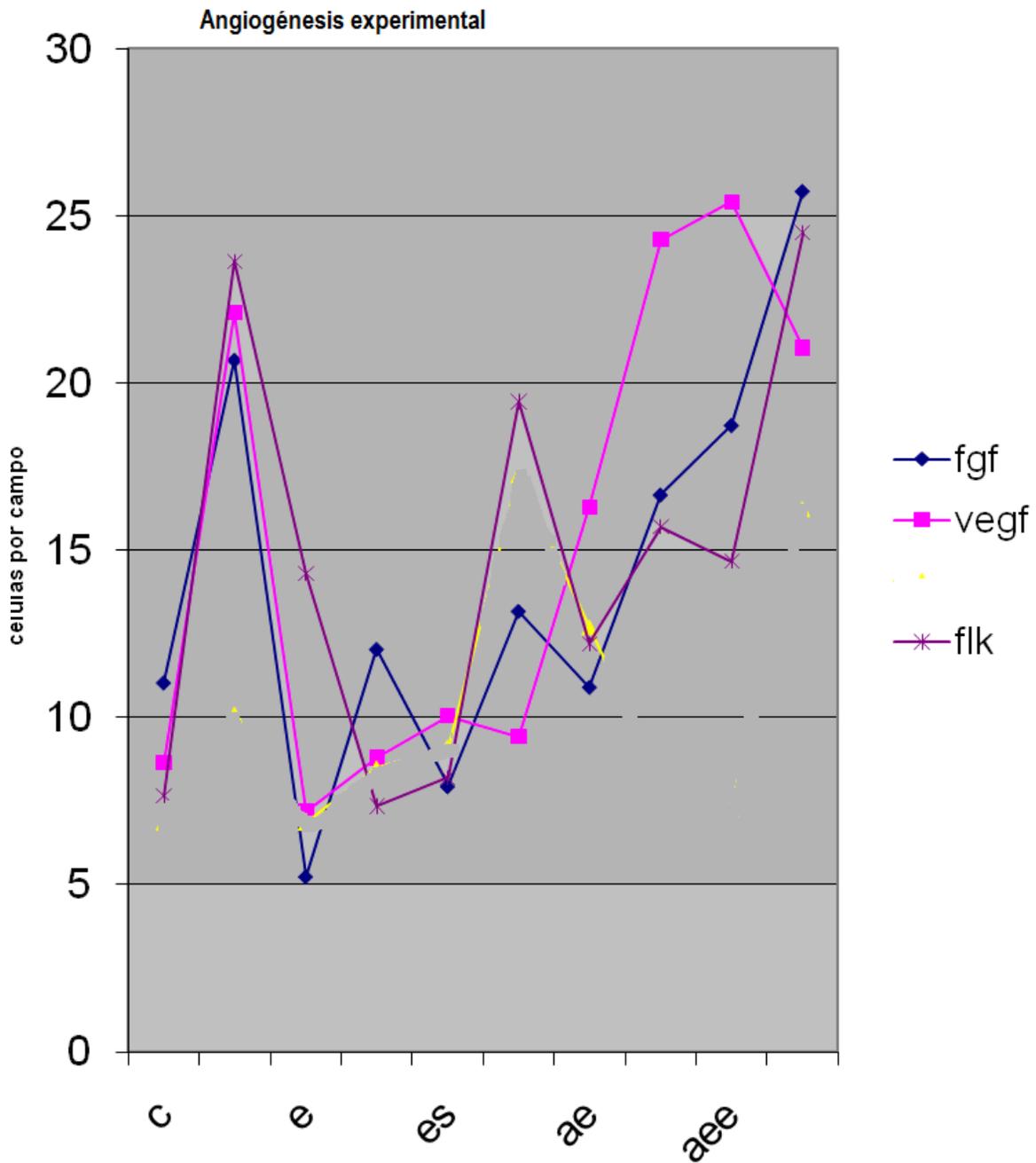


Fig. 8 Se presenta la respuesta de los factores angiogénicos de acuerdo a los diversos procedimientos. c=control; e=epicardiectomia; s=sello de fibrina; a=acupuntura; aee= acupuntura+epicardiectomia+epiplón.

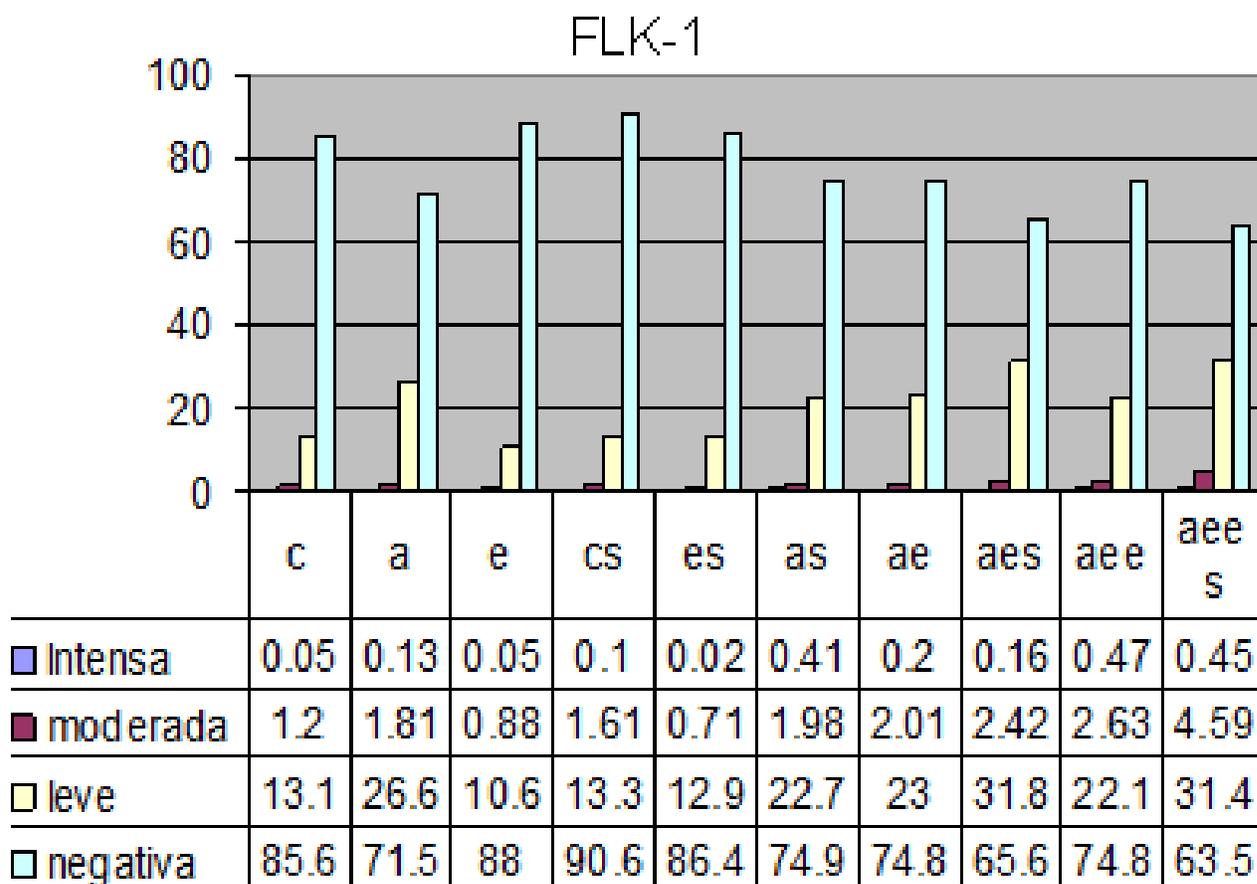


Fig. 9 Se presenta la respuesta al receptor de tirosina llamado flk-1 ó KDR en relación a los procedimientos quirúrgicos.

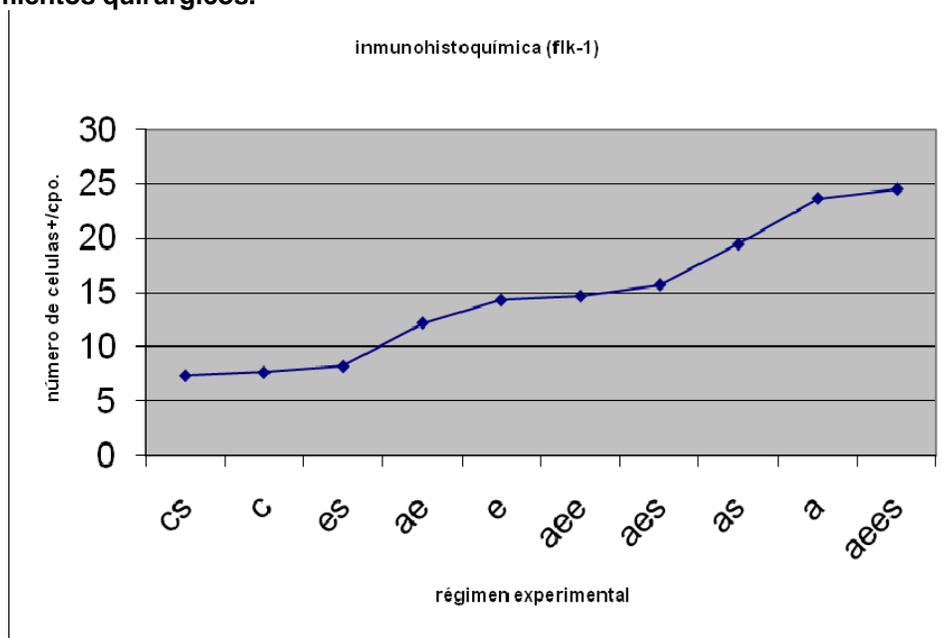


Fig. 10 Se presenta de otra manera la respuesta al receptor de tirosina llamado flk-1 ó KDR en relación a los procedimientos quirúrgicos.



Fig. 11 Se presenta la respuesta de angiogénesis al receptor de tirosina llamado flk-1 ó KDR en relación a los procedimientos quirúrgicos.

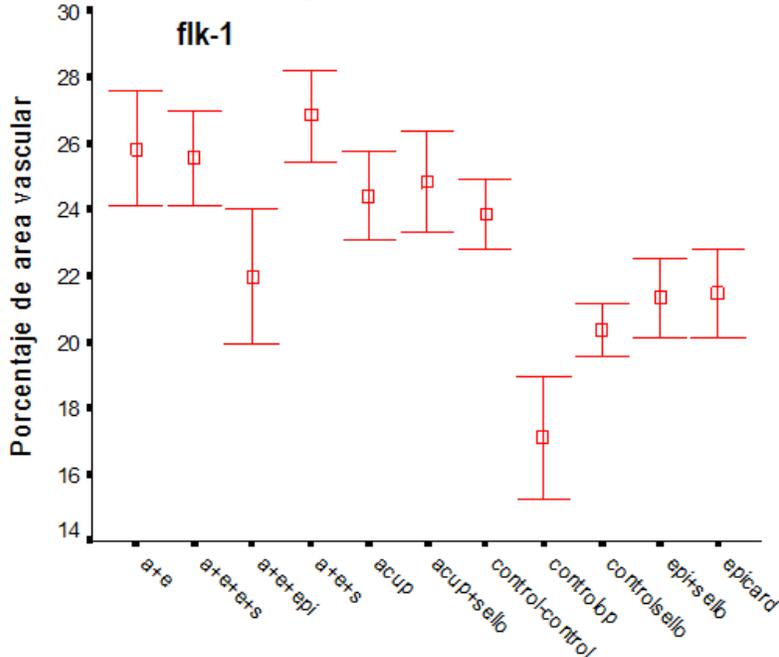


Fig. 12 Se presenta la respuesta al receptor de tirosina llamado flk-1 ó KDR(Promedio±1DE) en relación a los procedimientos quirúrgicos.

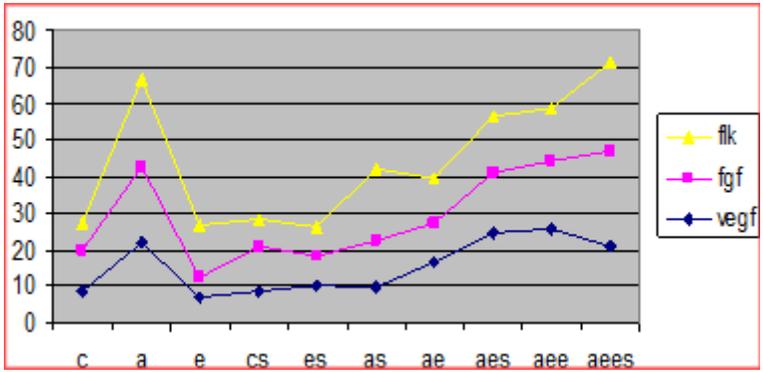


Fig. 13 Se presenta la respuesta de los tres factores de angiogenesis en relación a los procedimientos quirúrgicos.

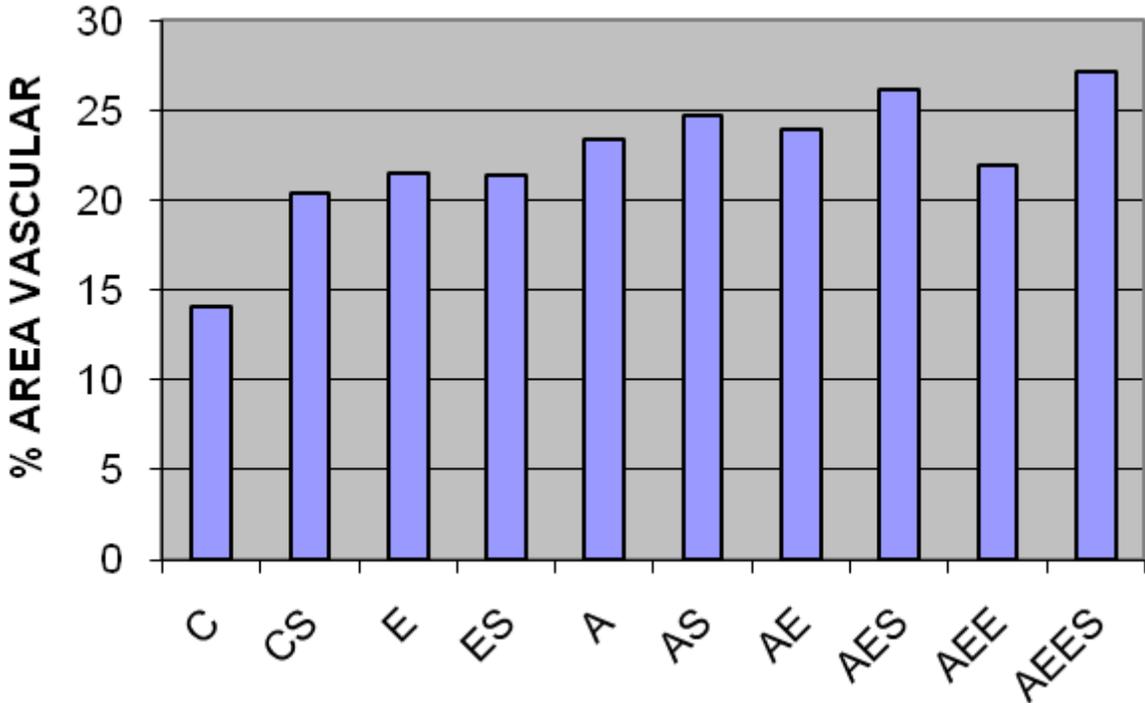


Fig. 14 Se presenta la respuesta de angiogenesis en relación a los procedimientos quirúrgicos.

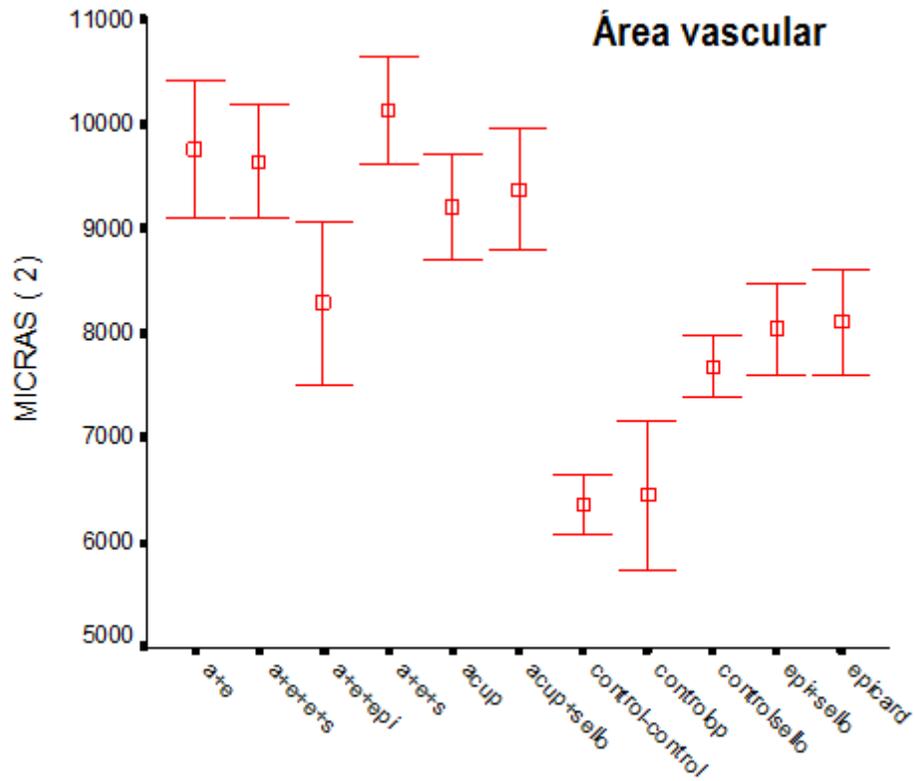


Fig. 15 Se presenta la respuesta de angiogénesis (Promedio \pm 1DE) en relación a los procedimientos quirúrgicos.

RESULTADOS KRUSKAL-WALLIS		
	Máximo	P
Área vascular	AES	<0.0001
VEFG	AEOS	<0.0001
FGF	AEOS	<0.0001
Fik-1	AEOS	<0.0001

Resultados U de Mann Whitney		
	U	P
Área vascular (AES) vs		
AEOS	1087	0.261
AEO	774	<0.0001
A	937	0.031
C	361	<0.0001

Resultados U de Mann Whitney		
	U	P
Inmunoexpresión VEGF (AEOS) vs		
AEO	587	<0.0001
AES	553	<0.0001
A	281	<0.0001
C	0.000	<0.0001

Resultados U de Mann Whitney		
	U	P
Inmunoexpresión FGF (AEOS) vs		
AEO	974	0.79
AES	1037	0.142
A	555	<0.0001
C	308	<0.0001

Resultados U de Mann Whitney		
	U	P
Inmunohistoquímica flk-1 (AEOS) vs		
AEO	851	<0.0001
AES	1499	0.995
A	966	0.02
C	206	<0.0001

XV. DISCUSIÓN

La cardiopatía isquémica por aterosclerosis coronaria es la forma más frecuente de enfermedad cardiovascular después de los 30 años de edad, y es la principal causa de mortalidad en el mundo, con alrededor de 11 millones de casos cada año, lo que representa el 30% del total de fallecimientos, de los cuales el 80% ocurre en países de ingresos medios y bajos;^{97, 98} esto se traduce en que en el mundo cada cuatro segundos ocurre un caso de infarto agudo del miocardio

(IAM).⁹⁹ En los Estados Unidos de Norteamérica la cardiopatía isquémica es responsable de aproximadamente 500,000 defunciones anuales.¹⁰⁰ En estudios comunitarios la mortalidad estimada a 30 días es del 30 al 50% y la mitad de los fallecimientos ocurre en las primeras dos horas, antes de su llegada al hospital.^{101,}
¹⁰² La mortalidad después de hospitalización por IAM ha disminuido cerca de 30% en los últimos 20 años, pero alrededor de uno de cada 25 pacientes que sobreviven a la hospitalización inicial, fallece en los 12 meses siguientes al infarto. La supervivencia se acorta principalmente en los ancianos mayores de 75 años, cuatro veces más, que en pacientes jóvenes. La morbilidad no se ha modificado en las últimas dos décadas, en contraste con la reducción de la mortalidad hospitalaria lograda gracias a los avances en las unidades coronarias, terapia temprana de reperfusión farmacológica y mecánica y con el uso de los nuevos agentes antitrombóticos.^{103, 104}

En México en la población de 20 a 69 años de edad hay más de 17 millones con hipertensión arterial, más de 14 millones con dislipidemia, más de seis millones con diabetes mellitus, más de 35 millones con sobrepeso u obesidad y por si fuera poco, hay más de 15 millones de personas que fuman.⁹⁹

Datos epidemiológicos de México establecen a la cardiopatía isquémica como primera causa de mortalidad en los mayores de sesenta años, segunda causa en la población general; en el año 2008 fue responsable de 50,000 defunciones y contribuyó con 10% de todas las causas de mortalidad.¹⁰⁵ La mayor incidencia de mortalidad por enfermedad coronaria se observa en grupos con alta productividad y en adultos mayores, con un claro predominio del sexo masculino. Después de los 75 años la presentación es similar para ambos sexos.⁹⁹ El impacto económico en nuestro país en el año 2008 fue de aproximadamente 14 mil millones de pesos,⁹⁹ además del desequilibrio que puede generar el fallecimiento o la incapacidad del que habitualmente es el principal proveedor en la economía familiar.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ **La mortalidad por IAM en la Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, es del 8-10% de los ingresos.**

Se puede definir a la angiogénesis como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, así en esencia, difiere de la vasculogénesis el cuál es un fenómeno embriogénico en donde, nuevos vasos sanguíneos se forman “de novo” a partir de islotes sanguíneos compuestos de células madre.¹¹⁰

La angiogénesis requiere de una serie procesada de eventos que incluye: la migración y proliferación de células endoteliales dentro y fuera de la microvasculatura original, el rompimiento de membranas basales, y finalmente la expresión controlada de enzimas proteolíticas que pueden degradar matriz extracelular, re-ensamblar nueva matriz extracelular, y formar tubos endoteliales.

Se ha observado que bajo ciertas circunstancias, un proceso angiogénico insuficiente puede ser causa por ejemplo de úlceras que no cicatrizan, o mayor extensión del infarto del miocardio, y por otro lado, muchas patologías pudieran estar complicadas por una angiogénesis no regulada como el cáncer, la retinopatía diabética, y la misma aterosclerosis.

El proceso normal de angiogénesis incluye moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas. Dentro de las moléculas angiogénicas principales que se conocen en la actualidad están: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor alfa de necrosis tumoral, factor beta de transformación del crecimiento, factor de crecimiento derivado de plaquetas y la angiogenina. También es importante señalar, que la hipoxia tisular es una de las mayores fuerzas que estimulan la angiogénesis.

El factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF o FGF-1) y FGF básico (bFGF, o FGF-2) son polipéptidos de 18 kilodaltones que actúan como mitógenos potentes para las células endoteliales y las del músculo liso. Se ha observado que estos factores tienen gran afinidad por la heparina y el sulfato de heparán.¹¹¹

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), también conocido como factor de permeabilidad vascular, es una proteína dimérica de 46 kilodaltones, mitogénica específica de células endoteliales. Cuatro especies de este factor han sido identificadas hasta el momento actual; cada monómero posee 121, 165, 189 y

206 aminoácidos respectivamente, siendo su actividad similar, pero diferentes sus perfiles de secreción.¹¹²

Desde principios y mediados de los años noventa, se han hecho esfuerzos por aumentar la respuesta angiogénica natural, aplicándola al tratamiento de la enfermedad arterial periférica y la cardiopatía isquémica avanzada. El objetivo principal, es alterar selectivamente el programa genético celular vascular. En primer lugar se identifica el gen de interés, posteriormente se introduce al huésped, el gen se transcribe y posteriormente se expresa sintetizando la molécula apropiada.

Los genes transformados pueden transferirse al huésped en varias formas. En el proceso se utilizan vectores virales y no virales. Los vectores virales más frecuentes son: retrovirus, adenovirus y herpes virus modificados. Los efectos colaterales de este tipo de vectores pueden representar riesgos para el huésped, por lo que esto ha originado otras técnicas como la inoculación directa de genes o la infusión de las propias sustancias o factores angiogénicos.¹¹³

De manera experimental, en 1994 Takeshita,¹¹⁴ utilizó VEGF-165 de manera intraarterial en un modelo de isquemia de miembro en animales, y observó un incremento de la presión arterial y de la capilaridad del miembro afectado. El mismo autor se refirió al proceso como angiogénesis terapéutica. En el mismo año, Banai y col.¹¹⁵, en un modelo animal de isquemia cardíaca, reportaron un aumento del flujo colateral y aumento de vasos intramiocárdicos utilizando VEGF-165 por vía intracoronaria.

Con base en la experimentación en animales, se ha demostrado la utilidad de los factores angiogénicos en el miocardio isquémico.¹¹⁵ Se ha experimentado hasta el momento varias rutas de administración de genes recombinantes o factores angiogénicos, a saber, intravenosa e intracoronaria, intrapericárdica, inyección intramiocárdica y endomiocárdica, utilizando técnicas de cateterismo percutáneo. En el momento actual se desconoce cuál es la vía más efectiva y segura.¹¹⁶

El primer estudio clínico Fase I en humanos fue iniciado en 1997 utilizando VEGF-165 por vía intracoronaria e intravenosa. Los pacientes incluidos fueron aquellos con enfermedad coronaria crónica avanzada y angina estable, con demostración

de áreas de miocardio viables y sin posibilidades de cirugía de revascularización coronaria y/o angioplastia coronaria. Los resultados de la investigación, estimuló la realización de un estudio Fase II (estudio VIVA) que se inició en 1998 y fue terminado de manera prematura por la ausencia de un efecto positivo de acuerdo a los objetivos de los investigadores.¹¹⁷ El estudio en sí, fue criticado por no haber sido una investigación controlada, lo que a juicio de algunos investigadores pudo influir en la ausencia de resultados.¹¹⁶

Con relación a estudios utilizando inyección intramiocárdica directa, la primera experiencia clínica fue reportada por Schumacher.¹¹⁸ En la investigación se utilizó factor de crecimiento fibroblástico recombinante, que fue inyectado directamente en el miocardio de pacientes sometidos a cirugía con puente de mamaria. La inyección se hizo de manera distal al sitio de la anastomosis. Al realizar una angiografía a estos pacientes, 12 semanas después de la cirugía, se observó un aumento de la red arterial alrededor del sitio de la inyección.

El estudio demuestra de una manera objetiva la respuesta positiva de angiogénesis con los diversos procedimientos de revascularización miocárdica indirecta, que además son aditivos a excepción (U de Mann Whitney) del uso de epiplón, que no parece ser importante en el modelo animal de revascularización miocárdica indirecta sin isquemia.

La administración de factores angiogénicos puede tener riesgos potenciales aún no bien determinados en el paciente como son, incremento de actividad tumoral en neoplasias ocultas, acelerar retinopatía preexistente, complicaciones de lesiones ateroscleróticas, así como efectos proaterogénicos.

Este tipo de modalidad terapéutica basada en angiogénesis, se está aplicando también a pacientes con enfermedad vascular periférica; así, Baumgartner¹¹⁹ utilizando un gen que codifica al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-165) inyectado directamente de manera intramuscular, demostró la eficacia del efecto angiogénico de manera angiográfica, hemodinámica, disminución del dolor, mejoramiento en la cicatrización de las úlceras, preservación de la extremidad afectada y evidencia inmunohistoquímica de proliferación de células endoteliales.

Se puede decir que el uso de genes recombinantes o de moléculas angiogénicas que aumentan el flujo colateral en las zonas isquémicas, puede representar una nueva forma de tratamiento en pacientes con enfermedad isquémica avanzada y que no son candidatos a cirugía de revascularización coronaria y/o angioplastia coronaria.

Sin embargo, hay que reconocer que aún se desconoce con certeza si la terapia angiogénica funciona en humanos, y de ser así, se ignora la mejor vía de administración de estas moléculas. Solamente estudios clínicos controlados que se están llevando a cabo, pondrán a esta novedosa y prometedora terapéutica en su sitio correcto.

Es por ello que la cirugía no solo debe apostar a realizar procedimientos menos invasivos como la revascularización miocárdica sin derivación cardiopulmonar, sino que debe apostar a la misma variable que le a dado sustento “ el tiempo “ y a evitar la revascularización miocárdica incompleta que será un fenómeno frecuente en nuestra practica si es que no incorporamos algunos otros métodos que garanticen una revascularización miocárdica integral, la cual no solo busque el incremento del flujo coronario efectivo, sino que establezca estrategias encaminadas al incremento del area vascular funcional.

La cirugía cardiaca fue la primera que estableció algunos métodos para incrementar la circulación coronaria, esta podría realizarse ya sea mediante la incorporación de nuevos vasos de origen extramiocárdicos (circulación pericardio-frenica) Beck 1934, o bien implante de epiplón, Vineberg 1968, en los que se incrementada el proceso adherencial hacia el miocardio por medio de la epicardiectomía, que al final de cuentas era parte de un proceso cicatricial en donde se encontraba involucrado el fenómeno angiogénico (formación de vasos a partir de uno ya existente). Por otro lado esta el incrementar la circulación colateral intramiocárdica la cual se logro por el mismo principio cicatrizal que involucraba el fenómeno angiogénico sino el proceso vasogénico (formación de nuevos vasos a partir de la diferenciación de otras células hacia la formación de elementos celulares que conforman los vasos tales como las células endoteliales y musculares lisas).

Es una realidad que la epidemiología de la cardiopatía isquémica esta cambiando, el número de procedimientos quirúrgicos que se realizan ha sido reducido notablemente a consecuencia del desarrollo de la cardiología intervencionista.

El número de procedimientos que realizaremos en el futuro será cada vez más reducido pero a la vez más complejos, los cuales derivara en una mayor incidencia de revascularización miocárdica incompleta. Este desarrollo de la cardiología intervencionista a derivado en el hecho que cada vez tendremos más pacientes en peores condiciones: peores lechos, o bien no lugar para colocar puentes.

¿Que pasa con los pacientes sin ninguna alternativa terapéutica? ¿Que pasa con los pacientes que ya fueron intervenidos y cuyo riesgo quirúrgico es muy alto?

El cirujano cardiovascular debe proponer alternativas que superen el tiempo libre de enfermedad y libre de re intervención.

La forma de reducir el número de re intervenciones así como el periodo libre de enfermedad puede ser lograda mediante la búsqueda de métodos de revascularización integral.

En antaño la cardiopatía isquémica se resolvía mediante métodos indirectos de revascularización coronaria los cuales buscaban la creación de circulación colateral ya sea intamiocárdica o extra miocárdica.

Los métodos de revascularización miocárdica incrementaban el reclutamiento de nuevos vasos ya sea mediante métodos fisiológicos (apertura de colaterales) o bien mediante el desencadenar un proceso de vasogénesis y angiogénesis.

Determinar las diferencias entre ambos, pero centrar la atención en el hecho que aunque los efectos fisiológicos y anatómicos son distintos tienen un punto en común (FGF y VEGF), los cuales establecen una variable de desenlace llamada área vascular.

La asociación entre los métodos de revascularización miocárdica directa con los directos evitara la revascularización incompleta, ofreciendo a los pacientes periodos más largos libres de enfermedad.

Esta propuesta quirúrgica es simple y muy fácil de realizar lo cual no provocara ningún impedimento para su incorporación en la armamentaria quirúrgica.

El concepto de la cardiopatía isquémica no solo deriva de el desequilibrio entre el aporte y consumo de oxígeno sino en la proporción entre área vascular y área miocárdica.

Este desequilibrio después del nacimiento siempre se va a presentar pues iniciamos con una proporción de 9:1, el cual se ve modificado por la aparición de otras entidades degenerativas durante la vida tales como la diabetes, y la aterosclerosis coronaria, las cuales incrementan cada vez mas la brecha entre área vascular y masa ventricular.

Consideramos que no solo es importante incrementar el flujo coronario efectivo mediante angioplastia o puentes aorta coronarios sino que es restablecer la proporción perdida entre área vascular y masa ventricular.

La mayor parte de los investigadores establecen al fenómeno vasogénico como una variable de desenlace no comprendiendo que este es una variable intermedia, y que el objetivo no es incrementar la celularidad vascular- endotelial sino incrementar el área vascular funcional a través de restablecer el proporción neta del consumo miocárdico de oxígeno.

Los investigadores debemos de comprometernos un poco más con el fenómeno antigénico, pues no debemos de establecer como variable de desenlace al incremento de la secularidad (vasogénesis) sino al incremento del área vacilar funcional, y no solo a la densidad vascular, cuya función es adecuada en el caso de la oncología pero no en el caso de la cardiología (Consumo de oxígeno dotado por esa nueva área vascular cuya función es acoplarse aún más al concepto moderno de la insuficiencia cardiaca).

Los métodos de revascularización miocárdica fueron realizados en momentos en que la medicina solo se basaba en elementos anecdóticos carentes de toda objetividad estadística, y al no tener ningún antecedente basado en evidencia es necesario repetir cada una de estas variables por separado y en conjunto para poder conocer la participación proporcional de cada maniobra al fenómeno total.

Cual es la magnitud de la asociación entre la realización de estos procedimientos con el incremento del área vascular funcional.

La metodología usada por muchos investigadores es la incorporación de la variable isquemia a todos los modelos, sin embargo consideramos que esta es una variable de confusión muy importante pues esta dependerá de la variabilidad biológica que establezca que se desencadene mas el efecto fisiológico o bien el efecto anatómico que incrementen el área vascular funcional, no sabemos si lo que estamos observando es la apertura de una colateral o bien el desarrollo de un nuevo vaso sanguíneo.

Los métodos empleados tienen la suficiente magnitud de asociación como para eliminar la isquemia que de seguro potencializara el fenómeno en su totalidad.

Debemos establecer una correlación entre las variables intermedias y la variable de desenlace, debido que debemos de establecer la manera correcta de evaluar al fenómeno vaso génico.

Los investigadores debemos además de reconocer que el efecto neo-angiogenico y angiogénico toma cierto tiempo, y que este no puede ser evaluado a tan corto plazo, debemos de esperarnos a que el proceso este bien maduro y que se trate no solo de un vaso formado (matriz extracelular no destruida) vs un vaso funcional (matriz extracelular destruida y vaso permeable).

CONCLUSIONES

1. Área vascular: el efecto máximo es epicardectomia+punción mecánica+sello de fibrina sin diferencias significativas con la maniobra completa (+ omento u epiplón). El uso de epiplón no es un factor importante en el modelo de corazón normal.

2. El factor vascular de crecimiento derivado del endotelio tiene significancia máxima a pesar de que la evaluación fue a los 45 días de Epicardectomia+punción mecánica+sello de fibrina+epiplón.

3. El Factor de crecimiento de fibroblastos solo mostró diferencias con A y C por lo que sería igual realizar Epicardectomia+punción mecánica+sello de fibrina que Epicardectomia+punción mecánica+epiplón+sello de fibrina, datos que coinciden con los resultados en el área vascular.

4. El flk-1 hay diferencias con todos los grupos, pero sin diferencias con la presencia de epiplón, lo que sustenta que el epiplón no es un factor significativo en el modelo de corazón normal.

5. La angiogénesis es una información valiosa en el modelo de corazón normal. Se debe de incluir a la isquemia en proyectos futuros para amplificar el efecto.

6. Se demuestra en este estudio que si hay interacción entre los métodos de revascularización miocárdica indirecta obteniendo los mismos beneficios con el uso de epicardectomia+punción mecánica+sello de fibrina, lo cual facilita técnicamente el procedimiento sin disminuir el efecto angiogénico además de reducir el proceso adherencial.

7.- Celulas cebadas ¿??

7. Se demuestra que la **revascularización miocárdica indirecta** si tiene un peso especifico dentro de la revascularización miocárdica integral con un impacto real en el costo-beneficio y el costo-efectividad.

XVI. BIBLIOGRAFIA

1. Serrano-Sánchez JA. Epidemiología de la cardiopatía isquémica: En Cardiopatía isquémica. Madrid: ENE ediciones.1999. p.13-71.
2. Braunwald E. Chronic coronary artery disease. En: Heart Disease, a textbook of cardiovascular medicine. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders Company;1997.p. 1316.
3. www.ssa.gob.mx
4. Buxton B, Frazer OH, Westaby S. The Decision- Making Process: en Ischemic Heart Disease, Surgical Management. London: MOSBY; 1999.p.39-57.
5. Favaloro R, Effler D. History. In Surgical Treatment of coronary arterioesclerosis. Baltimore:Williams and Williams;1970.p.1-10.
6. Sabiston D. The coronary circulation. en: Surgery of the chest. 5th edition. Philadelphia: W.B. Saunders; 1990. Vol. II.p.1654-61.
7. Fernandez-Santander SM. La circulación colateral coronaria en la cardiopatía isquémica. Mexico: Editorial Panamericana;1997.
8. Cooley D, Frazer OH, Kadipasaoglu K, Lindenmeir M, Pehlivanoglu S, Wolff J, Wilansky S, Moore W. Transmyocardial laser revascularization.Clinical experience with twelve month follow up. J Thorac Cardiovasc Surg. 1996: 111: 791-9.

9. Petiti I, Guinovart M, Rig I, Vilallonga J. Introducción histórica y justificación: En: Arterias coronarias. Aspectos anatómo-clínicos. Barcelona: Masson-Salvat; 1993.
10. Kirklin J, Barratt-Boyes B. Stenotic arteriosclerotic coronary artery disease. In Cardiac Surgery. Churchill Livingstone. 1993 Vol 1 pp 286
11. Sen PK, Udwadia TE, Kinare SG, Parulkar GB. Transmyocardial acupuncture. A new approach to myocardial revascularization. J Thorac Cardiovasc Surg. 1965; 50:2: 181.
12. Hammond G, Provan J, Austen GW. Experimental evaluation of myocardial revascularization procedures. Ann Surg. 1966; 164; 951-8.
13. Mack MJ. Advances in the treatment of coronary artery disease. Ann Thorac Surg. 2003; 76(Suppl.):S2240-5.
14. Kohmoto T, Argenzino M, Yamamoto N, Vliet K, Gu A, De Rosa C, Fisher P, Spotnitz H, Burkhoff D, Smith C. Assessment of transmyocardial perfusion in alligator hearts. Circulation. 1997; 95: 1585-91.
15. Tsang J, J-Chiu R. The Phantom of myocardial sinusoids. A historical reappraisal. Ann Thorac Surg. 1995; 60: 1831-5.
16. Ruel M, Laham RJ, Parker JA, et al. Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002; 124: 28-34..
17. Pifarré R, Jasuja ML, Lynch R, Neville W. Myocardial revascularization by transmyocardial acupuncture. A physiological impossibility. J Thorac Cardiovasc Surg. 1969; 58: 424-31.
18. Horvath K, Cohn L, Cooley D, Crew J, Frazier OH, Griffith B, Kadipasaoglu K, Lansing A, Mannting F, March R, Mirhoseini M, Smith C. Transmyocardial laser revascularization: results of multicenter trial with transmyocardial laser revascularization used as sole therapy for end-stage coronary artery disease. J Thorac Cardiovasc Surg. 1997; 113: 645-54.
19. Frazier OH, Cooley D, Kadipasaoglu KA, Pehlivanoglu S, Lindenmeir M, Barasch E, Congeer JL, Wilansky S, Moore WH. Myocardial revascularization with laser. Preliminary findings. Circulation. 1995; 92(sup II): 58-65.

20. Yano O, Bielefeld M, Jeevanandam V, Treat M, Marboe C, Spotnitz H, Smith C. Prevention of acute regional ischemia with endocardial laser channels. *Ann Thorac Surg.* 1993; 56: 46-53.
21. Fleischer KJ, Goldschmidt-Clermont PJ, Fonger JD, Hruban RH, Baumgartner WA. One month histological response of transmural laser channels with molecular intervention. *Ann Thorac Surg.* 1996; 62(2): 1051-8.
22. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors. *Circulation.* 1998; 97:645-50.
23. Isner J, Feldman L. Gene therapy for arterial disease. *Lancet.* 1994; 344: 1653-4.
24. Folkman J. Angiogenic therapy of the human heart. *Circulation.* 1998; 97(7): 628-9.
25. Wetherford DA, Sackman JE, Freeman MB, Stevens SL, Goldman MH. Vascular endothelial growth factor and heparin in a biologic glue promotes human aortic endothelial cell proliferation with aortic smooth muscle cell inhibition. *Surgery.* 1996; 120(2): 433-9.
26. Selke FW, Wang SY, Friedman M, Harada K, Grossman W, Simons M. Basic FGF enhances endothelium-dependent relaxation of the collateral perfused coronary microcirculation. *Am J Physiol.* 1994; 267: (4 pt/2): H1303-11.
27. Olech VM, Keshavjee SH, Chamberlain DW, Slutsky AS, Patterson GA. Role of basic fibroblast growth factor in revascularization of rabbit tracheal autografts. *Ann Thorac Surg.* 1991; 52: 258-64.
28. Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kamijo T, Kurashima C, Ito H. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science.* 1992; 257: 1401-3.
29. Shou M, Thirumurti V, Rajanayagam S, Lazarous D, Hodge E, Stiber J, Petiford M, Elliot E, Shah S, Unger E. Effects of basic fibroblast growth factor on myocardial angiogenesis in dogs with mature collateral vessels. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 29: 1102-6.

30. Lazarous D, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou A, Stiber J, Lobo A, Hunsberger S, Guetta E, Epstein S, Unger E. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation*. 1996; 94: 1074-82.
31. Burkhoff D, Fisher P, Apfelbaum M, Kohmoto T, De Rosa C, Smith C. Histologic appearance of transmural laser channels after 4 1/2 weeks. *Ann Thorac Surg*. 1996; 61: 1532-5.
32. Lee LY, Rosengart TK. Transmural laser revascularization and angiogenesis: the potential for therapeutic benefit. *Semin Thorac Cardiovascular Surg*. 1999; 11(1): 29-35.
33. Chu V, Giad A, Kuang J-Q, McGinn, Li C, Pelletier M, Chiu R. Angiogenesis in transmural revascularization: Comparison of Laser vs mechanical puncture. *Ann Thorac Surg*. 1999; 68: 301-8.
34. Horvath K, Belkind N, Wu I, Green R, Doukas J, Lomasney J, McPherson D, Fullerton D. *Ann Thorac Surg*. 2001; 72: 1997-2002.
35. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leumgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*. 1989; 84(5): 1479-8.
36. Wakabashi Y, Isono T, Hori S, Matsushima K, Ono M, Kuwano M. Dual pathways of tubular morphogenesis of vascular endothelial cells by human glioma cells: vascular endothelial growth factor/basic fibroblast growth factor and interleukin-8. *Jpn J Cancer Res*. 1995; 86(12): 1189-67.
37. Flamme I, Isau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 1992; 116: 435-39.
38. Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: Two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool*. 1989; 251(2): 224-31.
39. Gajdusek C, Dicorleto P, Ross R, Schwartz SM. An endothelial cell derived growth factor. *J Cell Biol*. 1980; 85(2): 467-72.

40. Schaper W, Sharma H, Quinkler W, Markert T, Wunsh M, Sharper J. Molecular biologic concept of coronary anastomosis. *J Am Coll Cardiol.* 1990; 15: 513-8.
41. Schneider M, Parker T. Cardiac myocytes as targets for action of peptide growth factor. *Circulation.* 1989; 80: 219-33.
42. Guzmán-González R, Careaga-Reyna G, Cardoza-Pacheco H, Argüero-Sánchez R. Resultados de la revascularización miocárdica sin derivación cardiopulmonar en pacientes femeninas. *Cir Ciruj.* 2008; 76: 29-36.
43. Luscher TF. Endothelium in the control of vascular tone and growth; role of local mediators and mechanical forces. *Blood Press.* 1994; 1(Suppl): 18-22.
44. Sasaki H, Hoshi H, Man Hong Y, Suzuki T, Kato T, Sasaki H, Saito M, Youki H, Karube K, Onodera M, Saito T, Aoyagi S. Purification of acid fibroblast growth factor bovine heart and its localization in the cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1989; 264(29): 17606-12.
45. Tsopanoglou N, Maragoudakis M. On the mechanism of trombin-induced angiogenesis. *J Biol Chem.* 1999; 274(34): 23969-76.
46. Goldsmith H, Griffith A, Kupferman A, Catsimpoalas N. Lipid angiogenic factor from omentum. *JAMA.* 1984; 252(5): 2034-6.
47. Goldsmith H. Trasplantation of adrenal medulla and omentum to the putamen *Neurosurgery.* 1991; 29(2): 319-22.
48. Rafael H. El epiplón. *Transplante al sistema nervioso.* México: Editorial Prado; 1996. p.9-12.
49. Rafael H, Durán M, Méndez J, Rubio F. Trasplante de epiplón sobre el miocardio. Un estudio experimental en perros. *Rev Mex Cardiol.* 2000; 11(4): 301-3.
50. Yamamoto N, Kohmoto T, Gu A, De Rosa C, Smith CR, Burkhoff D. Angiogenesis is enhanced in ischemic canine myocardium by transmural laser revascularization. *J. Am Coll Cardiol.* 1998; 31(6): 1426-33.
51. Mack MJ, Brown PP, Kugelmass AD, Battaglia SL, Tarkington LG, Simon AW et al. Current status and outcomes of coronary revascularization 1999 to 2002: 148,396 surgical and percutaneous procedures. *Ann Thorac Surg.* 2004; 77:761-6.

52. Kardami E, Fandrich R. Basic Fibroblast growth factor in atria and ventricle of the vertebrate heart. *J Cell Biol.* 1989;109: 1865-75.
53. Kardami E. Stimulation and inhibition of cardiac myocyte proliferation in vitro. *Mol Cell Biochem.* 1990; 92(2):129-35.
54. Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide mediated decrease in protein kinase c delta activity. *Circ Res.* 1999; 85(3): 247-56.
55. Speir E, Tanner V, Gonzalez AM, Farris J, Baird A, Casscells W. Acidic basic fibroblast growth factors in adult rat heart myocytes. Localization, regulation in culture, and effects on DNA synthesis. *Circ Res.* 1992; 71(2): 251-9.
56. Horvath K, Chiu E, Maun D, Lomasney J, Greene R, Pearce W, Fullerton D. Up regulation of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis after transmyocardial laser revascularization. *Ann Thorac Surg.* 1999; 68: 825-9.
57. Thompson JA, Anderson KD, Di Pietro J, Zwibel J, Zametta W, Anderson F, Macig T. Site directed neovessel formation in vivo. *Science.* 1988; 241: 1349-52.
58. Casscells W, Speir E, Klagsbrun JM, Calvo L, Chiba M, Haggroth L, Folkman J. Isolation characterization, and location of heparin-binding growth factor in the heart. *J Clin Invest.* 1990; 85(2): 433-42.
59. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; 246: 1306-9.
60. Bruce A, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. Células diferenciadas y formación de tejidos. En: Bruce A, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Biología molecular de la célula.* 23^a ed. Barcelona: Editorial Omega;1983.p.959.
61. Ham AW. Orígenes, morfología y funciones de las células del tejido conectivo laxo En: Ham AW, editor. *Tratado de Histología.* 8^a ed. México: Ed. Interamericana; 1987.p.251-2.

62. Kadami E, Liu L, Doble BW. Basic fibroblast growth factor in cultured cardiac myocytes. *Ann NY Acad Sci.* 1991; 638: 244-55.
63. Speir E, Zhuo YF, Lee M, Shrivastav S, Casscells W. Fibroblast growth factors are present in adult cardiac myocytes, in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 59(3): 1336-40.
64. Sumita E. Cultured myocardial cell growth and hypertrophy by basic fibroblast growth factor. *Kokyu To Junkan.* 1993; 41(8): 779-85.
64. Ross C, Hale C. Detection of the basic fibroblast growth factor low affinity binding site in cardiac sarcolemmal vesicles. *Life Sciences.* 1990; 46: 1810-5.
65. Kardami E, Stoski RM, Doble BW, Yamamoto T, Hertzberg EL, Nagy JI. Biochemical and ultrastructural evidence for the association of basic fibroblast growth factor with cardiac gap junctions. *J Biol Chem.* 1991; 266(29): 19551-7.
66. Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. Acid fibroblast growth factor and heart development. Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. *Circ Res.* 1993; 71(1): 7-19.
67. Ross CR, Kubinak S, Hale CC. Purification of a basic fibroblast growth factor-binding proteoglycan from bovine cardiac plasma membrane. *Biochem Biophys Acta.* 1993; 1145 (2): 219-26.
68. Topol EJ. Current status and future prospects for acute myocardial infarction therapy. *Circulation.* 2003;108(Suppl.3):S6-13.
69. Schaper W. Angiogenesis in the adult. *Heart Basic Res Cardiol.* 1991; 86 Suppl. 2: S51-6.
70. Kohmoto T, DeRosa C, Yamamoto N, Fisher P, Failey P, Smith C, Burkhoff D. Evidence of vascular growth associated with laser treatment of normal canine myocardium. *Ann Thorac Surg.* 1998; 65:1360-7.
71. Risau W, Sariola H, Gunter Zerwes H, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman R. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem cells derived embryoid bodies. *Development.* 1988; 102: 471-78.
72. Careaga-Reyna G, Martínez-Carballo G, Villanueva-Rustrián F, Argüero-Sánchez R. Cirugía de revascularización miocárdica en pacientes con síndrome coronario agudo. Análisis de resultados. *Cir Cir.* 2006; 74:315-20.

73. Sierra D. Fibrin sealant adhesive systems: A review of their chemistry, material properties and clinical applications. *J Biomaterial Appl.* 1993; 7: 309-52.
74. Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, Ewy GA, Fonger J, Gardner TJ et al. ACC/AHA Guidelines for coronary artery bypass graft surgery. A report from surgery from the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines for Coronary Artery Bypass surgery. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34:1262-347.
75. Weistein R, Wene K. Growth factor responses of human arterial endothelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1986; 22(9): 549-56.
76. Carroll S, White FC, Roth DA, Bloor C. Heparin accelerates coronary collateral development in a porcine model of coronary artery occlusion. *Circulation.* 1993; 88:198-207.
77. Bombarni T, Picano E. The coronary angiogenic effect of heparin: an experimental basis and clinical evidence. *Angiology.* 1997; 48(11): 969-76.
78. Nicosia RF, Tchao R, Leighton J. Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture. *Cancer Res.* 1983; 43(5): 2159-66.
79. Fisher P, Knomoto T, De Rosa C, Sponitz H, Smith C, Burkhoff D. Histologic analysis of transmural channels; comparison on CO₂ and Holmium: YAG lasers. *Ann Thorac Surg.* 1997; 64: 466-72.
80. Jaffe EA, Morsher DF. Synthesis of Fibronectin by cultured human endothelial cells. *J Exp Med.* 1978; 147(6):1779-91.
81. Lichtenbeld HH, Muller AD, van Dam-Mieras MC, Blijham GH. Tumor spheroid induced vesicle formation on endothelial cells is associated with procoagulant properties. *J Cell Sci.* 1993;106(Pt 2): 657-62.
82. Cederholm-Williams SA. Fibrin glue. *Br Med J.* 1994; 308(6943): 1570.
83. Arnaud E, Morieux C, Wybier M, Vernejoul MC. Osteogenesis induced by the combination of growth factor, fibrin glue and coral: towards a substitute of autologous bone graft. An experimental study on the rabbit. *Ann Chir Plast Esthet.* 1994; 39(4): 491-8.
84. Silver FH, Wang MCh, Pins GD. Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials.* 1995; 16: 891-903.

85. Nabeshima Y, Yoshiya S, Mizuno K. Effect of fibrin glue and endothelial growth factor on the early healing response of the transplanted allogenic meniscus: a pilot study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1995; 3(1):34-8.
86. Wilensky RL, Hamamdzcic D. The molecular basis of vulnerable plaque: potential therapeutic role for immunomodulation. *Curr Opin Cardiol.* 2007; 22: 545-51.
87. Fasol R, Shumacher B, Schlaudraff K, Hauenstein KH, Seitelberger R. Experimental use of an modified fibrin glue to induce site directed angiogenesis from the aorta to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 107(6):1432-9.
88. Chekov V, Nikolaychik V, Tchekanov The use of biologic glue for better adhesions between skeletal muscle flap and the myocardium. *J Thorac Cardiovas Surg.* 1996; 111(3): 678-80.
89. Santillan-Doherty P, Jasso R, Gaxiola M, Villalba J. Protección de la anastomosis bronquial con colgajo de omento en el trasplante pulmonar unilateral. *Rev Invest Clin.* 1989; 41: 117-22.
90. Quigley RL, Perkins JA, Gottner RJ, Curran RD, Kuehn BE, Hoff WJ, Wallock ME, Arentzen CE, Alexander JC. Intraoperative procurement of autologous fibrin glue. *Ann Thorac Surg.* 1993; 56(2):387-9.
91. Luttun A, Carmeliet P. Angiogenesis and lymphangiogenesis: highlights of the past year. *Curr Opin Hematol.* 2004; 11: 262-71.
92. Kaltner H, Stierstorfer B. Animal Lectins as cell adhesion molecules. *Acta Anat.* 1998; 161:162-79.
93. Poulsen S. Determining causation in epidemiology. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999; 27:161-70.
94. Garduño EJ, Fajardo GA, Uriostegui MC, Martínez GMC. Causalidad: Puente entre la medicina y la filosofía de la ciencia. *Ciencia y Desarrollo.* 1997; 18:(105): 42-51.
95. Dawson-Saunders B, Trapp R. Comparacion de tres o más medias. En: Dawson-Saunders B, Trapp R. *Bioestadística médica.* 2^a ed. México: Manual Moderno; 1999. p.159-67.

96. Hair J, Anderson RE, Tatham R, Black W. Análisis factorial. En: Hair J, Anderson RE, Tatham R, Black W. Análisis multivariante. 5^a ed. Madrid: Prentice Hall; 1999.p.79-121.
97. WHO Cardiovascular disease. En: <http://www.who.int>.
98. Dimmeler S, Mann DL, Zeiher AM. Emerging therapies and strategies in the treatment of heart failure. En: Libby: Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. 8^a ed. Philadelphia: WB Saunders; 2007.p.697-705.
99. Rosas-Peralta M, Attie F. Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y del mundo. Arch Cardiol Mex. 2007; 77: 91-3.
100. García-Castillo A, Sánchez-Díaz CJ, Martínez-Sánchez C, Llamas-Esperón G, Cardona E, Barragán R, González-Camid F, Sahagún G, Treviño AJ. Guías clínicas para el manejo del infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST. Arch Inst Cardiol Mex. 2006; 76(Supl. 3): S12-120.
101. Buda AJ. The role of echocardiography in the evaluation of mechanical complications of acute myocardial infarction. Circulation. 1991; 84(Suppl. I): S109-21.
102. Hasai D, Begar S, Wallentin L, Danchin N, Gitt AK, Boersma, et al.: A prospective survey of the characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndromes in Europe and the Mediterranean basin. The Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes. Eur Heart J. 2002; 15: 1190-201.
103. Armstrong A, Duncan B, Oliver MF, Julian DG, Donald KW, Fulton et al: Natural history of acute coronary attacks. A community study. Br Heart J. 1972; 34: 67-80.
104. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruko-Koski E, Amouyel P, for the WHO MONICA Project: Contribution of trends of survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. Lancet. 1999; 353: 1547-57.

105. Grupo Cooperativo RENASICA. Sociedad Mexicana de Cardiología: El Registro Nacional de los Síndromes Isquémicos Coronarios Agudos (RENASICA I). Arch Cardiol Méx. 2002; 72(Supl.1): S45-64.
106. García-Castillo A, Sánchez-Díaz CJ, Martínez BP, Azpiri-López JR, Autrey CA, Martínez-Sánchez C, Ramos CMA, LLamas G, Martínez SJ .RENASICA II. A Mexican registry of acute coronary syndromes. Arch Cardiol Mex. 2005; 75: S18-30.
107. Manson JE. The primary prevention of myocardial infarction. N Engl J Med. 1992; 326: 1406-16.
108. Braunwald E, Antman EM. Evidence based coronary care. Ann Intern Med. 1997; 126, 551-3.
109. Hunink MG. The recent decline in mortality from coronary heart disease, 1980-1990. The effect of secular trends in risk factors and treatment. JAMA. 1997; 277: 535-42.
110. Engler D. Angiogenesis. Circulation. 1996; 94:1496-8.
111. Selke FW, Jianyi L, Stamler A. Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia. Surgery. 1996; 120: 182-8.
112. Ashahara T, Bauters C, Zheng LP. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. Circulation. 1995; 92(Suppl.2): S365-71.
113. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 1992; 267: 1031-4.
114. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M y col. Therapeutic angiogenesis a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. J Clin Invest. 1994;93: 662-70.
115. Banai S, Jaklitsch MT, Schou M, Lazarous DF y col. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. Circulation. 1994; 89: 2183-9.
116. Peña-Duque MA. Angiogénesis. Arch Cardiol Mex. 2001; 71(Supl.1): S136-8.

117. Kornowski R, Fuchs S, Leon M, Epstein S. Delivery strategies to active therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation*. 2000; 101: 454-8.
118. Henry TD, Annex BH, Azrin MA, Mckendall GR, Willerson JT y col. Double blind, placebo, controlled trial of recombinant human vascular endothelial growth factor: the VIVA trial. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 33(suppl A): 384A.
119. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JI. Constitutive expression of ph VEGF 165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998; 97: 1114-23.

XVII. ANEXOS

ANEXO 1. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

MESES /AÑO	ACTIVIDAD
-------------------	------------------

Junio – Julio 2000	Protocolo 1era presentación 2da presentación: <ul style="list-style-type: none"> • Demostrar factibilidad • Normar diseño
Julio 2000- Enero 2001	Calculo de muestra 3era presentación : Avances y estrategias
Febrero 2001. Julio 2001	Completar grupos del diseño factorial
Julio a Diciembre 2001	Patología Morfometría computarizada
Enero a Marzo- 2002	Análisis estadístico. Conclusiones Preparación escrito de Tesis

ANEXO 2. DEFINICION OPERACIONAL DE LAS VARIABLES

VI.DEFINICIÓN OPERATIVA DE LAS VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE (EFECTO)

1. Proporción del área vascular efectiva y/o densidad vascular.

Definición conceptual: Se refiere al porcentaje de área vascular en relación al 100% del campo microscópico a 400x, el cual representa 17,624 μ .

Descripción operativa: La proporción normal de área vascular es del 10%, en relación a un 90% de masa ventricular.

Escala cuantitativa: Numérica (porcentaje)

VARIABLES INTERMEDIAS (EFECTO INTERMEDIO)

Proporción (%) de la reacción inmuno-específica.: Área bajo la curva de la expresión inmunohistoquímica de: Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos, flk-1 y factor VIII.

a) Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio

Descripción conceptual: Factor de crecimiento vascular, que participa predominantemente en las etapas iniciales del proceso neo-angiogénico y que determina la proliferación, migración y diferenciación celular.

Descripción operativa: Existe una correlación entre el grado de expresión y la magnitud del proceso neo-angiogénico.

Escala cuantitativa: Subjetiva: numérica: # de células que expresan en su superficie el factor.

Objetiva: Morfometría computarizada: Medida en escala ordinal (nula, leve, moderada y severa) eliminando tejido conectivo y núcleos celulares. Se transforma dicha medición integrando cada escala a una curva, expresada numérica en forma porcentual.

b) Factor de crecimiento de fibroblastos

Descripción conceptual: Factor de crecimiento vascular que participa en las etapas finales del proceso neo-angiogénico. Interviene en el proceso de maduración del primordio vascular y es capaz de provocar fisiológicamente la apertura de vasos colaterales.

Descripción operativa: Igual que el Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, pero se espera que los niveles de factor de crecimiento de fibroblastos sean mucho más altos debido a que la etapa de evaluación es tardía para una rata.

Escala cuantitativa: La misma que el Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio.

c) flk-1

Descripción conceptual: Receptor de tirosina para permitir la actividad del Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos y trombina. Su expresión denota el efecto real, pues se expresa en ambas etapas del proceso neo-angiogénico.

Descripción operativa: Igual al Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio y factor de crecimiento de fibroblastos, se esperan niveles más elevados, es posible que prediga mejor el efecto neo-angiogénico asociado al proceso lesivo. Su expresión no solo denota la participación del Factor vascular de

crecimiento derivado del endotelio y factor de crecimiento de fibroblastos intramiocárdico sino también el extra-miocárdico (Epiplón).

Escala cuantitativa: Numérica, (%) igual que Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio y factor de crecimiento de fibroblastos.

VARIABLE INDEPENDIENTE (CAUSA)

Epicardiectomía

Descripción conceptual: Participa como parte del proceso lesivo, el cual estimula la producción del factor vascular de crecimiento derivado del endotelio y factor de crecimiento de fibroblastos. Permite la interacción de la superficie del miocardio con el sello de fibrina y el epiplón, exponiendo los vasos epicárdicos.

Descripción operacional: Se medirá la presencia de la misma y su participación al efecto lesivo. Se realizan cinco abrasiones con lima de uñas sobre el epicardio del ápex ventricular.

Escala cualitativa: (Nominal). Presencia /Ausencia

Punción mecánica

Descripción conceptual: De ninguna forma busca el emular los corazones de reptiles, con la formación de canales transmucocárdicos, sino que funciona como otro factor lesivo, para la liberación de los factores de crecimiento y crear un trombo transmural.

Descripción operacional: 10 punciones en el ápex ventricular (área de mayor espesor ventricular). Se medirá la presencia y/o ausencia de la misma y la participación sinérgica de la misma al proceso lesivo.

Escala cualitativa: (Nominal) Presencia/Ausencia.

Sello de Fibrina

Descripción conceptual: Participa de dos formas : Indirecta: Matriz extracelular artificial. Directa: Trombina; Estimula a flk-1 Integrinas. Favorecen el proceso de adhesión, migración e integración del primordio vascular.

Descripción operativa: 2 gotas aplicadas sobre la superficie ventricular.

Escala cuantitativa: (Nominal) Presencia/Ausencia

Epiplón

Descripción conceptual: Es un donador natural y continuo de factores de crecimiento (factor de crecimiento de fibroblastos y Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio). Fuente extra-miocárdica.

Descripción operacional: La presencia del epiplón sinergizará el efecto angiogénico.

Escala cualitativa: (Nominal) Presencia/ Ausencia.

VARIABLES DE CONFUSION:

Manipulación cardiaca e Isquemia.

Isquemia eliminada del modelo pues no se puede controlar la magnitud de sus efectos.

Manipulación cardiaca

Descripción conceptual: La solo manipulación cardiaca podría causar una lesión sobre el corazón que en consecuencia exprese los factores de crecimiento vascular.

Descripción operacional: Controlada con el Control operado (Sham) con sello y sin sello y el Control no operado. Se toca el corazón. Directamente con dedo con guante.

Escala cualitativa: nominal Presencia/ ausencia.

Anexo 3. DISEÑO EXPERIMENTAL EXPLICATIVO.

Objetivo primordial:

1. Demostrar el **efecto aditivo** de la conjunción de los métodos de RVMl en asociación con un sello de fibrina.
2. Establecer una **correlación** entre las variables causales intermedias y el efecto final, en la medida de sentar los **argumentos causales** sólidos que expliquen la magnitud del efecto final: densidad.
3. **Eliminar la isquemia del modelo causal.**

DISEÑO FACTORIAL FRACCIONADO YATES 4 x 3

El efecto aditivo se evalúa en el primer nivel factorial, mientras que el segundo nivel factorial se evalúa el efecto del sello de fibrina, pues sus efectos son tanto directos como indirectos. Se integra entonces un diseño factorial de dos niveles,

con cuatro variantes de manipulación quirúrgica. Los grupo control se toman como elementos separados del diseño factorial.

EPICARDIECTOMÍA (E)	PUNCIÓN MECANICA (PM)	E + PM	E + PM + EPIPLON (EP)
E + Sello de Fibrina (SF)	PM + SF	E + PM + SF	E + PM + EP + SF
Control sin SF	Control sin SF	Control no operado (Sham)	

CRITERIOS DE CALIDAD METODOLOGICA

Debe de reunirse tanto los criterios de causalidad como los elementos de rigor del modelo. Modelo experimental y dado a que su aplicación es terapéutica deben reunirse los criterios de:

Para causalidad:

1. Selección de modelo: experimental
2. Pruebas diagnósticas para causalidad:

Variables intermedias: Inmunohistoquímica del factor de crecimiento de fibroblastos, Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio y flk-1.

Análisis subjetivo: Numérico. # de células que expresan el antígeno.

Análisis Objetivo: Morfometría computarizada: Ordinal:(leve, moderada, severa, nula) elevada a numérica mediante la expresión porcentual.

La inmunohistoquímica es un método validado como la más alta especificidad y sensibilidad.

3. Análisis prospectivo.
4. Asociación sólida: Magnitud de las diferencias de los resultados.
5. Asociación consistente: Varios investigadores han demostrado esta asociación, sin embargo no se ha documentado el posible efecto aditivo de la maniobra.
6. Gradiente dosis respuesta: Mostrado por la aditividad del proceso quirúrgico. (sinergismo)
7. Relación temporal: Tiempo cero: procedimiento quirúrgico.
Tiempo para la evaluación: 45 días. Se busca la madurez del proceso, en función de alcanzar mayor rigor al estudio.
8. Asociación con sentido: Existen algunos otros intentos de asociación con éxito.

9. Asociación específica: El estudio de cada factor por separado y conjunto dota la especificidad del proyecto.
10. Fuerza de asociación: Coincidencia entre la causa y el efecto: correlación entre las variables intermedias (Factor vascular de crecimiento derivado del endotelio, factor de crecimiento de fibroblastos, flk-1) y el efecto final (densidad vascular).
11. Consistencia: Existe la suficiente consistencia temporal, geográfica.
12. Plausibilidad biológica: El modelo murino otorga la suficiente información que relaciona la causa con el efecto. En segundo lugar la ausencia de isquemia permite explorar los efectos netos de cada factor.
13. Coherencia: Aunque existe todavía controversia en relación a la causa y el efecto, esto justifica la aportación al conocimiento.
14. Prueba experimental: modelo experimental. (Requiere realizarse en modelos animales por motivos éticos).
15. Analogía: suficiente para establecer una inferencia estadística.
16. Rendimiento predictivo: este último criterio de Susser permite establecer que la medición de la variable intermedia predice el efecto final.

Fue necesario someter esta prueba experimental al mayor rigor metodológico, debido a que los argumentos causales descritos en la literatura, no establecen la falsabilidad de la prueba causal, por lo que se recurre predominantemente al criterio Popperiano de predicción por medio de la correlación y al criterio de prueba para sustentar las observaciones empíricas desarrolladas en la literatura. Se recurre a los criterios de Lannes, mediante la eliminación de los sesgos (isquemia), para determinar la magnitud de la asociación, reduciendo la posibilidad o probabilidad de error.

Para experimentos:

1. Diseño entre grupos: 10 grupos con manipulación y un grupo control.
2. Aleatorización: ratas del mismo peso y las mismas características (probabilística).
3. Ceguedad.

4. Medición de las variables básicas: grupos control. Control de la variable manipulación: Sham quirúrgico

5. Mediciones de variable de desenlace: Variables intermedias (factor de crecimiento de fibroblastos, Factor Vascular de crecimiento derivado del endotelio y flk-1). Variable final. Densidad Vascular.

Medición objetiva: Morfometría computarizada y aplicada por el patólogo a ciegas. Exactitud y precisión. Asignación mediante clasificación numérica de las muestras.

6. Homogenización de la Intervención: 10 punciones, 5 abrasiones, 2 gotas de sello, 1 injerto de epiplón.

7. Elección de tratamiento experimental: Se realizaron las maniobras quirúrgicas de manera aleatoria, y completando grupos, y haciendo que el patólogo asignara numéricamente cada espécimen.

8. Análisis de resultados por grupos.

Para tratamientos útiles: (Justificación)

Contemplado en el análisis y discusión (justificación)

1. **Asignación aleatoria probabilística** .

2. Evidencia biológica del beneficio: área vascular funcional.

3. Identificabilidad y similitud.

4. Significancia estadística: magnitud del efecto.

5. Utilizables a la práctica clínica: significancia estadística vs. Clínica. (Justificación). La maniobra es clínica y biológicamente razonable.

Anexo 4. TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño de la muestra en los estudios factoriales esta determinado por:

1) Niveles de potencia: 0.80

2) Nivel de significación: <0.05

3) Efecto tamaño. = >12% del Incremento del área vascular modificando la proporción de 9:1 a 7:3, expresado en proporciones como 90% vs. 10% a 70 vs. 30% de área vascular efectiva.

El nivel de significación se denota por las cargas factoriales, las cuales a su vez están determinadas por el factor o variable y el numero de observaciones. De tal

forma que la carga factorial es la correlación entre la carga factorial y el tamaño de la muestra. El tamaño de la muestra no solo se implica por el número de elementos de cada grupo, sino por el número de observaciones por grupo.

En el presente estudio se obtuvieron 11 grupos, de los cuales hubieron 10 variaciones de la manipulación y un control no operado. Por lo tanto se operaron 55 ratas, de las cuales se realizan 10 observaciones por espécimen, siendo un total de 550, para el cual se alcanza una potencia de 0.8, con una significancia <0.05 , por lo que solo se necesitan 50 observaciones. Otra recomendación es tener 10 observaciones por factor: 40 observaciones. De tal forma que se supera el número de observaciones necesarias.

ANEXO 5. CONTENIDO DEL SELLO DE FIBRINA HUMANO

FRASCO 1

Componente biológico activo	P/mL
Fibrinógeno humano	50mg
Cloruro de sodio	6.4mg
Citrato de sodio	2.7mg
Glicina	8.2mg
Cloruro de Calcio	0.1mg
Acido Transexámico	92mg
Hidrocloruro de Arginina	18mg
Proteínas totales	85mg

FRASCO 2

Trombina humana	1000 UI
Cloruro de sodio	5.6 mg
Acetato de sodio trihidratado	2.7 mg
Cloruro de Calcio	5.9 mg
Manitol	20 mg
Albúmina humana	3-15 mg

Proteínas totales	20 mg
-------------------	-------

METODOS DE ELIMINACION VIRAL

Componente biológico activo.

Solvente detergente TNBP 1%, Triton X-100 por 4 horas.

Pasteurización : 10 horas a 60 grados Centígrados.

Trombina Solventes detergentes (TNBP 1% Y Triton X-100) Ultrafiltración

ANEXO 6. INMUNOHISTOQUIMICA

1. Los métodos inmuno-histológicos que se aplican se basan en la reacción de Peroxidasa, la cual permite marcar con estreptavidina-biotina (LSAB), especialmente para tejidos que se encuentran en parafina.

2. El equipo que se empleo es manufacturado por Santa Cruz Biotechnology Inc.

3. Visualización de antígeno-específico celular de VEGF, FGF y flk-1.

La sensibilidad se ve incrementada cuando este se utiliza de manera indirecta en conjunción con un método enzimático, fijando el antígeno primario y subsecuentemente la peroxidasa y la anti-peroxidasa (PAP) se aplican tres pasos :

1. Aplicación del antígeno primario, 2. Fijación al anticuerpo y 3. PAP. La afinidad de avidina por biotina produce un complejo (ABC), el cual posee la máxima sensibilidad y especificidad de los métodos histológicos habituales.

Se realiza un **control positivo**: Para vasos con ganglio linfático

VEGF: Tumor sólido de mama: ductal infiltrante.

FGF: Tumor sólido de mama :ductal infiltrante.

Flk-1: Fibrosarcoma.

Control negativo: Se elimina el antígeno primario.

1. PEROXIDO DE HIDROGENO.

Eliminar el exceso de agua alrededor del espécimen.

Aplicar peroxido de hidrogeno al 3%.

Incubación por 5 minutos.

Lavar suavemente el tejido con solución.

2. FIJACIÓN DEL ANTIGENO PRIMARIO Y DESARROLLO DEL CONTROL NEGATIVO.

Eliminar el exceso de buffer.

Aplicar el antígeno primario.

Incubar por 30 minutos.

Lavar nuevamente el tejido con solución.

3. UNION

Eliminar el exceso de buffer

Aplicación de gota amarilla (amplificación de anticuerpo) cubriendo la totalidad del espécimen. Incubación por 30 minutos para incrementar la sensibilidad.

4. ESTREPTOAVIDINA PEROXIDASA

Secar el portaobjetos

Aplicar la gota roja (estreptavidina y biotina)

Incubación por 30 minutos.

5. SOLUCION DE CROMOGENO

Secado de la superficie.

Cubrir la superficie con cromógeno

Incubar por 30 minutos

Lavar

6. CONTRA-TINCION

Lavado con hematoxilina

Incubar por 2 minutos

Lavar con solución

Lavar nuevamente con solución destilada por 2 minutos.

7. MONTADO

Utilizar un montado no acuoso como Glicero-gel de DAKO ®

ANEXO 7. MORFOMETRIA COMPUTARIZADA.

La morfometría computarizada analiza las imágenes y las describe de forma ordinal, expresando mediante el área por debajo de la curva en colores que representan la reacción.

NEGRO: Sin tejido

AMARILLO: Sin reacción.

AZUL: leve.

VERDE: Moderada.

ROJO: Intensa

ETICA :

ARGUMENTOS DE ACUERDO AL ARTICULOS , SOBRE EL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN