

Uso de nitroglicerina subcutánea como donante de óxido nítrico en colgajos fasciocutáneos de retardo en ratas diabéticas tipo 1

Mayor M.C. Juan Alberto **González,*** Mayor M.C. Jaime **Pares-Hipólito,****
Mayor M.C. Claudia Esther **Rodríguez-Montes,***** Mayor M.C. Ret. Martín **Villaseñor-Bazaldúa******

Bioterio de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. El retardo vascular, conocido también como fenómeno de retardo, es el efecto del cambio en el tejido isquémico para incrementar su vascularidad antes de ser transferido, esto mejora la sobrevida del colgajo, incrementa la relación largo-ancho en los colgajos de patrón al azar y lleva a la transferencia de mayores volúmenes de tejido, esta técnica es utilizada por cirujanos plásticos desde hace cientos de años. La necrosis parcial o total del colgajo persiste como una causa de morbilidad en los pacientes con factores de riesgo como diabetes mellitus, trauma extenso y pérdida masiva de tejidos; la L-Arginina, un precursor de óxido nítrico (NO) disminuye la extensión de la necrosis de los colgajos.

Material y métodos. Se emplearon 28 ratas Wistar machos de seis semanas de edad divididas en dos grupos, el grupo control ratas sanas y diabéticas sin aplicación de trinitrato de glicerilo, grupo de estudio ratas sanas y diabéticas con aplicación de parches de trinitrato de glicerilo, a todas se les realizó un colgajo fasciocutáneo de retardo quirúrgico, se realizó tinción con hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica con CD34 para cuantificación de vasos sanguíneos. Se comparó la cicatrización en cada uno de los grupos.

Resultados. Se logró reproducir el modelo de diabetes mellitus tipo 1 en ratas Wistar. En el grupo control (sin donante de óxido nítrico), la angiogénesis fue mayor en ratas sanas comparadas con diabéticas ($p < 0.05$). Tanto en ratas diabéticas como sanas del grupo control, la angiogénesis fue menor ($p > 0.05$); en el grupo de estudio (con aplicación de un donante de óxido nítrico), se encontró mayor angiogénesis ($p < 0.05$) tanto en ratas sanas como en diabéticas. La necrosis del colgajo se presentó en ratas diabéticas con donante de NO en 14.3% (grupo de estudio), en las ratas diabéticas sin donante de óxido nítrico fue de 28.7%, no hubo necrosis ni pérdida de los colgajos en las ratas sanas en los dos grupos. Se observó cicatrización deficiente en el grupo de estudio en 42.8 y de 70% en el grupo control.

Subcutaneous use of nitroglycerin as nitric oxide donor delay fasciocutaneous flaps in diabetic rats I

SUMMARY

Introduction. Vascular delay, also known as delay phenomenon is the effect of the change in the ischemic tissue to increase its vascularity before being transferred, this improves the survival of the flap increases the length-width ratio in random pattern flaps and leads to the transfer of larger volumes of tissue, this technique is used by plastic surgeons for hundreds of years. The partial or total necrosis of the flap remains a cause of morbidity in patients with risk factors like diabetes mellitus, extensive trauma and massive loss of tissue, the L-arginine, a precursor of nitric oxide (NO) reduces the extent of necrosis flaps.

Material and methods. We used 28 male Wistar rats aged six weeks divided into two groups, the healthy control group and diabetic rats without application of glyceryl trinitrate group of healthy rats and diabetic study with application of glyceryl trinitrate patches, all were performed a surgical delay fasciocutaneous flap was performed with hematoxylin and eosin staining and CD34 immunohistochemistry for quantification of blood vessels. Healing was compared in each group.

Results. Succeeded in reproducing the model of type 1 diabetes mellitus in Wistar rats. In the control group (without nitric oxide donor), angiogenesis was higher in diabetic compared with healthy rats ($p < 0.05$). Both in diabetic rats and healthy control group, angiogenesis was lower ($p > 0.05$) in the study group (with application of a nitric oxide donor), increased angiogenesis was found ($p < 0.05$) in both healthy rats and in diabetics. The flap necrosis occurred in diabetic rats with NO donor in 14.3% (study group) in diabetic rats without nitric oxide donor was 28.7%, there was no necrosis or loss of flaps in healthy rats in two groups. Poor wound healing was observed in the study group at 42.8% and 70% in the control group.

* Graduado del Curso de Esp. y Res. en Cirugía Plástica y Reconstructiva, ** Ex-jefe de la Oficina de Calidad de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, actualmente Jefe de Enseñanza del Hospital Militar Regional San Luis Potosí, SLP. *** Adscrita al Hospital Central Militar. **** Ex-Adscrito a la Sala de Cirugía Plástica y Reconstructiva del Hospital Central Militar

Correspondencia:

Dr. Juan Alberto González

Hospital Central Militar. Bvrd. Manuel Ávila Camacho, Col. Lomas de Sotelo, C.P. 11200, Deleg. Miguel Hidalgo, México, D.F. Correo electrónico: glezjadr@yahoo.com.mx y drja1980@hotmail.com

Recibido: Agosto 23, 2010.

Aceptado: Febrero 20, 2011.

Conclusiones. Existe una menor angiogénesis en los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en ratas diabéticas tipo 1 de dos semanas de evolución. El parche de trinitrato de glicerilo como donante de óxido nítrico mejora la sobrevida en los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en ratas sanas y diabéticas, por incremento en la angiogénesis. En ratas diabéticas tipo 1 de dos semanas de evolución el proceso de cicatrización es deficiente. El parche de trinitrato de glicerilo como donante de NO mejora la cicatrización en los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en ratas diabéticas tipo 1 de dos semanas de evolución.

Palabras clave: Óxido nítrico, diabetes mellitus, colgajos fasciocutáneos.

Conclusions. There is less angiogenesis in fasciocutaneous flaps in surgical delay of type 1 diabetic rats two weeks of evolution. The patch of glyceryl trinitrate as a donor of nitric oxide improves survival in fasciocutaneous flaps of surgical delay in healthy rats and diabetic by increased angiogenesis. In type 1 diabetic rats two weeks of the healing process of evolution is flawed. The patch of glyceryl trinitrate and nitric oxide donor improves healing fasciocutaneous flaps in the surgical delay type 1 diabetic rats two weeks of evolution.

Key words: Nitric oxide, diabetes mellitus, fasciocutaneous flaps.

Introducción

El retardo vascular, conocido también como fenómeno de retardo, es el efecto del cambio en el tejido isquémico para incrementar su vascularidad antes de ser transferido, esto mejora la sobrevida del colgajo, incrementa la relación largo-ancho en los colgajos de patrón al azar y lleva a la transferencia de mayores volúmenes de tejido en colgajos de patrón axial. A pesar del uso de los procedimientos de retardo en la práctica clínica, el mecanismo por el cual este fenómeno ocurre permanece oculto.¹

La técnica de retardo vascular ha sido utilizada por cirujanos plásticos desde hace cientos de años, la familia Viano, en el siglo XV, utilizó este tipo de procedimiento para rino-plastia, Gillies también demostró la importancia de retardo quirúrgico en 1920 en la descripción de colgajos pediculados tubulares. Los primeros datos de investigaciones experimentales en los colgajos retardados se realizó por Milton, en cerdos, en 1965, determinando como tiempo óptimo del retardo dos semanas, posteriormente Myers, en 1967, determinó como tiempo óptimo para la transferencia de tejidos ocho a diez días en un modelo en ratón.¹

El concepto de colgajos basados en ramas cutáneas ha expandido los horizontes de la cirugía reconstructiva, estos colgajos parecen proveer un simple y reproducible medio de reconstrucción para dar cobertura de buena calidad para defectos de piel de pequeño tamaño de la extremidad inferior, sin embargo, la necrosis parcial o total del colgajo persiste como una causa de morbilidad en los pacientes con factores de riesgo como diabetes mellitus, trauma extenso y pérdida masiva de tejidos. Karacalar reportó que la diabetes mellitus, arterioesclerosis e insuficiencia venosa, permanecen como los factores de riesgo más importantes para la pérdida de los colgajos pediculados.²

En la segunda mitad del siglo XX, numerosos investigadores han realizado trabajos experimentales para entender el mecanismo del retardo vascular; dichos estudios han buscado componentes humorales y celulares relacionados con el fenómeno de retardo, estos efectos han sido divididos cronológicamente en efectos tempranos y tardíos, los primeros relacionados con pérdida del tono simpático (por la transección nerviosa o procedimiento de retardo quirúrgico comple-

to), llevando a la dilatación y reorientación de vasos de choque dentro del colgajo, dichos cambios ocurren en forma paralela a cambios metabólicos que incrementan la tolerancia a la isquemia de los colgajos; los cambios tardíos se refieren al incremento en la densidad de nuevos vasos sanguíneos en el colgajo. Los cambios humorales están relacionados, sobre todo, con la liberación de catecolaminas (estado hiperadrenérgico), hay una pronunciada estimulación de los receptores alfa y beta adrenérgicos lo que causa vasoconstricción y acumulación de factores que afectan las arteriolas en los colgajos retardados; por su parte con respecto a los cambios metabólicos se ha reportado que la utilización de substratos como glucosa, oxígeno y productos del ácido araquidónico, así como las prostaglandinas E2, presentan un incremento gradual durante el periodo de retardo de 14 días.^{1,2}

Un factor que siempre está presente en el fenómeno de retardo es la isquemia que actúa como el estímulo primario para los cambios vasculares. La neovascularización ocurre por dos mecanismos, el crecimiento de microvasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes y la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células progenitoras a través de citocinas angiogénicas como el factor de crecimiento transformante tipo beta y el factor de crecimiento endotelial vascular.^{1,3,4}

El estímulo angiogénico más importante es generado por la hipoxia, enviando señales a las células endoteliales, que da como resultado incremento en la transcripción de genes claves para la producción de moléculas angiogénicas, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular. En el ratón, la activación de vascularización colateral preexistente que restaura el flujo sanguíneo en el corazón agudamente isquémico, es mediado por la acción de una citosina, la angiotensina II, un regulador clave de la presión sanguínea y principal efector del sistema renina-angiotensina. La mayoría de los efectos cardiovasculares de la angiotensina II, son mediados por los receptores AT1 y AT2 (receptores de angiotensina 1 y 2, respectivamente). Una explicación potencial para el uso de proteínas recombinantes y formulaciones de factores de crecimiento asume que el uso de una sola citosina angiogénica puede ser insuficiente para generar un adecuado y durable efecto de neovascularización, determinando que dos citocinas actúan por diferentes mecanismos

logrando una respuesta biológica más robusta y duradera. Por otra parte, la normalización en los niveles de oxígeno intracelular incrementado se ha sugerido sea una herramienta terapéutica en los pacientes con enfermedad vascular en las extremidades, sin toxicidad seria.⁴⁻⁷

El óxido nítrico (NO) juega un papel crucial en el complejo mecanismo del daño por perfusión posterior a la isquemia. El óxido nítrico antagoniza la acción de la endotelina, disminuyendo las moléculas de adhesión, receptores de adhesión como la beta 2 integrina, CD11 y CD18, opera como radical de captura, inhibe la agregación de trombocitos, inhibe la interacción leucocito-endotelio y así protege el daño por perfusión, sin embargo, es conocido que el óxido nítrico tiene acciones dependientes de su dosis y causa efectos hemodinámicos tales como disminución importante de la presión sanguínea después de su administración endovenosa.⁶⁻⁸

Cadeiro y Lovett han observado en colgajos miocutáneos en modelos porcinos, que la L-Arginina, un precursor de NO, disminuye la extensión de la necrosis de los colgajos. Estudios realizados en modelos experimentales en rata, en los que se determinaron los efectos dosis-dependiente del NO, utilizando el complejo óxido nítrico/espermina tanto sistémico como intraarterial, pre y transoperatorio, produjo buenos resultados en la sobrevivencia de los colgajos, reportando un menor porcentaje de necrosis en los colgajos con dosis de 500 y 750 mmol/kg.⁶⁻⁹

Material y métodos

El presente estudio se realizó en el bioterio de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Se realizó un estudio experimental, prospectivo longitudinal. Para la realización de la fase experimental se emplearon ratas Wistar machos de seis semanas de edad. Se mantuvieron en jaulas en grupos de cuatro, separadas unas de otras en una habitación estándar limpia y aislada, a una temperatura de 20 grados centígrados, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, el cuidado de los animales se realizó siguiendo la legislación mexicana contemplada en la norma oficial NOM-062-Z00-1995, conformándose cuatro grupos, tres de ellos con siete ratas y uno con ocho ratas (29 en total).

Materiales

Fármacos y reactivos:

- Estreptozotocina (sigma, frasco 25 g).
- Trinitrato de glicerilo (farmacéutica 3M, parches de 0.2 mg/h).
- Marcador CD 34.
- Tinción de hematoxilina y eosina (H-E)

Material e instrumental:

- Tres jaulas metabólicas.
- Tres bebedores de plástico.

- Equipo de microcirugía y cirugía menor.
- Una tabla de disección.
- Una cámara de éter.
- 200 mL de formol al 8%.
- Cinco agujas metabólicas.
- Un glucómetro electrónico.
- 120 tiras reactivas de glucómetro.
- 120 tubos vacutainer.
- 60 jeringas de 5 mL.
- Una guillotina.
- 64 suturas de seda del 4-0.
- 64 hojas de bisturí No. 15.
- Gasas estériles, ropa estéril, yodopovidona espuma y solución salina estéril.
- Una computadora para registro de datos y análisis de la información.
- Balanza analítica marca Phyme, modelo August Sauter GMBH D-7470 Albstadt 1-Ebingen.
- Estereoscopio marca Zeiss West Germany Modelo 475022
- Balanza semianalítica digital modelo GT4000, marca Ohaus serial No. 3783.

Métodos empleados

Metodología experimental:

- **Fase de inducción de la diabetes mellitus tipo 1:** Se pesó a las ratas con la balanza semianalítica digital modelo GT4000 marca Ohaus serial No. 3783, se les administró estreptozotocina disuelta en solución buffer, a dosis de 60 mg/kg peso vía intraperitoneal con jeringa de 1 mL de capacidad. A los tres días de la inducción se comprobó los índices de glucemia al extraer una gota de sangre de la cola de las ratas y se analizó por medio de tiras reactivas para glucómetro digital, ingresando al estudio experimental las que presentaron glicemias por arriba de 200 mg/dL.
- **Fase estudio piloto:** Se realizó estudio piloto en el mes de agosto del 2007 con ratas de las mismas características de los criterios de inclusión del estudio, para determinar dos semanas posterior a la inducción de la diabetes mellitus tipo 1, la dosis tolerada de trinitrato de glicerilo y tiempo de permanencia del parche.
- **Fase de ejecución del procedimiento quirúrgico:** Las ratas que entraron al seguimiento se les procuró el máximo aseo, alimentos y agua necesaria diariamente hasta cumplir el estudio. Se tomaron glicemias de la manera antes descrita cada semana.

Los grupos de ratas se dividieron de la siguiente manera:

- **Grupos control:** Siete ratas no diabéticas sin aplicación de parches de trinitrato de glicerilo.*

* Se tomó lo correspondiente a la octava parte del total del parche (0.3 mg de peso el fragmento del parche pesado en balanza semianalítica).

- Siete ratas diabéticas tipo 1 sin aplicación de parches de trinitrato de glicerilo.*
- Grupos experimentales: Siete ratas diabéticas tipo 1 con aplicación de parches de trinitrato de glicerilo.*
- Ocho ratas no diabéticas con aplicación de parches de trinitrato de glicerilo.*

En las ratas controles y el grupo experimental, 14 días posteriores a la inducción de la diabetes mellitus tipo 1, bajo las condiciones más estrictas de la técnica quirúrgica estéril, se diseñaron colgajos fasciocutáneos en la pata trasera izquierda de la rata, tercio medio del muslo en la cara externa, con diseño del colgajo con relación de 2:1 largo-ancho (base del colgajo) con dimensiones de 12 y 6 mm, respectivamente, de base proximal, se recolocó el colgajo fasciocutáneos previamente levantado, tomando para estudio de histopatología un segmento del colgajo de 1 mm a cada lado de la línea de incisión distal del colgajo, por 6 mm correspondientes a la longitud transversa del mismo, el colgajo se suturó con seda 4-0.

Se rasuró la región dorsal y según correspondiera el grupo se colocó el fragmento del parche subcutáneo, fijándolo con tela de microporo por 12 horas diarias durante cinco días a partir de la realización del colgajo (*Figura 1*).

Se midió clínicamente con Vernier la distancia en milímetros de sufrimiento (isquemia o necrosis) de los colgajos diariamente, tomando en cuenta hasta la delimitación de la necrosis en el 5o. día postoperatorio.

La cicatrización deficiente se determinó en el 8o. día postoperatorio como aquella en la que hubo dehiscencia de la herida quirúrgica y/o retardo en la cicatrización.

Se sacrificaron las ratas en cada uno de los grupos al 10o. día del retardo del colgajo fasciocutáneo (levantamiento del colgajo y recolocación en su lecho), se realizó estudio histopatológico en cada uno de los animales, con cortes de tejidos incluyendo 1 mm a cada lado cicatriz en el borde distal del colgajo, en el sitio previo de la biopsia inicial para realizar el estudio comparativo; para la cuantificación de los vasos sanguíneos se realizó el análisis histopatológico de los cortes con campos de 10, 20, 30 y 40 X con tinción de hematoxilina y eosina (H-E) y con campos de 40 X por técnica de inmunohistoquímica con marcador CD 34.

Resultados

En el *cuadro 1* se observan las glicemias de los animales estudiados antes y después de la inducción de la diabetes mediante la inyección de STZ. Se presenta un incremento



Figura 1. Colocación de parche de trinitrato de glicerilo en el dorso de la rata.

* Se tomó lo correspondiente a la octava parte del total del parche (0.3 mg de peso el fragmento del parche pesado en balanza semianalítica).

Cuadro 1. Glicemias en las ratas diabéticas tipo 1 inducidas con los valores pretratamiento, primera y segunda semanas posterior a la inducción.

No. de rata	Pretratamiento	1a. Semana	2a. Semana
1	87 mg/dL	288 mg/dl	350 mg/dl
2	95 mg/dL	323 mg/dL	410 mg/dL
3	82 mg/dL	403 mg/dL	594 mg/dL
4	104 mg/dL	275 mg/dL	402 mg/dL
5	89 mg/dL	352 mg/dL	610 mg/dL
6	100 mg/dL	291 mg/dL	478 mg/dL
7	80 mg/dL	325 mg/dL	390 mg/dL
8	105 mg/dL	410 mg/dL	292 mg/dL
9	90 mg/dL	389 mg/dL	380 mg/dL
10	74 mg/dL	441 mg/dL	391 mg/dL
11	110 mg/dL	378 mg/dL	410 mg/dL
12	92 mg/dL	257 mg/dL	551 mg/dL
13	81 mg/dL	320 mg/dL	433 mg/dL
14	93 mg/dL	388 mg/dL	356 mg/dL
Media	91.57	345.71	431.92
Error estándar	2.7	14.64	24.15

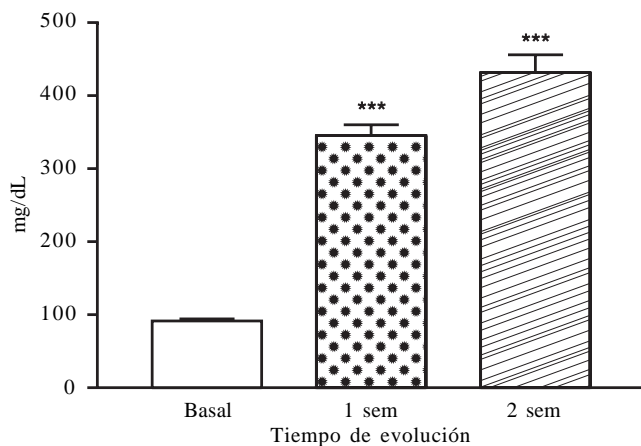


Figura 2. Glicemia. Evolución de la diabetes mellitus tipo 1 posterior a la inducción con estreptozotocina intraperitoneal.

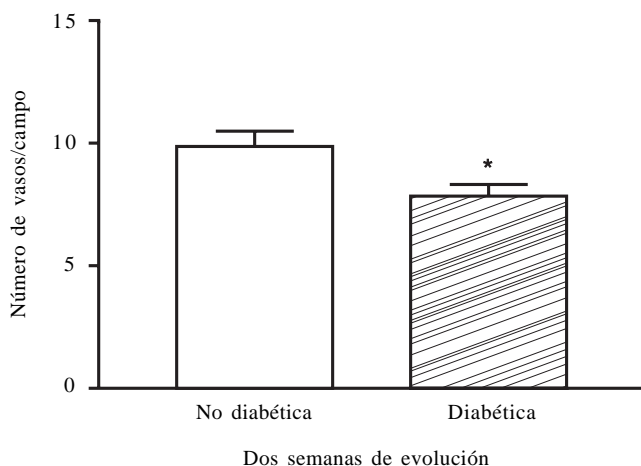


Figura 3. Levantamiento de colgajo. Evaluación de la angiogénesis en el procedimiento inicial (levantamiento del colgajo fasciocutáneo) y de retardo quirúrgico, en ratas controles (sin tratamiento).

significativo en los niveles de glicemia a las 72 horas de la aplicación de la STZ, dichos niveles se mantuvieron durante el periodo de estudio, con lo cual se logró reproducir el modelo de diabetes mellitus tipo 1 en ratas, como se puede comparar en los valores de glicemias previos a la inducción y los posteriores a ella en la primera y segunda semana ($p < 0.01$) (Cuadro 1 y Figura 2).

Se logró realizar con éxito los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en el modelo en rata; al observar bajo microscopía con las tinciones HE e inmunohistoquímica notamos que en el grupo control, ratas no diabéticas, se encontró una neoformación mayor comparado con las diabéticas, encontrando una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$ (Figuras 3-5).

En las ratas no diabéticas en las que no se aplicó el donante de óxido nítrico (grupo control), no se encontró significancia estadística ($p > 0.05$) al observar bajo microscopía la

angiogénesis, sin embargo, la tendencia es a una mayor formación de vasos sanguíneos (Figura 6).

Por el contrario, en las ratas no diabéticas, en las que se aplicó el donante de NO, se encontró mayor angiogénesis ($p < 0.05$) (Figura 6).

En las ratas diabéticas sin aplicación de donante de NO, se encontró al igual que en las no diabéticas sin óxido nítrico una tendencia a la mayor formación de vasos sanguíneos, aunque no hubo significancia estadística ($p > 0.05$) (Figuras 8 y 9).

En el grupo de ratas diabéticas a las cuales se les aplicó el donante de NO, se encontró incremento notable en la neovascularización ($p < 0.05$) después del procedimiento de retardo quirúrgico (Figuras 10 y 11).

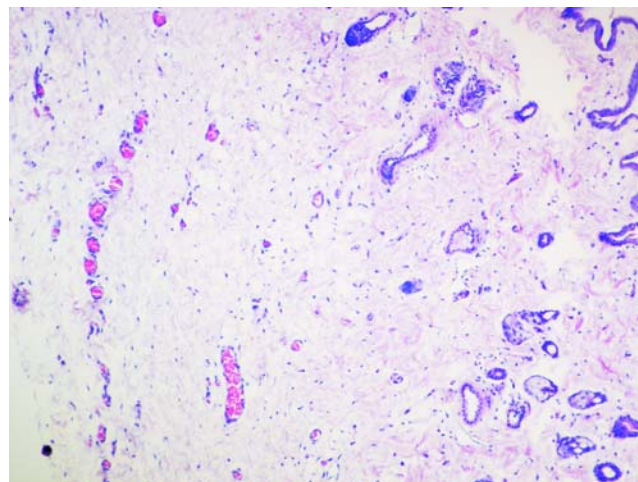


Figura 4. Biopsia de piel y fascia con tinción de H-E en rata diabética tipo 1 del grupo control, al realizar el procedimiento de retardo en el levantamiento del colgajo fasciocutáneo, en la que se observan los vasos sanguíneos a un campo de 10 X.

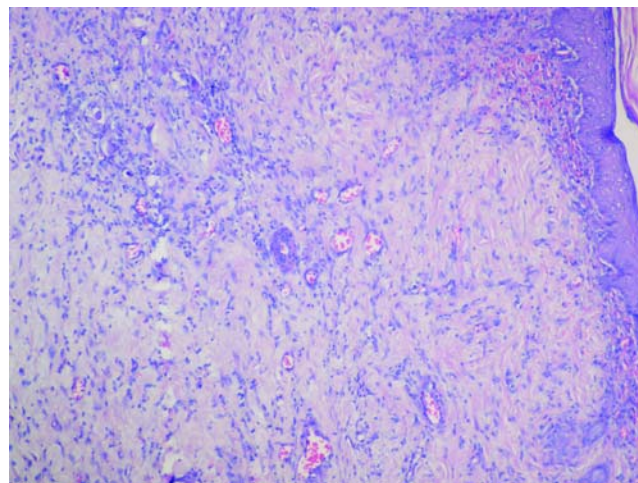


Figura 5. Microfotografía a 10 X con tinción de H-E en la misma rata (Figura 4) 10 días después del procedimiento inicial donde se observa una mayor formación de vasos con predominio hacia la dermis.

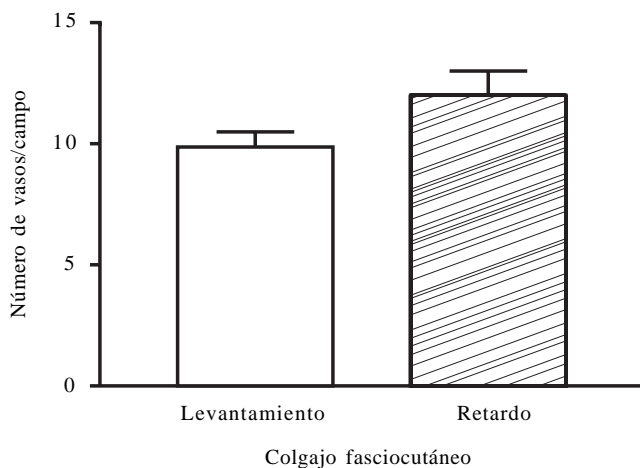


Figura 6. Ratas no diabéticas sin NO. Evaluación de la angiogénesis en ratas del grupo control en el levantamiento del colgajo fasciocutáneo de retardo y al 10o. día posterior al procedimiento inicial (retardo quirúrgico).

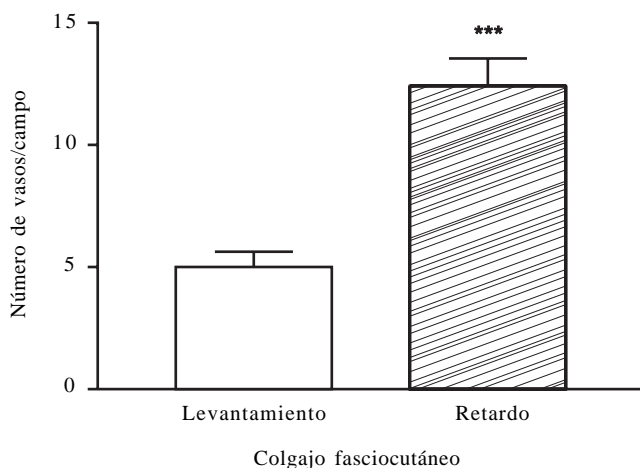


Figura 7. Ratas no diabéticas con NO. Evaluación de la angiogénesis en el levantamiento del colgajo fasciocutáneo y al 10o. día del primer procedimiento quirúrgico (retardo), en ratas del grupo de estudio con aplicación de donante de óxido nítrico.

La necrosis del colgajo determinada al 5o. día postoperatorio, se presentó en ratas diabéticas tratadas con donante de NO en 14.3% (1/7), con una pérdida del colgajo de 8%, la longitud mayor de la necrosis fue en este caso de 2 mm (no siendo completa la necrosis en el borde distal del colgajo) (Figura 12).

En las ratas diabéticas sin aplicación de donante de NO, se presentó necrosis del colgajo en 28.7% (2/7) con pérdida del colgajo de 33% (4 mm) y de 25% (3 mm), respectivamente (Figura 13).

No hubo necrosis ni pérdida de los colgajos en las ratas no diabéticas con o sin la aplicación de donante de NO; en estas mismas ratas la cicatrización se apreció de manera adecuada en 100%, a diferencia de las ratas diabéticas en donde se observó retardo en la cicatrización en 70% (5/7) en las que

no recibieron el donante de NO y de 42.8% (3/7) en los controles (Figuras 14-17).

Como un hallazgo incidental en el presente trabajo se encontró clínicamente infección (no se realizó análisis microbiológico del exudado), presentándose esta como exudado purulento en el 28.5% (2/7) en las ratas diabéticas del grupo control, no hubo datos de infección de los colgajos en las ratas diabéticas del grupo tratado con donantes de NO ni en las ratas no diabéticas (Figuras 18 y 19).

Discusión

El retardo quirúrgico de los colgajos cutáneos antes de ser transferido mejora la supervivencia de los colgajos, muchos estudios han intentado identificar los numerosos factores involucrados en este fenómeno, hace más de 60 años la

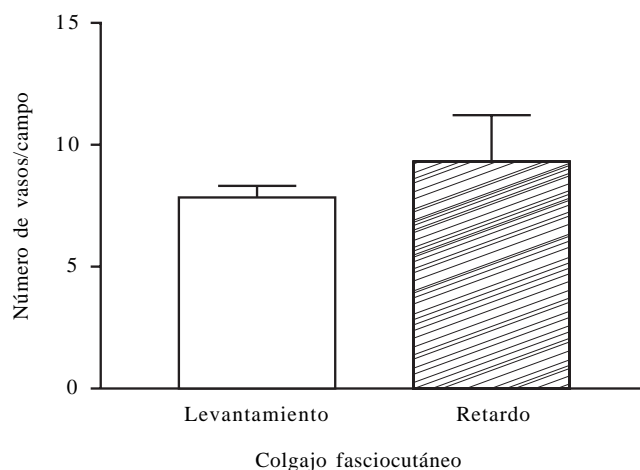


Figura 8. Ratas diabéticas sin NO. Ratas diabéticas tipo 1, grupo control (sin aplicación de donante de óxido nítrico) donde se evalúa la angiogénesis, al realizar el levantamiento quirúrgico y al 10o. día del procedimiento inicial.

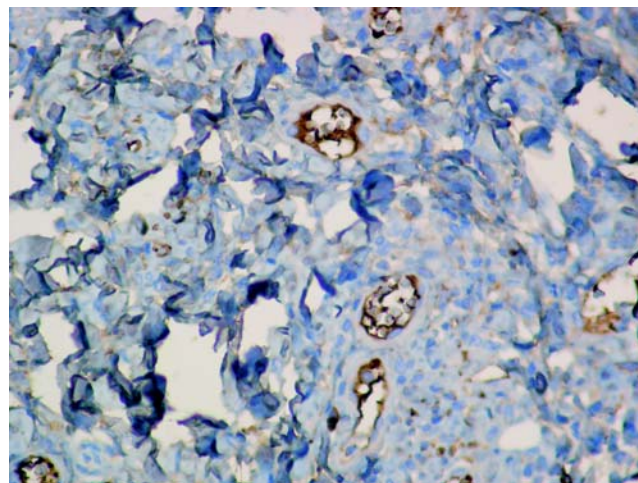


Figura 9. Microfotografía en 40 X con tinción de inmunohistoquímica con marcador CD 34 para resaltar las células endoteliales en el grupo de control (sin aplicación de óxido nítrico).

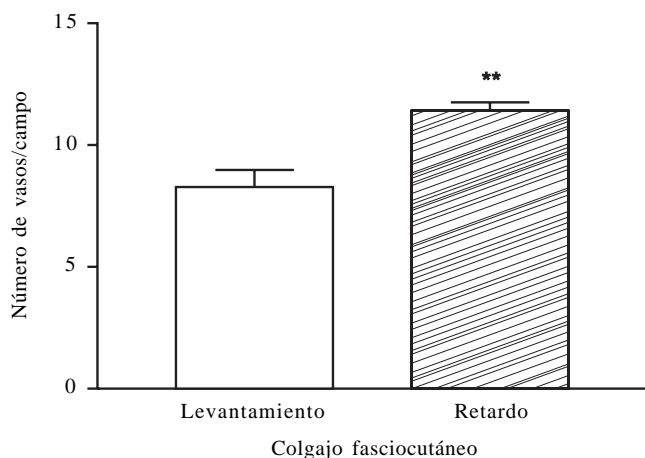


Figura 10. Ratas diabéticas con parche de NO. Evaluación de la angiogénesis en el grupo de ratas diabéticas tratadas con donante de óxido nítrico al realizar el levantamiento del colgajo fasciocutáneo y posterior al retardo quirúrgico ($p < 0.05$).



Figura 12. Rata diabética tratada con donante de óxido nítrico, se observa necrosis parcial del colgajo al 5o. día posterior al levantamiento del colgajo.

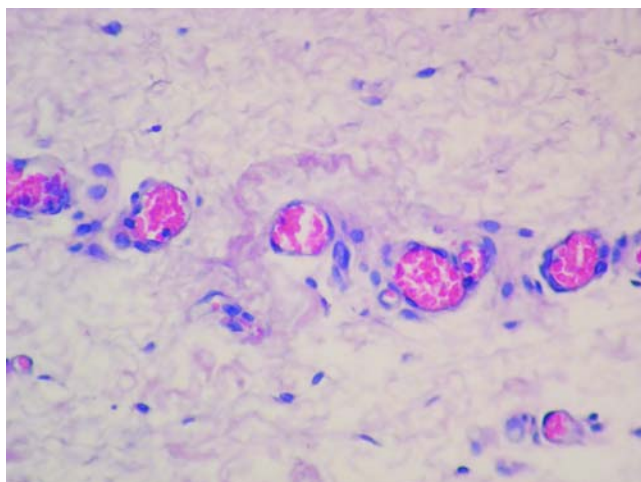


Figura 11. Microfotografía con tinción H-E a 40 X. Ratas diabéticas tratadas con donante de óxido nítrico al 10o. día del retardo quirúrgico, en el que se aprecia aumento en vasos neoformación, así como incremento en la luz de los vasos sanguíneos preexistentes.



Figura 13. Rata diabética tipo 1 sin donante de óxido nítrico con dehiscencia y pérdida del colgajo en 25%.

dilatación de los vasos fue identificado como parte del desarrollo de perfusión en colgajos tubulares pediculados, Taylor y cols. realizaron varios estudios animales con técnicas angiográficas e identificaron un patrón consistente de vasodilatación arterial. Recientes investigaciones han revelado que la vasodilatación es más evidente a nivel de los vasos de choque en angiosomas adyacentes y que este proceso continúa por un periodo de siete días.¹⁰

Las sustancias vasoactivas producidas por el endotelio juegan un importante papel en el control del flujo sanguíneo de los tejidos, desde hace mucho tiempo se sabe que el NO media la relajación dependiente del endotelio, se ha encontrado que éste juega un papel importante en la microcirculación. La sintetasa de óxido nítrico constitutiva producida por el endotelio ayuda a mantener la presión y flujo sanguí-



Figura 14. Octavo día posterior al levantamiento del colgajo fasciocutáneo de retardo en rata no diabética sin aplicación de parche de trinitrato de glicerilo, donde se aprecia una adecuada cicatrización.

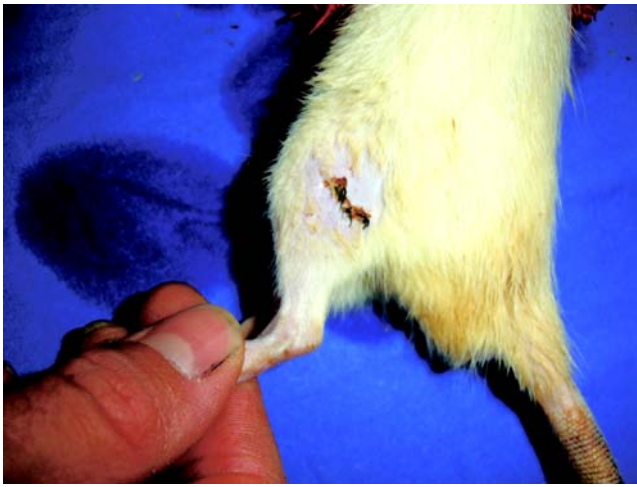


Figura 15. Rata diabética tipo 1 (grupo control), sin aplicación de donante de óxido nítrico, al 80. día posterior a la realización del colgajo fasciocutáneo de retardo, se observa retardo en la cicatrización con dehiscencia parcial de la herida quirúrgica.

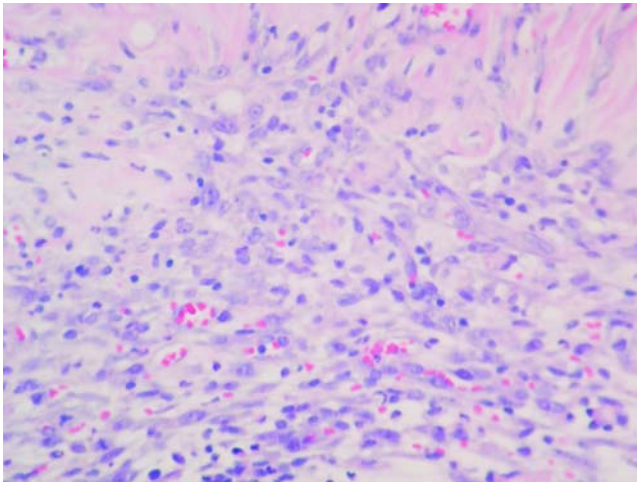


Figura 16. Aumento 20 X con tinción de H-E con abundante infiltrado inflamatorio e incremento de vasos sanguíneos que corresponde a la biopsia de piel de la rata en la figura anterior (15) con retardo en la cicatrización.

neo al actuar en el músculo liso de los vasos sanguíneos, la sintetasa de NO inducible parece promover la angiogénesis y la vasodilatación que ayudan en la sobrevida de los colgajos cutáneos.¹⁰⁻¹² El NO conocido como un segundo mensajero que se encuentra en diferentes tejidos como el músculo esquelético, miocardio, intestino y piel, media un amplio rango de funciones biológicas como son la citoprotección en el daño por reperfusión, lo que es atribuido a su intensa actividad vasodilatadora, que previene la agregación y adhesión de neutrófilos y plaquetas, esto ha sido estudiado en modelos experimentales animales con la realización de colgajos libres microvasculares tratados con L-arginina como un donador de óxido nítrico, contra un potente inhibidor de la síntesis del mismo, como lo es la nitro-metilester L-arginina

(L-NAME), los datos proveen una fuerte evidencia indirecta de que el incremento en la producción de óxido nítrico es responsable de la disminución en el daño de los tejidos.¹³⁻¹⁶

En el periodo inmediato de elevación del colgajo de retardo quirúrgico hay un estado hiperadrenérgico que se piensa es un importante contribuyente para la isquemia, lo cual lleva a una menor biodisponibilidad del óxido nítrico, por lo que se ha estudiado a través de la infusión arterial directa en colgajos miocutáneos así como con colgajos cutáneos de tipo venoso mismos que directa o indirectamente son isquémicos y en los que se espera se presente una elevación del NO secundario a la isquemia, la respuesta es la formación de una mayor cantidad de óxido nítrico que actúa como un potente vasodilatador mejorando el flujo sanguíneo en los tejidos como fue demostrado por McDonald y cols. en los colgajos de retardo quirúrgico en ratón, a su vez se ha estudiado que este tipo de colgajos incrementan la perfusión capilar funcional con respecto a sus precondiciones isquémicas a través de la síntesis de NO, una vasodilatación e incremento en los vasos sanguíneos de neoformación,^{1, 4,10,15-19} nosotros encontramos diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en ratas en las que se aplicó un precursor (donante) de óxido nítrico tanto en ratas sanas como en ratas diabéticas tipo 1, en los colgajos de retardo quirúrgico (*Figuras 6-8,10*).

A causa de la técnica simple en la transferencia de colgajos pediculados, éstos son ampliamente utilizados para el cierre de defectos subcutáneos y de la piel, sin embargo, la necrosis parcial o total de los colgajos pediculados persiste como la mayor causa de morbilidad como en los pacientes con diabetes mellitus, arterioesclerosis e insuficiencia venosa, por este motivo se han realizado diferentes métodos de precondiciones isquémicas tanto médicas como quirúrgicas para mejorar la sobrevida de este tipo de colgajos, algunos estudios demuestran que en modelos en ratón de colgajos musculares y cutáneos la administración previa de NO, mejora la sobrevida de los colgajos después de la isquemia disminuyendo los efectos deletéreos después de la isquemia-reperfusión.^{2,20-23}

Como se ha reportado en otros estudios, encontramos que la vascularidad en las ratas sanas se encuentra aumentada durante la 1a. a la 2a. semana en los colgajos de retardo quirúrgico.

En cuanto al aspecto principal de este trabajo para valorar el efecto de un donante de NO en la supervivencia de los colgajos de retardo quirúrgico, en nuestro estudio encontramos diferencias en la angiogénesis entre ratas sanas y ratas diabéticas con una diferencia estadísticamente significativa y una $p < 0.05$, asimismo, tanto en el grupo ratas sanas como en las diabéticas tratadas con la aplicación de parches de trinitrato de glicerilo como donante de óxido nítrico aplicado en forma subcutánea, encontramos a su vez diferencias con significancia estadística ($p < 0.05$). En el grupo control y en el grupo de estudio sin aplicación de trinitrato de glicerilo como donante de NO no encontramos diferencias estadísticas en la angiogénesis (*Figuras 3-8,10 y 11*).



Figura 17. Rata diabética tipo 1 en el 80. día postoperatorio tratada con donante de óxido nítrico, se observa retardo en la cicatrización sin dehiscencia del colgajo.

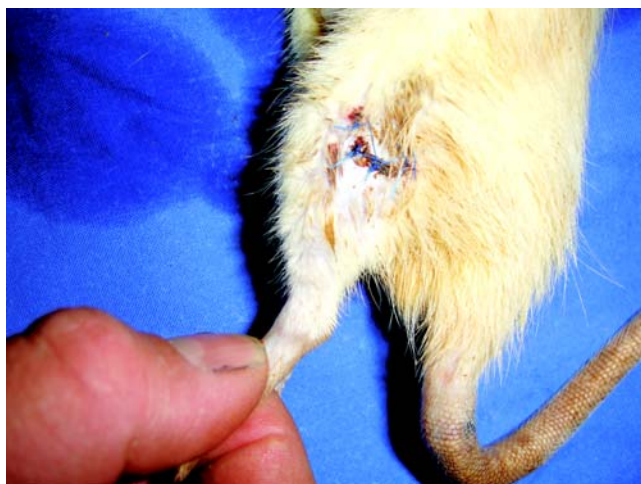


Figura 18. Rata diabética sin aplicación de NO en la que se aprecia la presencia de infección clínica con exudado purulento al 60. día posterior al levantamiento del colgajo.

Para el presente estudio no pudimos tener a nuestro alcance hasta estos momentos literatura sobre estudios previos comparativos en especie animal con la aplicación de donantes de óxido nítrico en modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1, y por las diferencias encontradas en la angiogénesis entre ratas sanas y ratas diabéticas, sugerimos que las mejores condiciones de la microcirculación en el primer grupo mejora la difusión subcutánea del trinitrato de glicerilo aplicado vía subcutánea como donante de NO (*Figuras 7 y 10*).

Acorde a lo descrito en la literatura con la utilización del óxido nítrico, en nuestro estudio encontramos incremento en el número de vasos sanguíneos, así como un incremento en el diámetro de los vasos sanguíneos preexistentes, lo que mejoró la supervivencia de los colgajos, encontramos necrosis de los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico

co en ratas diabéticas tipo 1 sin aplicación de un donante de NO de 28.7% contra 14.3% en las que sí se aplicó el precursor del NO, siendo a su vez la necrosis del colgajo mayor en los primeros. Como se menciona en la literatura, en los individuos en quienes no tienen problemas de la microcirculación, la isquemia y necrosis de los colgajos es muy baja, en el presente trabajo no encontramos este tipo de problemas en las ratas no diabéticas (*Figuras 13-15,17*).

El NO muestra en la piel directa o indirectamente ser un disparador en la vasodilatación, angiogénesis y melanogénesis, a su vez al actuar sobre el sistema inmunológico ejerce una influencia en la carga bacteriana cuando éste es inhibido experimentalmente en estudios *in vivo*. La L-arginina como un precursor para la producción de NO, ha sido reportado como útil en el incremento de la sobrevida y reperfusión de los tejidos isquémicos.²⁴⁻²⁶ En este estudio encontramos un retardo en la cicatrización en ratas diabéticas tipo 1 sin donante de NO (grupo control) en 70 vs. 42.8% en el grupo tratado con aplicación de un donante de NO. El proceso de cicatrización en las ratas sanas lo observamos sin ninguna complicación.

En el presente trabajo observamos en forma clínica (ya que no se tomaron cultivos) en los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico infección en 28.5% en las ratas diabéticas del grupo control, en el grupo de ratas diabéticas tratadas con el donante del NO no se presentó ningún caso; tal como se encuentra descrito en la bibliografía mundial la diabetes mellitus condiciona un mayor riesgo para las infecciones, en nuestro caso no hubo datos de infección en los colgajos de las ratas sanas (*Figuras 18 y 19*).

Al momento del presente trabajo, no se han reportado estudios en los cuales se apliquen donantes de NO en las diversas técnicas de colgajos en modelos experimentales de diabetes mellitus tipo 1, para mejorar la sobrevida

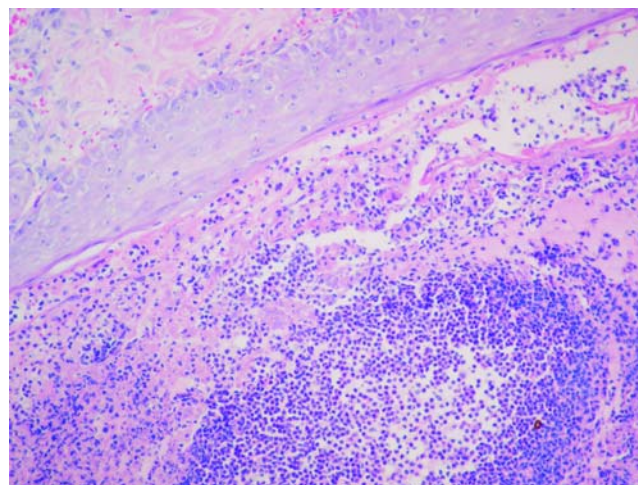


Figura 19. Microfotografía con aumento a 10 X con tinción de H-E en el espécimen anterior (Figura 18) donde se muestra la presencia de infiltrado inflamatorio intenso con formación de microabsceso.

de los mismos, nuestros resultados indican que los donantes del NO mejoran la sobrevida de los colgajos cutáneos y por las observaciones que se presentaron en las infecciones quirúrgicas, pudieran ser una opción de manejo para las mismas en los pacientes con factores de riesgo. Queda por establecer si este efecto benéfico se observa en etapas avanzadas de la diabetes mellitus tipo 1, así como determinar las dosis efectivas de manejo de los donantes del NO.

Conclusiones

- Existe una menor angiogénesis en los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en ratas diabéticas tipo 1 de dos semanas de evolución.
- El parche de trinitrato de glicerilo como donante de NO mejora la sobrevida en los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en ratas sanas, por incremento en la angiogénesis.
- El parche de trinitrato de glicerilo como donante de NO mejora la sobrevida en los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en ratas diabéticas tipo 1, por incremento en la angiogénesis.
- En los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en ratas diabéticas tipo 1 de dos semanas de evolución el proceso de cicatrización es deficiente.
- El parche de trinitrato de glicerilo como donante de NO mejora la cicatrización en los colgajos fasciocutáneos de retardo quirúrgico en ratas diabéticas tipo 1 de dos semanas de evolución.

Referencias

1. Ghali S, Butler P, Tepper O, Gurtner G. Vascular delay revisited. *Plastic and reconstructive surgery* 2007; 119(6): 1735-44.
2. Karacalar A, Idil O, Demir A, Guneren E, Simsek T, Ozcan M. Delay in neurovascular flaps. *Ann Plast Surg* 2004; 53(5): 481-7.
3. William A. Phenotypic heterogeneity of the endothelium. *Circ Res* 2007; 100: 174-90.
4. Munk V, Sánchez L, Petrampol M, Butz N, Banfi A, Eriksson U. Angiotensin II induces angiogenesis in the hypoxic adult mouse heart in vitro through an AT2-BT2 receptor pathway. *Hypertension* 2007; 49: 1178-85.
5. Rajagopalan S, Olin J, Deitcher S, Laird A, Grossman M, Goldman K, et al. Use of constitutively active hypoxia-inducible factor-1 α transgene as a therapeutic strategy in no-option critical limb ischemia patients. *Circulation* 2007; 115: 1234-43.
6. Engel H, Sauerbier M, Germann G, Kuntscher M. Dose-dependent effects of a nitric oxide donor in a rat flap model. *Ann Plast Surg* 2007; 58(4): 466-0.
7. Kuntscher M, Altmann J. Role of nitric oxide in the mechanism of preclamping and remote ischemic preconditioning of adipocutaneous flaps in a rat model. *J Reconst Microsurg* 2003; 19: 55-60.
8. Kuntscher M, Hartmann B, Germann G. Remote ischemic preconditioning of flaps: a review. *Microsurgery* 2005; 25: 346-52.
9. Cordeiro P, Santamaría E, Hu Q. Use of nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 2040-8.
10. McDonald S, Lo P, Thursmond M, Jones C, Cohen R, Miller A, Beasley D. Role of oxide nitric in skin flap delay. *Plast Reconstr Surg* 2004; 113(3): 927-31.
11. Palmer R, Ferrige J, Moncada S. Release of nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987; 227: 524-32.
12. Moncada S, Palmer M, Higgs E. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-22.
13. Stamler J, Loh E, Roddy M, Currie K, Creager M. Nitric oxide basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89(5): 2035-40.
14. Emmett J, Fink B, Bernard A, Ochoa J. Analysis of nitric oxide in prevention of reperfusion injury. *Ann Plast Surg* 2001; 46(3): 274.
15. Kuo Yur, Wang F, Feng J, Lutz B, Huang H-C, Yang K. Nitro-soglutathione promotes flap survival via upresión of reperfusion injury-induced superoxide and inducible nitric oxide synthase induction. *J Trauma Injury, Infection and Critical Care* 2004; 57(5): 1025-31.
16. Azizzadeh B, Buga G, Berke G, Larian B, Ignarro L, Blackwell. Inhibitors of nitric oxide promote microvascular thrombosis. *Arch Facial Plast Surg* 2003; 5: 31-5.
17. Oziyazgan I, Ozkose M, Baskol G. Nitric oxide in flow-through venous flaps and effects of L-Arginine and nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME) on nitric oxide and flap survival in rabbits. *Ann Plast Surg* 2007; 59(5): 550-7.
18. Morris SF, Taylor GI. The time sequence of the delay phenomenon: When is a surgical delay effective? An Experimental Study. *Plast Reconstr Surg* 1995; 95: 526.
19. Cordeiro PG, Hu Q-Y. The protective effect of L-Arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100: 1227-33.
20. Zhan F, Oswald T, Holt J, Gerzenshtein J, Lei M-P, Lienawea-ver W. Regulation of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning of muscle flap in a rat model. *Ann Plast Surg* 2004; 52(6): 609-13.
21. Khiabani K, Kerrigan C. The effects of the nitric oxide donor SIN-1 on ischemia-reperfused cutaneous and myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002; 110: 169-76.
22. Ghazinezami B, Rahimpour S, Gholipour T, Ghasemi M, Sadeghipour H. Pharmacologic preconditioning of random-pattern skin flap in rats using local cyclosporine and FK-506. *Ann Plast Surg* 2007; 59(4): 435-440.
23. Khiabani K, Kerrigan C. Presence and activity of nitric oxide synthase isoforms in ischemia-reperfusion injured flaps. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109(5): 1638-45.
24. Khiabani K, Kerrigan C. Differing flow patterns between is-chemically challenged flap skin and flap skeletal muscle: Implication for salvage regimens. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 220-6.
25. Isenberg J, Pappan L, Romeo M, Abu-Asab M, Stokos M, Wink D, Frazier W, et al. Blockade of thrombospondin-1-CD47 interactions prevents necrosis of full thickness skin grafts. *Ann Surg* 2008; 247(1): 180-90.
26. Efron D, Most D, Barbul A. Role of nitric oxide in wound healing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 197-204.