



Hospital Universitario La Paz

Comunidad de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

Tesis Doctoral

*Efecto del Sildenafil en la Prevención de
Trombosis tras Anastomosis Microquirúrgica:*

*Modelo Experimental
de
Sutura Trombogénica en Ratas*

Lorena F. Pingarrón Martín

Madrid, 2012

Directores

Javier Gavilán Bouzas

Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid

Catedrático de Otorrinolaringología de la Universidad Autónoma de Madrid

Luis Javier Arias Gallo

Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid

Manuel Chamorro Pons

Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid



Hospital Universitario La Paz

Comunidad de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Cirugía

Javier Gavilán Bouzas, Doctor en Medicina y Cirugía y Catedrático de Otorrinolaringología de la Universidad Autónoma de Madrid,

Luis Javier Arias Gallo, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid,

y

Manuel Chamorro Pons, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid,

directores de la tesis: “EFECTO DEL SILDENAFILO EN LA PREVENCIÓN DE TROMBOSIS TRAS ANASTOMOSIS MICROQUIRÚRGICA: MODELO EXPERIMENTAL DE SUTURA TROMBOGÉNICA EN RATAS ”

de la que es autora Doña Lorena F Pingarrón Martín, Licenciada en Medicina por la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZAN la presentación de la referida tesis para su defensa y mantenimiento, emitiendo el siguiente informe:

Que esta tesis doctoral constituye un trabajo de investigación original e inédito para optar al grado de doctor, con aportaciones no publicadas y de interés en la investigación aplicada en el ámbito de la microcirugía vascular y la reconstrucción microquirúrgica.

Y para que conste en el expediente correspondiente se expide la presente autorización,

en Madrid a 6 noviembre de 2012.

Javier Gavilán Bouzas

Luis Javier Arias Gallo

Manuel Chamorro Pons

*A Julio y María José,
a quienes debo todos mis logros.
Por su apoyo incondicional, por su amor, por su comprensión pese a no dedicarles todo
el tiempo que merecen
y por creer en mi
animándome a alcanzar mis ilusiones personales y profesionales.*

*A veces sentimos que lo que hacemos
es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota.*

Madre Teresa de Calcuta

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer y dedicar este trabajo, a todas las personas que me han apoyado durante mis años de formación como cirujana y que han vivido de cerca todo el esfuerzo, la ilusión y la pasión puesta en el día a día:

Al Dr.Luis Javier Arias, director de esta tesis doctoral y gran amigo, por su tenacidad por llegar siempre a la excelencia, por su ayuda diaria en lo personal y profesional, por ser fuente constante de motivación en mi residencia y por demostrarme que siempre podré contar con él.

Al Dr.Javier Gavilán, director de esta tesis, por haber sido un pilar fundamental en mi formación en el extranjero, por su disponibilidad e inestimable ayuda en la finalización de esta tesis y por llevar la cirugía oncológica española de cabeza y cuello más allá de las fronteras nacionales.

Al Dr.Manuel Chamorro, director de esta tesis, por creer y confiar en mi, por todas las oportunidades otorgadas en la práctica quirúrgica y por enseñarme las cualidades de un gran cirujano.

A mi familia, lo más importante de mi vida, a quienes dedico mis éxitos de ahora y de siempre.

A la Dra.Pilar Ruiz, por su apoyo, su alegría, su complicidad y su amistad extrema. Por haber hecho inolvidable e inmejorable esta etapa, compartir conmigo estos duros meses de trabajo y por conocerme y entenderme como nadie.

Al Dr.Miguel Burgueño, por dirigir mi residencia, permitirme compaginar la labor asistencial con la experimental y haberme dado el estímulo que necesitaba para autosuperarme.

Al Dr.Vicente Martorell, por sus enseñanzas fuera y dentro de quirófano, por la humanización constante del arte médico, por su apoyo, y ante todo por su amistad.

A la Dra.Teresa González, por demostrarme que es una gran amiga, por los momentos inolvidables vividos en los cinco años de mi residencia, por sus consejos, su cariño y por su entrega y perseverancia para formarme como cirujana.

A mis tutoras, la Dra.María José Morán y la Dra.Elena Gómez, por seguir mis pasos de cerca, por sus consejos y su cercanía.

A la Dra. Mercedes Martín, por instruirme en la patología infantil de la especialidad, preocupándose siempre por mi futuro personal y profesional.

A los Dres. Jose Luis Cebrián, Javier G.M.Moro, Gastón Demaría, Del Castillo, López-Arcas, Eurne, Nacho, Rocío, Natalia, Eduard, Paula, Jorge, María José (Pitita) y Dani. Por ser una gran familia durante la residencia, inmejorables compañeros, por aprender diariamente de todos ellos y por formar parte de una de las etapas más importantes de mi vida.

A la Dra. Carlota Largo, por su ayuda logística en la realización de esta tesis, por enseñarme que en la cirugía experimental prima el bienestar de los animales y por su gran disponibilidad.

A la Dra. Elia Pérez Fernández y la Dra.M^a Carmen Fernández Criado, por su inestimable colaboración en el trabajo estadístico y en la información histológica en el animalario.

A todo el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Hospital Universitario La Paz, por haber contribuido a mi formación como profesional y sobre todo por dejar en mi, un maravilloso recuerdo de mi etapa de residente.

Y por último, pero de la forma más especial por haber constituido el broche de oro en mi formación, al Dr.Julio Acero y al departamento dirigido por el Profesor Chenping Zhang del Ninth People's Hospital de Shanghai, quienes han hecho posible que haga realidad mi gran sueño de especializarme como cirujana oncológica.

ÍNDICE

ÍNDICE	6
ACRÓNIMOS	12
1. JUSTIFICACIÓN	17
2. INTRODUCCIÓN	21
2.1. ANATOMÍA VASCULAR DE LA RATA	22
2.1.1. ARTERIA FEMORAL	22
2.1.2. HISTOLOGÍA ARTERIAL	23
2.2. FISIOLOGÍA DE LA OCLUSIÓN VASCULAR	27
2.2.1. REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR	27
2.2.1.1. Regulación nerviosa	27
2.2.1.2. Regulación humoral	28
2.2.1.3. Regulación química	29
2.2.1.4. Mecanismos de autorregulación local.	30
2.2.2. TROMBOSIS	30
2.2.3. VASOESPASMO	41
2.3. AGENTES ANTITROMBÓTICOS	45
2.3.1. VASODILATADORES	45
2.3.1.1. Donantes de óxido nítrico (nitratos orgánicos)	45
2.3.1.1.1. Trinitrato de glicerilo o Nitroglicerina	45
2.3.1.1.2. Molsidomina (3- morfolinosidnonimina)	47
2.3.1.2. Papaverina	48
2.3.1.3. Nifedipino	50
2.3.1.4. Lidocaína	51
2.3.2. ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS	52
2.3.2.1. Aspirina	52
2.3.2.2. Inhibidores de la Glicoproteína IIb/IIIa	53
2.3.3. ANTICOAGULANTES	54
2.3.3.1. Heparina	54

2.3.3.2.	Antagonistas de la vitamina K	55
2.3.3.3.	Inhibidores del factor Xa	56
2.3.3.4.	Trombolíticos	57
2.3.4.	<i>EXPANSORES PLASMÁTICOS</i>	58
2.3.4.1.	Dextrano	58
2.4.	VEHÍCULOS PARA ANTITROMBÓTICOS	59
2.4.1.	<i>REQUISITOS DE LOS VEHÍCULOS DE AGENTES ANTITROMBÓTICOS</i>	59
2.4.2.	<i>TIPOS DE VEHÍCULOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS</i>	59
2.5.	SILDENAFILO	61
2.5.1.	<i>DIANAS TERAPÉUTICAS</i>	62
2.5.1.1.	DISFUNCIÓN ERÉCTIL	66
2.5.1.2.	PRESIÓN ARTERIAL	68
2.5.1.3.	FUNCIÓN ENDOTELIAL	70
2.5.1.4.	METABOLISMO DE LA GLUCOSA	71
2.5.1.5.	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO	72
2.5.1.6.	SILDENAFILO EN NEONATOLOGÍA	73
2.5.1.7.	SILDENAFILO EN ONCOLOGÍA	75
2.5.2.	<i>APLICACIÓN DEL SILDENAFILO EN CIRUGÍA RECONSTRUCTIVA</i>	76
2.6.	MODELOS EXPERIMENTALES DE OCLUSIÓN VASCULAR	78
2.6.1.	<i>El modelo de anastomosis trombogénica microvascular ideal</i>	78
2.6.2.	<i>Modelo del pliegue o "Tuck model"</i>	78
2.6.2.1.	Aplastamiento	79
2.6.2.2.	Arteriotomía	80
2.6.2.3.	Punto de pared posterior	80
2.6.2.4.	Modelo de estenosis	81
2.6.2.5.	Modelo de torsión vascular	82
2.7.	MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN	83
2.7.1.	<i>ESTIMACIÓN CLÍNICA DEL COLGAJO MICROVASCULARIZADO</i>	83
2.7.1.1.	Evaluación intraoperatoria de la permeabilidad	83

2.7.1.2.	Técnicas tradicionales o métodos clínicos no invasivos: constantes vitales del colgajo microvascular	83
2.7.1.3.	La fotografía estandarizada	83
2.7.2.	<i>MEDICIÓN DEL FLUJO VASCULAR</i>	84
2.7.2.1.	Ecografía Doppler	84
2.7.2.2.	Láser Doppler implantable	85
2.7.3.	<i>MEDICIÓN DE LA OXIGENACIÓN</i>	86
2.7.3.1.	Espectroscopia de infrarrojos.	86
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	88
4.	MATERIAL Y MÉTODO	91
4.1.	MATERIAL	92
4.1.1.	<i>ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN</i>	92
4.1.2.	<i>MATERIAL PARA LA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA</i>	92
4.1.2.1.	Material quirúrgico	92
4.1.2.2.	Material farmacológico	93
4.1.2.2.1.	Anestesia para el procedimiento quirúrgico	93
4.1.2.2.2.	Anestesia para la eutanasia	93
4.1.2.2.3.	Analgesia	93
4.1.2.2.4.	Fármacos de administración tópica	93
4.1.2.3.	Otro instrumental	94
4.1.3.	<i>MATERIAL PARA LA HISTOLOGÍA</i>	94
4.1.4.	<i>ORDENADOR, CÁMARA FOTOGRÁFICA Y SISTEMAS INFORMÁTICOS</i>	95
4.2.	MÉTODO	95
4.2.1.	<i>PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES</i>	95
4.2.2.	<i>ESTABLECIMIENTO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO</i>	96
4.2.3.	<i>PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO</i>	96
4.2.3.1.	Anastomosis microvascular	102
4.2.4.	<i>CUIDADOS POSTOPERATORIOS</i>	105

4.2.5.	<i>ESTUDIO MACROSCÓPICO Y FOTOGRAFICO</i>	106
4.2.6.	<i>MÉTODO DE EUTANASIA Y DISECCIÓN DE LA MUESTRA PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO</i>	106
4.2.7.	<i>ESTUDIO HISTOLÓGICO</i>	107
4.2.8.	<i>ESTUDIO ESTADÍSTICO</i>	108
5.	RESULTADOS	109
5.1.	INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA	110
5.2.	ESTUDIO MACROSCÓPICO	110
5.3.	ESTUDIO HISTOLÓGICO	115
5.3.1.	<i>ARTERIAS SIN TROMBOSIS</i>	115
5.3.2.	<i>ARTERIAS CON TROMBOSIS A LAS 24 HORAS</i>	119
5.3.3.	<i>ARTERIAS CON TROMBOSIS A LOS 7 DÍAS</i>	120
5.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	124
6.	DISCUSIÓN	126
6.1.	SITUACIÓN ACTUAL	127
6.2.	ELECCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL	127
6.2.1.	<i>LA RATA COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN</i>	127
6.2.2.	<i>MODELO DE SUTURA TROMBOGÉNICA</i>	130
6.3.	ELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE EVALUACIÓN	131
6.3.1.	<i>ELECCIÓN DEL COLGAJO INGUINAL</i>	132
6.4.	GRUPOS EXPERIMENTALES	134
6.4.1.	<i>GRUPO CONTROL</i>	134
6.4.2.	<i>GRUPO "TISSUCOL"</i>	135
6.4.3.	<i>GRUPO "PAPAVERINA"</i>	136
6.4.4.	<i>GRUPO "SILDENAFILO"</i>	138
6.5.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	139
		10

6.6. RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS RESULTADOS	140
7. CONCLUSIONES	142
8. RESUMEN	145
9. BIBLIOGRAFÍA	150
10. ANEXO A: TABLAS Y GRÁFICAS	167
11. ANEXO B: INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE BIENESTAR ANIMAL	176

ACRÓNIMOS

A: adventicia

AAS: ácido acetilsalicílico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosina difosfato

ALT: anterolateral thigh

AMP: adenosina monofostato

AMPc: adenosina monofostato cíclico

APC: proteína C activada

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

AT: antitrombina

ATP: adenosina trifosfato

AVK: antagonista de la vitamina K

[Ca²⁺]_i: concentración de calcio intracelular

CEC: circulación extracorpórea

CFTR: regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística

ECDGF: factor de crecimiento derivado de células endoteliales

EDRF: factor relajante derivado del endotelio

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

e-NOS: enzima óxido nítrico sintasa

Epac: exchange protein directly activated by cAMP

EPC: células progenitoras endoteliales

ET-1: endotelina-1

FDA: Food and Drug Administration

FDP: productos de degradación de la fibrina

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FMLV: fibras musculares lisas vasculares

FQ: fibrosis quística

FR: fenómeno de Raynaud

FT: factor tisular

FvW: factor von Willebrand

GAG: glucosaminoglicano

GC: guanilato ciclasa

GCa: guanilato ciclasa activada

GI: gastrointestinal

GMP: guanosín monofosfato

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

GP: glucoproteína integrina plaquetaria

HAP: Hipertensión Arterial Pulmonar

HBP: Hiperplasia Benigna de Próstata

HBPM: heparina de bajo peso molecular

HNF: heparina no fraccionada

I: túnica íntima

Ig: inmunoglobulina

INN: International Nonproprietary Name

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

i.v: intravenoso

kDa: kilodaltons

LEE: lámina elástica externa

LEI: lámina elástica interna

MCP: perforante músculo cutánea

NA: noradrenalina

Na⁺ : sodio

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

NOS-e: óxido nítrico sintasa endotelial

NP: péptido natriurético

NPR: natriuretic peptide receptor

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAF: factor activador de plaquetas

PAF-AH: acetilhidroxilasa del factor activador de plaquetas

PAI: inhibidor del activador de plasminógeno

PBWS: Purposeful Back-Wall Stitch.

PDE: fosfodiesterasa

PDE5: fosfodiesterasa tipo 5

PDE5-I: Inhibidor de la fosfodiesterasa tipo 5

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PF: factor plaquetario

PGI₂: prostaciclina

PKA: protein kinasa A

pKa: logaritmo decimal de la constante de disociación de un ácido con el signo cambiado. Valor del pH para el que el 50% del ácido está disociado

PKG: protein kinasa G

PL: fosfolípidos

s.c: subcutáneo

SK: streptokinasa

STTH: síndrome de trombocitopenia y trombosis inducido por heparina

t-AP: activador tisular del plasminógeno

TAFI: thrombin activable fibrinolysis inhibitor

TFPI: inhibidor de la vía del factor tisular

TIH: trombocitopenia inmune mediada por heparina

TM: túnica media

TP: tiempo de protrombina

TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado

u-AP: activador urinario del plasminógeno

UK: urokinasa

U-46619: agonista del tromboxano A₂

5-HT: 5-hidroxitriptamina=serotonina

1. JUSTIFICACIÓN

La trombosis de las anastomosis vasculares en el campo de la microcirugía reconstructiva es un problema clínico de extraordinaria relevancia por el grave perjuicio que supone para el paciente.

Actualmente, la reconstrucción con colgajos libres microvascularizados desempeña un papel fundamental en la cirugía oncológica y reconstructiva, siendo las técnicas de anastomosis microquirúrgica una parte consustancial a este tipo de intervenciones.

El fracaso de los procedimientos microvasculares se relaciona estrechamente con la trombosis y/o con el espasmo vascular en el sitio de la anastomosis. Las turbulencias locales del flujo sanguíneo y la hiperreactividad de la pared vascular, así como la activación plaquetaria, juegan un papel crítico en la obstrucción del flujo en la zona anastomótica.

El principal responsable de la oclusión vascular parece ser la falta de una técnica microquirúrgica impecable, puesto que los grupos con más experiencia en reconstrucción tienen menos fracasos que los equipos menos experimentados. Sin embargo, es un hecho el que todos los equipos refieren un porcentaje de fracasos (1-10%) debido a problemas técnicos, patología vascular, injertos vasculares de interposición, radioterapia previa o estados de hipercoagulabilidad o estasis vascular.

No existe un protocolo farmacológico unánime para prevenir la trombosis microvascular, pero están descritas las características del agente antitrombótico ideal, que sería aquel con: 1) alta actividad específica por el área trombótica del vaso; 2) ausencia de efectos secundarios hemorrágicos locales ; 3) ausencia de alteraciones sistémicas de la coagulación; 4) baja toxicidad; 5) aplicación única; 6) fácil método de administración.

Pese a que más de 20 agentes farmacológicos se han utilizado, la aspirina y la heparina siguen siendo la principal base del tratamiento antitrombótico en microcirugía.

Debido a la escasa unificación de la literatura científica, la terapia farmacológica continúa practicándose de modo muy diferente según los centros médicos, con diferentes fármacos y pautas. gran variedad interpersonal en cuanto a fármaco, dosis y tiempo de administración.

Existen múltiples estudios en animales en la literatura, pero escasos estudios clínicos prospectivos en humanos al respecto, y hasta el momento, ninguno ha conseguido resultados concluyentes que determinen un protocolo de anticoagulación eficaz, de manera que no existen protocolos internacionales sobre la utilización de anticoagulantes en injertos libre microvascularizados.

El sildenafil es un inhibidor competitivo selectivo de la fosfodiesterasa 5 (PDE5), enzima que inactiva el GMPc. El GMPc es un potente vasodilatador del músculo liso vascular. La PDE5 se encuentra principalmente en las plaquetas, el músculo liso y el cerebelo . El sildenafil ha demostrado su acción de relajación vascular sobre el sistema vascular periférico y su capacidad in vivo de reducir la agregación plaquetaria, mejorando la vascularización de colgajos locales experimentales con vascularización aleatoria, administrado vía oral, intraperitoneal y local en el colgajo. Sin embargo, nunca se ha utilizado por vía tópica este fármaco en el sitio de la anastomosis vascular.

La papaverina es un alcaloide del opio, cuyo efecto vasodilatador hace que sea actualmente el más ampliamente utilizado en administración tópica. Su potente acción vasodilatadora se debe a la inhibición de la fosforilación oxidativa y al flujo del calcio durante la contracción muscular.

No existe ningún estudio hasta la fecha sobre el efecto del sildenafil en las anastomosis microvasculares, ni en el ámbito experimental ni en el ámbito clínico. Resulta por ello interesante efectuar tal estudio, comparando el sildenafil con la papaverina, un fármaco utilizado con frecuencia en la microcirugía clínica en el humano, y que ha demostrado

en modelos experimentales su utilidad como vasodilatador cuando se aplica localmente.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ANATOMÍA VASCULAR DE LA RATA Sprague Dawley: (1,2)

2.1.1. ARTERIA FEMORAL (FIGURA 1)

La arteria femoral es la continuación de la arteria ilíaca externa, que cambia de nombre al salir por el anillo crural o laguna vasculorum.

Cruza la cara anterior del muslo y termina en el anillo del tercer aproximador, en donde cambia de nombre pasando a denominarse arteria poplítea (que a su vez continúa hacia la articulación del tobillo como arteria safena).

Se distinguen en ella la porción inicial o arteria femoral común y sus dos ramas terminales,

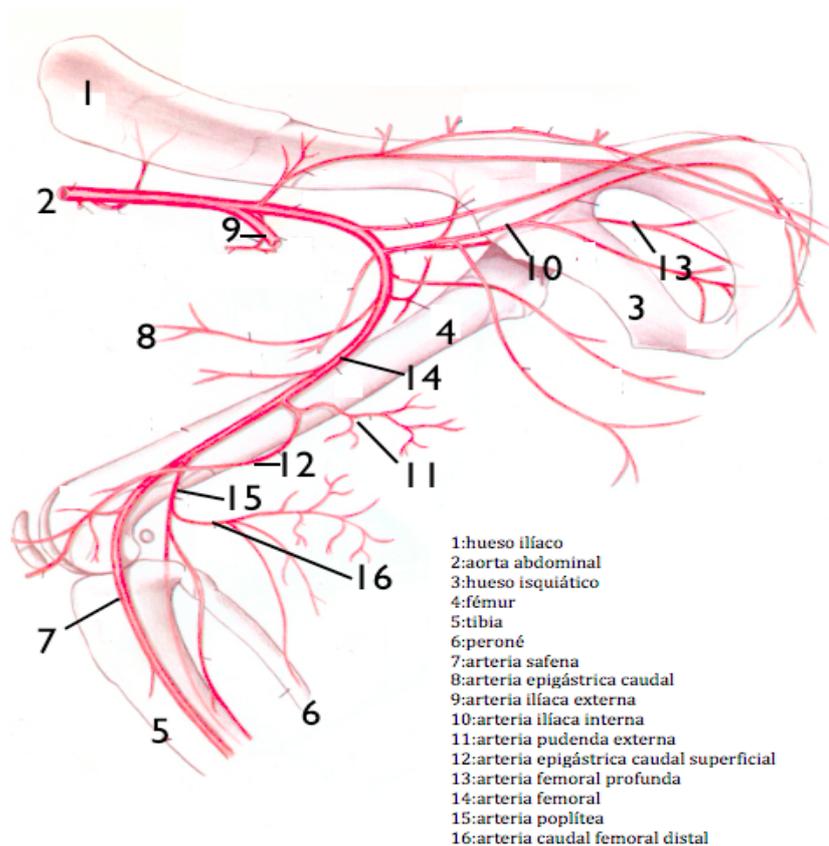


Figura 1. Ramas principales arteriales de las extremidades posteriores de la rata (1).

femoral profunda y femoral superficial.

2.1.2. HISTOLOGÍA ARTERIAL

En la rata, la histología de la pared de los vasos es extrapolable al humano.

El flujo de sangre a los distintos órganos y tejidos se regula mediante las variaciones del diámetro de los vasos de distribución, función desempeñada por el músculo liso dispuesto de manera circunferencial alrededor de las paredes vasculares y que está controlado principalmente por el sistema nervioso autónomo y las hormonas de la médula suprarrenal.

Las paredes de los vasos arteriales poseen la estructura general de tres capas del aparato circulatorio, pero se caracterizan por la presencia de una cantidad considerable de fibras de elastina y de una capa de músculo liso bastante gruesa con relación al diámetro de la luz. Existen tres principales tipos de vasos arteriales: (3)

-Arterias elásticas: forman los vasos principales de distribución y son la aorta, el tronco braquicefálico, las arterias carótica primitiva y subclavia izquierdas y la mayor parte de los vasos arteriales pulmonares.

-Arterias musculares: son las ramas principales de distribución del árbol arterial, por ejemplo, las arterias radial, femoral, coronaria o cerebrales, cuyo diámetro oscila entre 0.8-1.1 mm.

-Arteriolas: son las ramas terminales del árbol arterial que llevan la sangre a los capilares. Su diámetro es menor a 0.3 mm.

Entre los tres tipos de vasos arteriales existe una transición gradual, más que una delimitación brusca. En general, la cantidad de tejido elástico disminuye a medida que el vaso se va haciendo menor, al mismo tiempo que el componente muscular liso va adquiriendo una importancia progresivamente mayor.

La arteria femoral de la rata tiene una estructura básica de arteria muscular con una capa

de tejido elástico que se limita a una lámina elástica fenestrada y bien definida, la lámina elástica interna (LEI), que separa las tunicas íntima y media, y otra lámina elástica externa (LEE) menos definida, situada en la unión entre las tunicas media y adventicia. A veces, la lámina elástica interna se duplica (4).

La íntima (I) suele ser tan fina que resulta indistinguible con visión microscópica menor de 40x .

La túnica media (TM) está formada por una gruesa capa de músculo liso dispuesto circunferencialmente.

La ancha túnica adventicia (A) está formada principalmente por colágeno y contiene pequeños vasa vasorum que penetran en la mitad externa de la túnica media. (Figuras 2 y 3). (3,4)

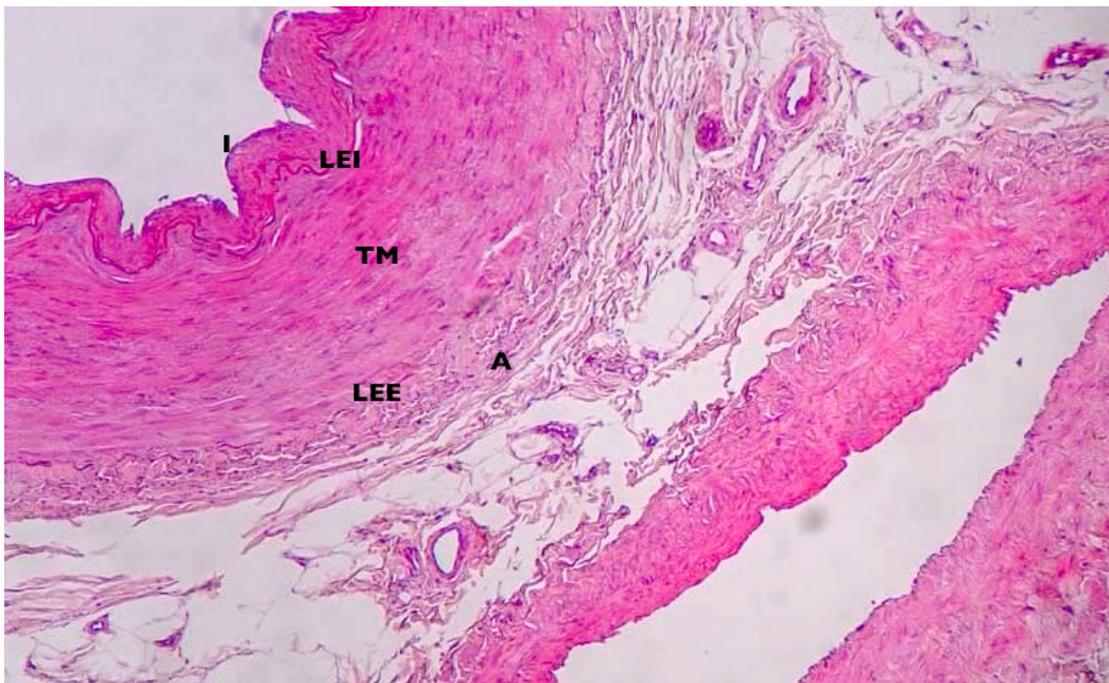


Figura 2 Corte transversal de la arteria femoral de rata en la que se delimitan sus componentes (3).

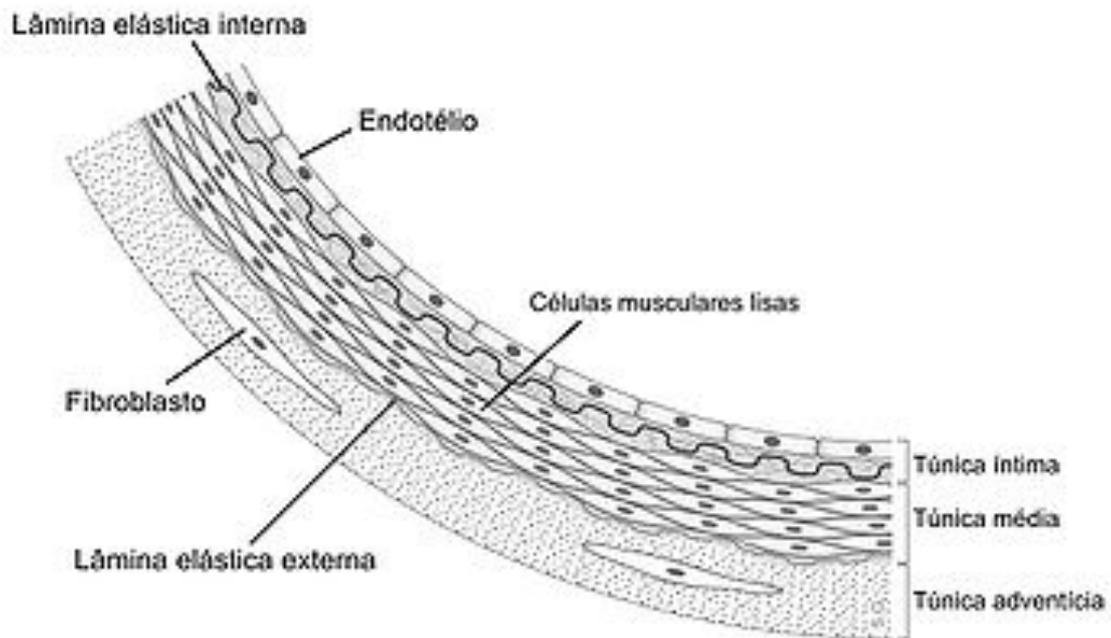


Figura 3. Diagrama de las capas de la pared de una arteria muscular en la rata (4).

En la pared de la arteria se distinguen tres capas, una interna, una media y otra externa: La capa íntima o interna se caracteriza por un fino endotelio, apoyado en su membrana. En la segunda capa destacan dos componentes: fibras elásticas, células principalmente musculares lisas y células del tejido conjuntivo (fibroblastos). Las fibras se disponen en dos direcciones en sentido circular, más internamente, y en sentido longitudinal. La capa externa está formada por fibras elásticas y fibras de colágeno. Distinguimos dos tipos de arterias dependiendo del contenido de fibras elásticas o células musculares. Hablamos de arterias elásticas, cuando la capa media contiene un predominio en fibras elásticas y hablamos de arterias musculares cuando predominan células musculares. Las arterias elásticas se encuentran en los grandes troncos arteriales o troncos de conducción. Presentan una gran elasticidad. Las arterias musculares son arterias principalmente de distribución mediante la vasodilatación y la vasoconstricción.

Permiten distribuir según las necesidades. Esta capa muscular va a recibir una rica inervación de nervios simpáticos, que van a tener receptores α y receptores β . Los receptores α producen vasoconstricción y los receptores β responden a noradrenalina con vasoconstricción.

La estructura del sistema venoso sigue la disposición general en tres capas de todo el aparato circulatorio, pero sus componentes elástico y muscular son mucho menos prominentes. Una parte importante del volumen sanguíneo total se encuentra en el interior del sistema venoso. Las variaciones del volumen sanguíneo relativo debidas, por ejemplo, a la dilatación de los lechos capilares o a una hemorragia pueden ser compensadas por cambios de la capacidad del sistema venoso. Estos cambios se producen por acción del músculo liso de la túnica media que controla el diámetro de las luces de las venas y vénulas musculares.

La vena de la rata tiene las siguientes características, visibles en micrografía:

- La I apenas es algo más que el revestimiento endotelial; en las venas que no están distendidas por la sangre, el endotelio puede proyectarse en pequeños pliegues.
- La TM es fina en comparación con la de las arterias y consiste en dos o más capas de fibras musculares lisas dispuestas circularmente.
- La A es la más ancha de la pared del vaso y está formada por gruesas fibras de colágeno dispuestas longitudinalmente y que se fusionan con el tejido colágeno adyacente.

La pared de la vena es fina en comparación al diámetro de la luz. Por el contrario, en la mayoría de las arterias el grosor de la pared es parecido al diámetro de la luz.

2.2. FISIOLÓGÍA DE LA OCLUSIÓN VASCULAR

2.2.1. REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR (5)

2.2.1.1.Regulación nerviosa

Encontramos dos características de importancia en cuanto a la regulación nerviosa de la circulación: • Es un sistema de control que funciona con extraordinaria rapidez. • El SN proporciona un medio para controlar gran parte de la circulación de forma simultánea.

El sistema de control nervioso de la actividad vascular consta de 3 elementos fundamentales: • Receptores o sensores encargados de reconocer el estado circulatorio.

• Grupos neuronales del SNC que reciben aferencias desde receptores y generan impulsos eferentes. • Tejidos efectores, a nivel cardíaco y vascular (musculatura lisa de vasos sanguíneos).

Ante los aumentos o disminuciones de la presiones arterial el centro cardiovascular va a intentar regular la presión arterial por medio del sistema nervioso vegetativo (sistema nervioso simpático y parasimpático).

En el corazón, el sistema nervioso parasimpático va a producir una disminución de la presión arterial. El sistema nervioso simpático va a producir por el contrario, aumentos de la frecuencia cardiaca y aumentos de la presión arterial.

En los vasos periféricos, el sistema nervioso parasimpático tiene muy poca actuación siendo principalmente el sistema nervioso simpático, de donde emergen los nervios o fibras nerviosas motoras, que van a ir formando un plexo que rodea a las arterias. Este plexo de fibras simpáticas perivasculares tiene un componente vasoconstrictor que presenta receptores α adrenérgicos, abundantes en piel y vísceras abdominales y un componente vasodilatador con receptores β adrenérgico, que abundan en el corazón y músculos esqueléticos.

2.2.1.2.Regulación humoral

Aunque los mecanismos nerviosos regulan la actividad circulatoria de una forma rápida, también acaban adaptándose con rapidez y por ello se hacen necesarios otros mecanismos alternativos que puedan ejercer una función reguladora a largo plazo. En este sentido consideramos una serie de sustancias que presentan efectos claros sobre el sistema circulatorio:

- *Catecolaminas*. La noradrenalina es un vasoconstrictor especialmente potente, la adrenalina lo es en menor medida e incluso llega a producir vasodilatación ligera en algunos casos como sucede en las arterias coronarias durante los aumentos de la actividad cardíaca.
- *Sistema renina-angiotensina*. La angiotensina-II produce vasoconstricción generalizada, eleva la presión arterial, estimula la actividad nerviosa simpática y aumenta la reabsorción renal de sodio y agua. Tiene un efecto importante sobre todo en aquellas situaciones en las que la hipotensión viene acompañada de un descenso del volumen plasmático como los que se dan por hemorragia y deshidratación.
- *Vasopresina* o *ADH*. La vasopresina tiene un potente efecto vasoconstrictor y además, promueve un aumento en la reabsorción de agua en túbulos renales. Sin embargo, se secreta sólo en cantidades muy pequeñas por lo que se le atribuye un papel muy limitado en el control vascular. Cobra más importancia en algunas formas de hipotensión provocadas por reducción de la volemia, en las que actúa para mantener la presión sistólica junto con el sistema simpático y el sistema renina-angiotensina.
- *Bradicinina*. Provoca una poderosa dilatación arteriolar y un aumento de la permeabilidad capilar, además interviene en la regulación del flujo sanguíneo de la piel, glándulas salivales e intestinales.
- *Serotonina* o *5-HT*. Localizadas en altas concentraciones en tejido cromafínico de

intestino y en plaquetas, puede tener efectos vasoconstrictores y vasodilatadores según el estado y área de la circulación. Sus funciones en la regulación de la circulación son poco conocidas.

- *Histamina*. Procede de los mastocitos de tejidos dañados y de basófilos sanguíneos. Tiene un poderoso efecto vasodilatador sobre arteriolas y produce un aumento de la permeabilidad capilar.
- *Prostaglandinas*. Pueden tener efecto vasodilatador, como la prostaglandina E2, y acción vasoconstrictora como el tromboxano A2. No es bien conocida la función específica de estas sustancias en el control circulatorio pero parecen tener importancia en el control de zonas vasculares locales.
- *Péptido natriurético atrial (NP)*. El NP es sintetizado en los miocitos auriculares y liberado a la circulación sistémica por cambios en la pared auricular, como los que acontecen en la distensión auricular pasiva. Además de sus efectos natriuréticos y diuréticos, el PNA posee un efecto relajante de la musculatura lisa vascular sobre todo si se halla previamente contraída por acción de la noradrenalina o de la angiotensina-II.

2.2.1.3.Regulación química

Además de las sustancias anteriormente mencionadas, *factores químicos* diversos pueden provocar modificaciones en la actividad de los vasos sanguíneos y aunque no se conocen las funciones que desempeñan en la regulación global de la circulación, sus efectos específicos pueden resumirse a continuación:

- *Calcio*. Un aumento de la concentración de iones Ca^{2+} provoca vasoconstricción al estimular la contracción de la musculatura lisa.
- *Potasio*. Un incremento de la concentración de iones K^{+} provoca vasodilatación al inhibir la contracción de la fibra muscular lisa.

- *Magnesio*. Un incremento de la concentración de iones Mg^{2+} origina intensa vasodilatación al inhibir el músculo liso.

2.2.1.4. Mecanismos de autorregulación local.

Van a ser principalmente activos ante las diferentes concentraciones de O_2 , de forma que ante un aumento del metabolismo celular, siempre hay un aumento del flujo sanguíneo y de la presión arterial. Este aumento del flujo sanguíneo se realiza por medio de sustancias vasoactivas producidas por leucocitos, plaquetas, fibroblastos, macrófagos y células musculares, siendo las principales sustancias vasoactivas el óxido nítrico, el ácido láctico y la adenosina, todas ellas con efecto vasodilatador. Las principales sustancias vasoconstrictoras son los radicales libres producidos en el estrés oxidativo de las células.

2.2.2. TROMBOSIS

La enfermedad tromboembólica es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del ser humano. La trombosis es la causa más común de infarto de miocardio y de ictus isquémico (6). Además, es también la causa más frecuente de fracaso del injerto en microcirugía reconstructiva.

El proceso de trombosis arterial se inicia tras una lesión endotelial, cuando las plaquetas de adhieren a la pared del vaso dañado.

El sistema de la coagulación está normalmente inactivo pero se activa en pocos segundos después de la lesión. El estímulo que desencadenará la activación de la hemostasia es la lesión endotelial, la cual permite el contacto de la sangre con el tejido conectivo subendotelial. La respuesta hemostática incluye tres procesos: **a) la**

hemostasia primaria, b) la hemostasia secundaria y c) la fibrinólisis; existiendo siempre una interacción entre la pared vascular y la sangre. La respuesta hemostática no es un proceso que dependa sólo de la sangre (plasma y elementos formes); también juegan un papel determinante la pared vascular y la interacción entre ambos.

La interpretación del proceso de coagulación publicada por MacFarlane en 1964 (7) («Cascada de MacFarlane») ha sido de gran utilidad durante muchos años para empezar a entender el complejo problema de la formación del trombo. Según MacFarlane, habría dos vías, *la extrínseca*, formada por el factor tisular y el factor VII; y *la intrínseca*, en la que participan los factores XII, XI, IX, VIII y V (Figura 4).

Ambas vías convergen para activar el factor X y continuar conjuntamente el proceso de transformación de la protrombina en trombina y, a través de la trombina, del fibrinógeno en fibrina. Por otra parte, el papel de la plaqueta para terminar en agregación se consideraba un proceso independiente.

A partir de MacFarlane, durante las tres décadas siguientes han tenido lugar múltiples investigaciones, que se dan lugar en 1994 a las publicaciones casi simultáneas de Schafer (8) y Monroe (9). Ambos autores coinciden para presentar una «nueva cascada» (Figura 5), que ha sido aceptada internacionalmente, como demuestra el documento reciente de la Task Force de la Sociedad Europea de Cardiología (6).

Las aportaciones a la cascada clásica son las siguientes:

1. El complejo formado por el factor tisular y el factor VII participa en la activación del factor IX, por lo que las dos vías de la coagulación, intrínseca y extrínseca, van unidas casi desde el inicio del proceso.
2. El proceso completo no se realiza de forma continua, sino que son precisas tres fases

consecutivas; inicial, de amplificación y de propagación. En las dos últimas participan activamente la plaqueta y la trombina.

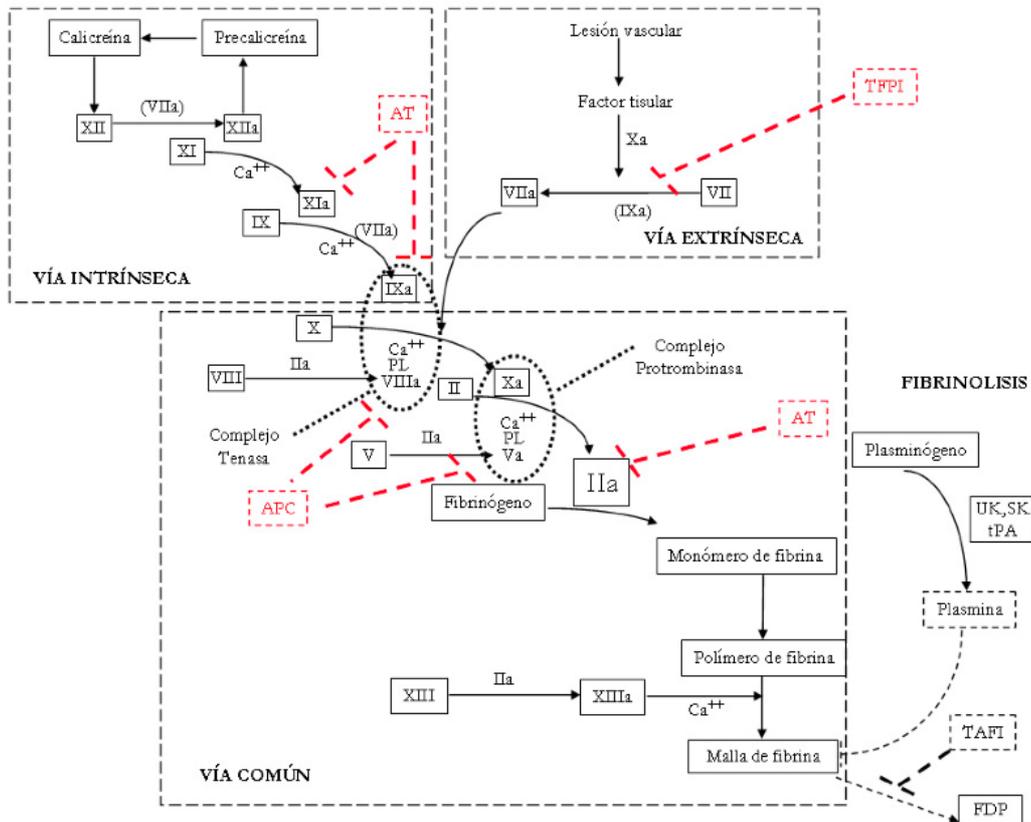


Figura 4 Concepto clásico de la cascada de coagulación. La coagulación se puede desencadenar por dos mecanismos independientes, la vía extrínseca o la intrínseca, que convergen en una vía común, y dan lugar a la generación de trombina, lo cual generará una malla insoluble de fibrina que estabilizará el tapón plaquetario formado. Los mecanismos fibrinolíticos, mediados por la plasmina, degradarán esta malla de fibrina (7).

APC=Activated Protein C, AT=Antitrombina, FDP=Fibrin Degradation Products, SK=Streptokinasa, TAFI=Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor, TFPI=Tissue Pathway Inhibitor, tPA=Tissue Plasminogen Activator, UK=Urokinasa

Fase de amplificación

La trombina así formada, junto con el calcio de la sangre y los fosfolípidos ácidos que provienen de las plaquetas, participa activamente en un proceso de retroalimentación para la activación de los factores XI, IX, VIII y V y, de forma especial, para acelerar la activación de las plaquetas. Simultáneamente, por mecanismos quimiotácticos, los factores mencionados son atraídos a la superficie de las plaquetas donde tienen lugar de forma muy rápida importantes procesos de activación y multiplicación (10).

Fase de propagación

La amplificación del proceso por mecanismos de retroalimentación entre trombina y plaqueta y la activación de todos estos factores permiten activar grandes cantidades del factor X y formar el complejo protrombinasa para convertir la protrombina en trombina y, a expensas de ésta, el fibrinógeno en fibrina. El proceso final, siempre en la superficie de la plaqueta, se acelera para generar de forma explosiva grandes cantidades de trombina y fibrina (10). (Figura 6).

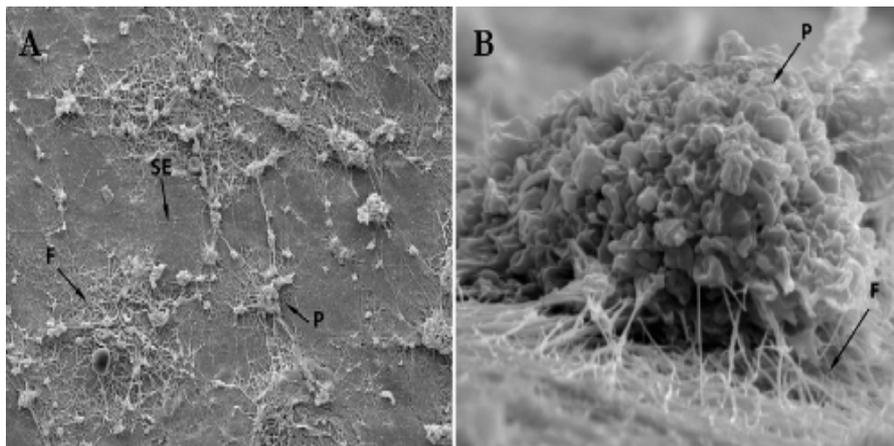


Figura 6 (10): Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de segmentos vasculares perfundidos con sangre entera durante 10 minutos. A) Las plaquetas (P) se depositan sobre el subendotelio (SE) expuesto, mientras paralelamente se forma una malla de fibrina (F) que estabiliza el tapón plaquetario. B) Detalle a mayor aumento.

Papel de las plaquetas

Aunque las plaquetas son los principales elementos celulares que intervienen en la hemostasia, otras células sanguíneas, como los eritrocitos y los leucocitos también juegan un papel importante en el proceso. Incluso las micropartículas procedentes de estas células, que tradicionalmente se habían considerado “platelet’s dust” desempeñan un papel fundamental en los nuevos modelos de hemostasia como transportadoras de FT circulante (Figura 7) (11).

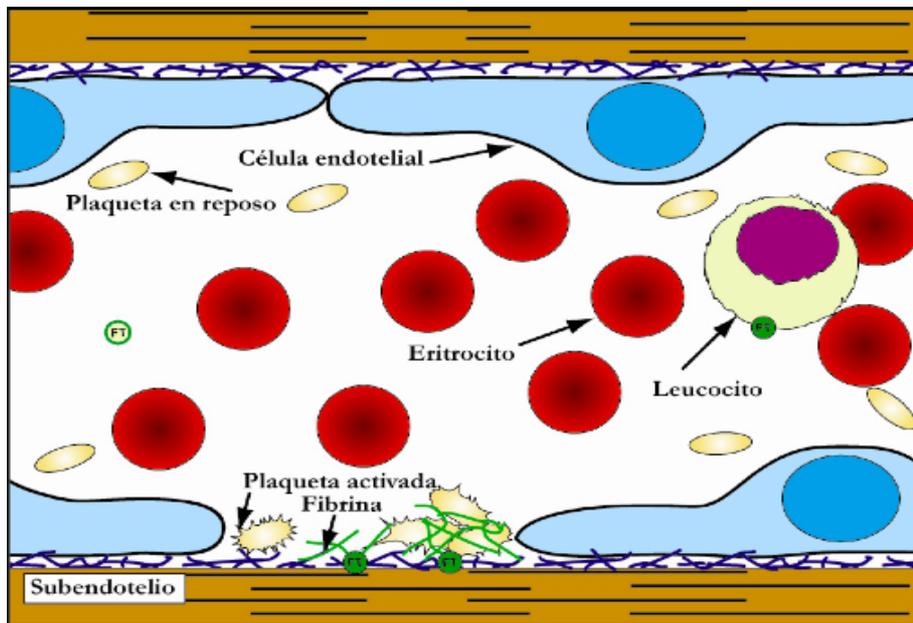


Figura 7 En condiciones fisiológicas la sangre circula sin interactuar con la pared de los vasos. Cuando se produce una lesión vascular, se activan los mecanismos hemostáticos mediados por las plaquetas y el sistema de coagulación, pero en los que también intervienen los leucocitos, los eritrocitos y micropartículas de origen diverso (8).

La activación plaquetaria altera la permeabilidad de la membrana y permite la entrada del calcio y la salida de sustancias quimiotácticas, que atraen a los factores de la

coagulación a su superficie.

La nueva cascada de la coagulación presenta la formación de fibrina como resultado conjunto de dos procesos: coagulación (representado por la trombina) y actividad de la plaqueta, que mutuamente se complementan. La inhibición profunda y combinada de ambos procesos conduce necesariamente a hemorragias severas, sin embargo, la combinación de fármacos inhibidores de ambos procesos en dosis correspondientes al nivel inferior del rango terapéutico puede conseguir un efecto antitrombótico efectivo sin riesgo de hemorragias. Los estudios clínicos realizados por el Grupo de Trabajo Trombosis de la Sociedad Española de Cardiología con inhibición moderada de la protrombina y de la actividad de la plaqueta son un ejemplo de la aplicación clínica de la nueva cascada y pueden representar el punto de partida de investigaciones que encuentren la combinación y la dosificación ideales de ambos fármacos para alcanzar el deseado equilibrio entre prevenir a la vez trombosis y hemorragia.

En las últimas décadas, se han producido grandes avances en el conocimiento de las bases moleculares celulares de la formación del trombo, siendo la terapia anticoagulante la piedra angular para la prevención y tratamiento de los trastornos tromboembólicos (6,9,12).

Los anticoagulantes convencionales, como la heparina no fraccionada (HNF), las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y los antagonistas de la vitamina K (AVK) (warfarina y acenocumarol), actúan sobre múltiples factores de la cascada de la coagulación.

Las heparinas ejercen su efecto anticoagulante al unirse a la antitrombina (AT) a través de un pentasacárido, lo que aumenta la capacidad de la AT para inhibir el factor Xa, la trombina y otros factores.

El efecto anticoagulante de los AVK se alcanza por interferir en la interconversión

cíclica de la vitamina K y su 2,3 epóxido, lo que lleva a la producción hepática de factores de la coagulación parcialmente carboxilados y descarboxilados (VII, IX, X y II) con la actividad coagulante reducida (13).

Aunque efectivos, estos agentes tradicionales asocian varios inconvenientes, incluyendo la administración vía parenteral o el necesario control rutinario de la coagulación para el ajuste de dosis. Los recientes esfuerzos en la búsqueda de nuevos enfoques de la anticoagulación se han centrado en una sola diana terapéutica enzimática dentro de la vía de la coagulación, como la trombina y el Factor Xa, de forma que la inhibición de cualquiera de estas enzimas atenúe la formación de fibrina.

Los estudios clínicos en terapia antitrombótica con antagonistas del receptor GPIIb-IIIa plaquetario u otros medios profibrinolíticos, no son concluyentes y suelen estar asociados a una alta incidencia de sangrado.

Por otro lado, los donantes de NO estimulan a la enzima guanilacetilciclase (GC) que acelera la formación de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en guanosina trifosfato (10).

Si esto sucede en las plaquetas del torrente sanguíneo, las plaquetas reducen su capacidad total y por lo tanto se observan efectos antitrombóticos. Si la estimulación de la GC se produce en las células del músculo liso de los vasos sanguíneos, el resultado es una vasodilatación y disminución de la presión arterial (11). El GMPc se degrada a guanosina monofosfato que no tiene los efectos anteriores del GMPc. Este proceso se ve reforzado por la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) (14).

El sildenafil es un nuevo fármaco que inhibe la PDE5 y por lo tanto es capaz de mantener altos los niveles de GMPc celulares. La aplicación combinada de los donantes de NO y los inhibidores de la PDE5 debería generar un efecto aditivo (o incluso superaditivo) con respecto a la inhibición de la trombosis y /o la reducción de la presión

arterial (15).

La trombosis arterial, generalmente formada en áreas de alto flujo o flujo turbulento o en áreas de ruptura plaquetaria, se compone de manera primaria de agregados plaquetarios unidos por puentes de fibrina; tanto la cascada de la coagulación como la activación plaquetaria son importantes en la trombogénesis.

La trombosis venosa, por otro lado, se origina en áreas de estasis y se compone principalmente de glóbulos rojos y fibrina, y en menor medida, de plaquetas; por tanto, la cascada de la coagulación juega un papel mucho más prominente en su etiología, que la activación plaquetaria (16).

La oclusión vascular se produce si el aclaramiento de las plaquetas comienza a producirse a un ritmo más rápido que la deposición. A partir de esta afirmación se especula que una capa inicial de plaquetas activadas ligadas al factor de von Willebrand, tapizaría las capas de la superficie endotelial y los alrededores de la anastomosis. La agregación de esta capa con las plaquetas circulantes es poderosamente inhibida por la glicoproteína IIb / IIIa, con cuyo efecto se conseguiría una prevención de la oclusión durante estas primeras etapas críticas.

El reimplante de una extremidad amputada, la revascularización y la transferencia de tejido microvascularizado, están condicionadas por una variedad de eventos fisiopatológicos que determinan la permeabilidad de los vasos anastomosados y por tanto la supervivencia del tejido. Esencialmente la permeabilidad de una anastomosis vascular esta determinada por *factores intraluminares* y *factores extraluminares*, los cuales pueden reducir el flujo hemático al tejido transplantado reduciendo la luz del vaso, causando la formación de coágulos en el interior del mismo o pudieran coexistir ambos mecanismos(16,17):

a)Factores extraluminare: Son consecuencia de variaciones en la pared vascular o en el tejido extravascular. Es importante tener en cuenta que el tejido revascularizado está denervado por lo que no tiene una respuesta adecuado a la estimulación simpática. La manipulación quirúrgica, el frío o la actividad refleja puede causar espasmo vascular. La presión del tejido extravascular puede aumentar por edema, por una prolongada isquemia o por un drenaje venoso inadecuado y producir una presión externa suficiente como para obstruir el vaso.

El flujo hemático en el tejido transplantado responde a la ley de Laplace y de Hagan Poiseuille:

Ley de Laplace: $P= 2T/ R$

Ley de Poiseuille: $F=\Delta P.\pi.R^4 /8.n.l$

(P= presión intraluminal, T= tensión de la pared del vaso, R= radio, F= flujo, ΔP = diferencia de presión entre las dos extremidades del vaso, n= viscosidad, l= largo del vaso).

La ley de Laplace establece que la presión intraluminal necesaria para mantener el vaso permeable es directamente proporcional a la presión ejercida del tejido circundante al tono vascular e inversamente proporcional al radio del vaso (17).

La ley de Hagan Poiseuille establece que el flujo a través de un vaso es proporcional a la diferencia de presión entre las dos extremidades del vaso (presión de perfusión) y a la cuarta potencia del radio del vaso e inversamente proporcional a la viscosidad. El hecho de que el flujo sea proporcional a la cuarta potencia del radio del vaso implica que una modesta vasoconstricción, la cual puede verse en el curso de una hipovolemia o hipotermia ligera, puede causar una dramática reducción del flujo hemático en el tejido reimplantado.

El mantenimiento de un flujo sanguíneo adecuado a través de la anastomosis

microvascular está determinado básicamente por cuatro requisitos que explicamos a continuación: 1. Máxima dilatación de la anastomosis vascular, 2. Adecuada presión de perfusión, 3. Adecuado volumen intravascular, 4. Baja viscosidad sanguínea.

Teniendo en cuenta la ley de Laplace y la ley de Poiseuille, se hace evidente que el primer requisito indispensable para asegurar un flujo adecuado al tejido transplantado es mantener una dilatación máxima en los vasos anastomosados; por lo que es esencial prevenir toda posible causa de vasoconstricción generalizada (17).

b)Factores intraluminares: Como se explicó anteriormente, el flujo hemático es proporcional a la presión de perfusión, que depende a su vez de la presión sistémica.

Una presión arterial adecuada, varía de un paciente a otro y puede estar en relación con una historia de hipertensión preoperatoria, con la edad, el volumen intravascular y la existencia o no de arteriosclerosis. Si la presión arterial desciende por debajo de este valor adecuado, se produce una disminución de la presión de perfusión con una estimulación del sistema renina-angiotensina y del sistema de la vasopresina, con la consecuente vasoconstricción generalizada. Por lo que el segundo y tercer requisito para asegurar un adecuado flujo hemático al tejido transplantado son: el mantenimiento de una adecuada presión de perfusión y el mantenimiento de un adecuado volumen intravascular (18).

La viscosidad de la sangre es otro factor determinante y depende principalmente del hematocrito, una reducción del mismo (hemodilución normovolémica) aumenta el flujo hemático a través de las anastomosis. Otros factores que pueden influir en la viscosidad de la sangre son: incremento en el plasma del fibrinógeno y macroglobulinas e infusión de fluidos de alto peso molecular.

El cuarto requisito para asegurar un adecuado flujo hemático al tejido injertado es

mantener una baja viscosidad sanguínea y esto puede lograrse reduciendo el nivel del hematocrito entre un 25 % y un 30 % (18) .

La trombosis es probablemente el factor intraluminal más importante de compromiso del flujo hemático en el vaso anastomosado, con una frecuencia de aparición entre un 10 % a un 20% de los casos (16). El evento desencadenante es una lesión oculta de la intima del vaso que causa una agregación plaquetaria y por ende una obstrucción vascular. Están implicados en este evento numerosos mediadores liberados por la célula endotelial o hemática como son: ATP, serotonina, factor plastrínico, metabolitos del ácido araquidónico, factor humoral (endotelina). Cuando este fenómeno se establece, el flujo sanguíneo no puede ser reestablecido ni aún después de una eficaz revisión de la anastomosis (fenómeno de no reflujo).

Por lo que el *quinto requisito* para mantener la permeabilidad vascular es prevenir la adhesión y la agregación plaquetaria a la pared vascular a través de medidas mecánicas y farmacológicas (19).

2.2.3. VASOESPASMO

El endotelio vascular ejerce múltiples funciones: a) Constituye una barrera entre la sangre y las FMLV (fibras musculares lisas vasculares) que impide el paso de macromoléculas y elementos formes de la sangre. b) Regula el tono vascular a través de la liberación de sustancias vasoconstrictoras (Angiotensina II, catecolaminas, vasopresina, tromboxano A₂, serotonina, trombina, endotelinas, anión superóxido y /o vasodilatadores (NO, EDRF, prostaglandina E₂, histamina. Adenosina, factor natriurético atrial, heparinas). c) Modula el crecimiento y remodelado de los vasos sanguíneos al liberar factores de crecimiento (PDGF, FGFs, TGFB1, endotelial-ECDF, epidérmico-EGF, insulín-like, endotelinas, angiotensina II) que además

presentan efectos vasoconstrictores. En general, los factores vasoconstrictores de origen endotelial también ejercen efectos tróficos, mientras que los factores vasodilatadores inhiben el crecimiento celular. d) Mantiene la fluidez sanguínea al liberar sustancias con propiedades anticoagulantes (trombomodulina, heparan-sulfato), fibrinolíticas (activador tisular del plasminógeno, inhibidor del activador del plasminógeno-PAI, fvW) e inhibidoras de la activación plaquetaria (NO, PGI₂). e) Finalmente, el endotelio libera otras sustancias tales como el factor de agregación plaquetaria-PAF, molécula de adhesión para leucocitos y enzimas antioxidantes (20).

La relajación de la fibra muscular lisa como componente estructural activo de la pared vascular da origen a una directa vasodilatación. El agente que desencadena este proceso fue en un principio conocido como el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), descubierto por Furchgott y Zawadzki en 1980 (21). Este factor es producido por la célula endotelial como consecuencia de estímulos fisiológicos, del estrés o de los estímulos químicos que *in vivo* puedan ejercer la acetilcolina y/o la bradiquinina sobre sus respectivos receptores en la pared endotelial.

Tras comprobarse que el EDRF influía sobre el tono vascular general y en particular en el flujo sanguíneo cerebral, se demostró que este factor tenía las mismas características funcionales que el NO o las de un compuesto estrechamente relacionado con él (22,23), demostrándose también que el NO era producido por una familia de enzimas que se llamarían las óxido nítrico sintasas (NOS). Actualmente está comprobado que el NO es sintetizado por la NOS, enzima que es de suma importancia cuando se trata de proteger los vasos sanguíneos (24).

El óxido nítrico, cuya estructura química es NO, es un gas soluble, altamente lipofílico, el cual es sintetizado por las células endoteliales, macrófagos y algunas neuronas. Es un muy importante mediador intracelular y extracelular. Induce la enzima guanilato ciclasa

(GC), la cual produce GMPc, que es la responsable última de la relajación del músculo liso, lo que provoca acciones biológicas como la vasodilatación y la broncodilatación.

El NO es una de las moléculas más pequeñas y simples que han sido sintetizadas. Es un gas inorgánico, sin color ni radicales libres, con siete electrones derivados del nitrógeno y ocho electrones derivados del oxígeno, más un electrón impar. Al igual que algunos péptidos intestinales, el NO forma parte del proceso de tumefacción de los tejidos clitoridianos durante la estimulación sexual (25).

El NO producido por las células endoteliales es esencial en el proceso de relajación de los vasos sanguíneos. En condiciones fisiológicas, la relajación ocurre cuando los receptores de membrana de las células son activados por estímulos de moléculas solubles, incluyendo acetilcolina, bradiquinina, ADP, sustancia P, serotonina, etc., o cuando el desgaste de las células circulantes sobre las capas endoteliales aumenta, activando la enzima NOS endotelial (e-NOS), la cual produce NO (24). La e-NOS está estratégicamente sujeta a la membrana de la célula endotelial, favoreciendo la presencia de grandes cantidades de NO cerca de la capa muscular de los vasos y células sanguíneas. En respuesta a los agonistas, como la bradiquinina, hay una fosforilación de la e-NOS, determinando su translocación hacia el citosol.

El NO producido en las células endoteliales es movido a las células musculares y al lumen vascular. La rápida difusión y la facilidad con la que esta molécula entra en otras células, debido a su pequeño tamaño y lipofilia, son importantes para el entendimiento de sus actividades biológicas. Dentro de la célula muscular, el NO interactúa con el hierro de la enzima GC, llevando a la alteración de su conformación, activándola (GCa). La GCa cataliza la salida de dos grupos fosfatos de la molécula guanósín trifosfato, lo que resulta en GMPc. El aumento de los niveles de GMPc en las células del músculo genera su relajación (25).

El NO es un radical libre del nitrógeno con un electrón no apareado en su orbital externo producido por un grupo de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas o NOS. En las arterias, la vasodilatación consecutiva a mediadores endógenos como acetil colina y bradiquinina depende de la liberación endotelial de NO; la remoción del endotelio determina la ausencia del efecto vasodilatador. Asimismo, los nitritos y nitratos y la nitro- glicerina, son compuestos que, metabolizados por las estructuras vasculares, finalmente liberan NO y así ejercen su actividad vasodilatadora (24). En otros tejidos el NO ejerce funciones diversas como regulador de la sinapsis, modulador de la respuesta hipofisaria, antiagregante plaquetario, modulador de la filtración glomerular, inductor de la erección peneana e integrante de la respuesta inmune así como en la fisiología del dolor y en la osteogénesis.

El vasoespasmo es una de las principales causas de necrosis isquémica en cirugía reconstructiva con injertos fasciocutáneos y musculocutáneo, no estando claro el mecanismo patogénico de generación.

Sigue siendo difícil determinar el agente farmacológico ideal para la prevención y / o el tratamiento del vasoespasmo del injerto.

El efecto de los productos de la ciclooxigenasa en la vitalidad de la isla de piel del injerto no está aclarada. Se ha documentado, que por vía intravenosa la infusión de prostaciclina (PGI_2) no aumenta la perfusión distal o la viabilidad de la piel del injerto microvascularizado en un modelo de cerdo (26), pero no existen hasta el momento estudios clínicos comparativos.

2.3. AGENTES ANTITROMBÓTICOS

2.3.1. VASODILATADORES

Con respecto al mecanismo de relajación, los donantes de óxido nítrico, la papaverina, el nifedipino, y la lidocaína son fármacos espasmolíticos de uso común.

2.3.1.1. Donantes de óxido nítrico (nitratos orgánicos)

Los donantes de NO, también denominados nitratos, son moléculas productoras de óxido nítrico o que controlan su producción. El aumento de óxido nítrico da lugar a un aumento de la estimulación de la guanilato ciclasa con el consiguiente incremento de GMPc (23).

Si esto sucede en las plaquetas del torrente sanguíneo, las plaquetas reducen su capacidad total y por lo tanto se observan efectos antitrombóticos. Si la estimulación de la GC se produce en las células del músculo liso de los vasos sanguíneos, el resultado es una vasodilatación y disminución de la presión arterial (24). El GMPc se degrada a guanosina monofosfato que no tiene los efectos anteriores del GMPc. Este proceso se ve reforzado por la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE 5) (25).

2.3.1.1.1. Trinitrato de glicerilo o Nitroglicerina

Es el más conocido de los fármacos de este grupo.

La nitroglicerina, cuyo nombre IUPAC es 1,2,3-trinitroxipropano, es un compuesto orgánico, que se obtiene mezclando ácido nítrico concentrado, ácido sulfúrico y glicerina. Su fórmula molecular es $C_3H_5N_3O_9$. El resultado es altamente explosivo. Es un líquido a temperatura ambiente, lo cual lo hace altamente sensible a cualquier movimiento, haciendo muy difícil su manipulación, aunque se puede conseguir una estabilidad relativa añadiéndole algunas sustancias, como el aluminio.

La nitroglicerina libera NO, que interactúa con la guanilato ciclasa soluble para elevar el concentración intracelular de GMPc, que a su vez media la relajación del músculo liso vascular.

En términos generales, la administración de nitroglicerina está indicada en las siguientes patologías (26):

- Tratamiento de la fase aguda de la angina de pecho.
- Tratamiento y profilaxis de la angina de pecho estable.
- Tratamiento del post-infarto y fase aguda del infarto.
- Tratamiento coadyuvante de la insuficiencia cardíaca congestiva asociada a IAM.
- Crisis de HTA durante los procesos quirúrgicos, especialmente en cirugía cardiovascular.
- Hipotensión controlada.
- Insuficiencia ventricular izquierda congestiva.
- Edema agudo de pulmón.

En microcirugía , el uso de la nitroglicerina no está aceptado. Su utilidad como agente vasodilatador tópico no está descrito y su aplicación en cirugía reconstructiva estaría en el campo del manejo anestésico, para el control de la perfusión microcirculatoria y de la volemia durante el periodo intra y postoperatorio.

El uso de fármacos vasoactivos ocasiona diferentes cambios en la microcirculación al actuar sobre receptores alfa-1 y alfa-2, reflejado su efecto en la resistencia vascular sistémica que afecta la perfusión en la microcirculación del colgajo y el gasto cardíaco. Se ha estudiado el uso de la nitroglicerina y de la fenilefrina en cerdos sometidos a microcirugía con colgajos del dorsal ancho e implante en miembro inferior, documentando con el uso de la nitroglicerina en infusión, una disminución del 30% en

la presión arterial media y la resistencia vascular sistémica sin afectar el gasto cardíaco, pero disminuyendo el flujo sanguíneo y microcirculatorio al colgajo al aumentar en un 20% la resistencia vascular del colgajo (26).

Por ello, el uso de la nitroglicerina en microcirugía con injertos libres microvascularizados estaría contraindicada.

Los resultados obtenidos de el estudio de Zhang, et al. (27) indican ciertamente que la nitroglicerina es un vasodilatador potente para resolver el vasoespasmo tanto en las arterias como en las venas MCP durante la cirugía. Sin embargo, sería de gran interés la investigación de la eficacia de la nitroglicerina como agente profiláctico en la en la prevención del vasoespasmo perioperatorio, sabiendo que el pico de máximo riesgo para el vasoespasmo y la trombosis ocurre dentro de las primeras 24-48 h tras la cirugía.

2.3.1.1.2. Molsidomina (3- morfolinosidnonimina)

El efecto de larga duración del fármaco molsidomina ha demostrado en estudios experimentales, reducir el tamaño del infarto miocárdico al administrarse de forma previa o tras los síntomas cardíacos. Esto se debe a su mecanismo de acción, que al liberar de su molécula óxido nítrico, incluye la dilatación de los capilares con disminución del retorno venoso, de la precarga, disminución del tamaño cardíaco así como un descenso del consumo del oxígeno.

La relajación de las arterias conductoras miocárdicas estenosadas, aumenta la perfusión de las zonas de miocardio en riesgo de infarto debido a una mayor circulación colateral. El incremento en el suministro sanguíneo regional favorece la nutrición de los músculos cardíacos, predominantemente a nivel subendocárdico como resultado de la reducción de la presión extravascular y de la resistencia coronaria. La frecuencia y la contractilidad cardíaca estable, favorezcan un mejor funcionamiento del corazón. La

inhibición de la agregación plaquetaria in vivo por molsidomina o de sus metabolitos activos, SIN-1 y 1A-SIN, está vinculada a la estimulación de la síntesis de prostaciclina, inhibición de la liberación de tromboxano con la inducción de trombosis y vasoconstricción que éste general, y el incremento en la concentración de GMPc.

De forma experimental, la eficacia hemodinámica de molsidomina puede ser contrarrestada por las catecolaminas (efectos en la postcarga) y dihidroergotamina (efecto en la precarga y la postcarga), respectivamente (28).

2.3.1.2.Papaverina

Es un espasmolítico de uso común, alcaloide del opio, que ejerce una acción directa sobre el músculo liso vascular, probablemente por una inhibición de la fosforilación oxidativa y del flujo de calcio durante la contracción muscular (29).

La papaverina se sabe que inhibe la fosforilación oxidativa y aumenta la acumulación intracelular de AMPc y GMPc en las células del músculo liso vascular por la inhibición de la degradación de AMPc y GMPc por las PDE de nucleótidos cíclicos (30). La disminución del AMPc y GMPc acumulado, disminuye el $[Ca^{2+}]_i$ y la sensibilidad de la actividad contráctil de las células del músculo liso vascular.

Se ha demostrado que la aplicación tópica de papaverina resulta en un aumento del flujo sanguíneo en la arteria mamaria en el hombre y en la arteria carótida de conejo después de anastomosis microvasculares (30,31).

La administración sistémica ha demostrado invertir el vasoespasmo cerebral y de la arteria mamaria interna (30) en el hombre y el vasoespasmo experimental en la arteria basilar de perros después de una hemorragia subaracnoidea.

Sin embargo, estudios como el de Gao et al., (32) sugieren que la papaverina podría tener efectos perjudiciales en los tejidos vasculares.

Gao et al. (32) estudiaron el efecto de la papaverina en segmentos de arteria mamaria interna humana en pacientes en los que el injerto arterial se utilizó para bypass coronario. Los autores encontraron que al aplicar acetilcolina en los vasos tratados con papaverina, empeora de forma significativa la función endotelial, con una disminución de la capacidad arterial de relajación dependiente del endotelio. En cambio, al aplicar adrenalina o U46619 (agonista del tromboxano A2), la capacidad contrátil del vaso no disminuyó.

Gao et al. (32) concluyen que el trastorno de la relajación dependiente del endotelio está relacionado con la inducción en la apoptosis de las células endoteliales.

La influencia de la papaverina sobre la contractilidad del músculo liso es diferente de la influencia que ejerce sobre el endotelio, donde podría existir una asociación entre una alteración de la respuesta de relajación dependiente del endotelio y la presencia de células apoptóticas debida al tratamiento papaverina. Esta diferencia podría estar relacionada con la relativa abundancia de células musculares lisas en la pared de los vasos sanguíneos en comparación con las células endoteliales, que consisten de una sola capa de células, de modo que la consecuencia funcional del daño es más inmediata y obvia en las células endoteliales que en las células musculares lisas.

La papaverina puede utilizarse en diferentes vías de administración: inyección periarterial alrededor del pedículo, intraluminal o administración tópica en el pedículo lavando con el fármaco y colocando sobre los vasos una gasa empapada con papaverina (33).

Aunque Takeuchi et al. (34) y otros autores (35) han demostrado que la inyección de papaverina puede aumentar las tasas de flujo de la arteria mamaria interna, ni en nuestro estudio ni en la práctica clínica usamos la papaverina intraluminal, al considerar que su naturaleza ácida puede causar daño celular endotelial, además de una posible lesión

mecánica en la capa endotelial.

2.3.1.3.Nifedipino

El nifedipino causa vasodilatación al bloquear la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales de Ca^{2+} tipo-L.

El principal efecto de los fármacos bloqueantes de los canales de calcio es la vasodilatación por el descenso del tono del músculo liso vascular y el descenso de la contractilidad del músculo cardíaco. Además, el nifedipino disminuye la agregación plaquetaria y reduce la extensión del daño celular de las células viables al bloquear el flujo del calcio intracelular (36).

El nifedipino es un bloqueante selectivo de los canales de calcio, que ha demostrado provocar un bloqueo completo del componente α_2 de la vasoconstricción (37).

La mayor parte de las células musculares lisas son dependientes del flujo transmembrana de calcio tanto para el mantenimiento del tono en reposo como para la respuesta contráctil (38). La literatura publicada hasta el momento documenta resultados contradictorios y poco concluyentes con respecto al efecto antiagregante y vasodilatador del nifedipino en anastomosis microquirúrgica: los estudios de Emery et al. (39) y de Miller et al. (40) mostraron la ausencia de beneficio en la supervivencia de injertos cutáneos mientras que estudios posteriores (41,42) mostraron una mejoría en la supervivencia de injertos cutáneos en ratas. El último estudio publicado sobre la utilidad de este fármaco en microcirugía (48) concluye que la administración de nifedipino por vía intravenosa en un modelo experimental de rata, no genera un efecto estadísticamente significativo en la mejoría de la permeabilidad de la anastomosis con respecto al grupo control.

2.3.1.4.Lidocaína

La lidocaína es un anestésico local que actúa estabilizando la membrana celular. Su mecanismo de acción se basa en la relajación o contracción del músculo liso de la pared vascular según la dosis administrada. Los efectos vasoconstrictores de la lidocaína en las arterias y venas humanas in vitro se han descrito en la literatura (43,44) y las concentraciones séricas de lidocaína al 2×10^{-2} M producen constricción periférica en humanos .

Su efecto vasodilatador puede ser en parte debido a su efecto inhibitor sobre los nervios simpáticos locales y el bloqueo de canales de Na^+ , conduciendo a una disminución de la concentración intracelular de Na^+ , que a su vez reduce la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]$ i, lo que resulta en la vasodilatación.

Otros estudios confirman la capacidad de la lidocaína para prevenir la isquemia, en relación a su concentración. Estos resultados están de acuerdo con los anteriores in vitro, así como otros estudios in vivo que demuestran que las propiedades vasodilatadoras de la lidocaína son concentración-dependientes. Las concentraciones bajas producen vasoconstricción y vasodilatación las altas (43).

El efecto rebote de la lidocaína tópica tras isquemia inducida, con una primera fase de vasodilatación parcial seguida de vasoconstricción del vaso, se observó en las arterias humanas y venas in vitro (43,44).

Esta contracción vascular puede ser de importancia clínica en microcirugía cuando la vasodilatación inicial puede estar seguida por una disminución de la perfusión del colgajo.

2.3.2. ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS

Como antiagregante plaquetario fundamentalmente se encuentra la aspirina (AAS) y los inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa:

2.3.2.1. Aspirina

La aspirina es, prácticamente desde su introducción, el fármaco más popular del mundo. La aspirina por medio de la inactivación de la enzima ciclooxigenasa (por reacción de acetilación), disminuye los metabolitos derivados del metabolismo del ácido araquidónico, incluido el tromboxano, un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor; y la prostaciclina, un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria.

Con respecto a su indicación como anticoagulante, la dosis óptima de AAS para generar una inhibición selectiva del tromboxano, conservando la función de la prostaciclina, no está clara; sin embargo, se postula que dosis bajas de aspirina con recubrimiento entérico (50-100mg), inhibe la producción de tromboxano por la ciclooxigenasa plaquetaria, con mínimo efecto sobre la prostaciclina (45). La dosis mínima necesaria para la supresión completa del tromboxano en humanos ha sido documentado de 100 mg, aunque esta dosis documentada en la literatura no está basada en el peso del paciente (46).

A dosis altas, tanto el tromboxano como la prostaciclina sufren inhibición, y es probable que los beneficios producidos a estas altas dosis (dosis de hasta 1300 mg/día) se deban a que los beneficios de inhibir el tromboxano superan al detrimento de la inhibición de la prostaciclina.

Dosis bajas de AAS (81-325mg) han demostrado efectividad en la reducción de ictus, infarto de miocardio, y muerte entre el día 30 y los 3 meses tras endarterectomía (47).

Los efectos secundarios del AAS incluyen el sangrado, gastritis y fallo renal (48). La eficacia de la aspirina a bajas dosis en la prevención de enfermedades cardiovasculares está bien establecida (49), pudiendo generar estas dosis tan reducidas la “falsa” impresión de que la aspirina a bajas dosis es segura y que apenas origina lesiones significativas en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los datos disponibles señalan que, aun a estas dosis, la aspirina tiene un efecto tóxico sobre la mucosa gastrointestinal y que los pacientes que la utilizan presentan un riesgo más elevado de padecer complicaciones gastrointestinales, especialmente hemorragia digestiva (48).

2.3.2.2. Inhibidores de la Glicoproteína IIb/IIIa

La glicoproteína IIb / IIIa es el receptor más abundante sobre la superficie de las plaquetas.

Ching et al. estudiaron el efecto del antagonista SR121566A de la glicoproteína IIb / IIIa en la prevención de la trombosis de la anastomosis arterial en un modelo experimental en conejo (50). El estudio encontró que tanto el antagonista de la glicoproteína IIb / IIIa como la heparina, mejoraban significativamente la tasa de permeabilidad, en comparación con los controles de solución salina.

Yates et al. (51) del mismo modo, evaluó el efecto del antagonista de la glicoproteína IIb / IIIa, tirofibán, en la prevención de la trombosis en modelo experimental en ratas.

El estudio encontró una mejoría significativa en las tasas de permeabilidad con el tirofibán como irrigante local en comparación con la irrigación de la anastomosis con Ringer lactato (control).

Además, el estudio demostró que era más eficaz el efecto antitrombótico cuando se combinó tirofibán con heparina, en comparación con la heparina o lactato Ringer solo. Aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo del tirofibán y

el de tirofibrán más heparina, el estudio demostró una significativa mejora de la tasa de permeabilidad con el efecto combinado de tirofibrán y heparina por vía tópica como irrigación.

2.3.3. ANTICOAGULANTES

En las últimas décadas, se han producido grandes avances en el conocimiento de las bases moleculares celulares de la formación del trombo, siendo la terapia anticoagulante la piedra angular para la prevención y tratamiento de los trastornos tromboembólicos (49,52).

Los anticoagulantes convencionales, como la heparina no fraccionada (HNF), las heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y los antagonistas de la vitamina K (AVK) (warfarina y acenocumarol), actúan sobre múltiples factores de la cascada de la coagulación.

2.3.3.1.Heparina

La heparina no fraccionada se trata molecularmente de un glucosaminoglicano (GAG) que posee la carga más electronegativa de todas las macromoléculas biológicas identificadas.

Tiene actividad equivalente sobre la trombina y el factor Xa. La heparina se liga a un residuo de lisina de la AT III y, de ese modo, altera su configuración, acentuando substancialmente su afección por la trombina. La heparina, así, aumenta la potencia inhibitoria de la antitrombina III en casi 1000 a 2000 veces (53,54). La heparina es efectiva en la prevención de la trombosis, sin embargo, el riesgo de hematoma y sangrado son complicaciones significativas que limitan su uso rutinario a la administración de un bolo intraoperatorio junto con su utilización como agente tópico

de irrigación.

Pugh et al. (56) demostraron este hecho ante su alta tasa de hematoma documentada (66%) en su estudio retrospectivo de reconstrucción de miembro inferior, cuando era utilizada tanto de forma sistémica sola como en combinación con otros agente antitrombóticos.

Por otro lado, pese a que la administración sistémica de heparina y su neutralización por la protamina son rutinariamente utilizadas en microcirugía y cirugía cardiovascular, la trombocitopenia inducida por la heparina y por la trombosis, y quizá otras condiciones clínicas, pueden constituir indicaciones para otras abordajes, que incluyen el uso de drogas alternativas, como la hirudina recombinante (56).

La heparina de bajo peso molecular tiene menos de 18 monosacáridos, se prepara a partir de la heparina no fraccionada por medio de separación física de cadenas de peso molecular bajo y se administra exclusivamente por vía subcutánea; no tiene absorción intestinal y también se une a la antitrombina pero luego produce una inactivación de la fase de propagación de la cascada a través de la inhibición del Factor Xa.

Las heparinas de bajo peso molecular tienen la secuencia pentasacárida fundamental, pero carecen de los 13 residuos de azúcar adicionales que se necesitan para alcanzar el dominio de unión de la heparina y, por consiguiente, no inhiben la trombina, aunque sí el factor IIa. Las heparinas de bajo peso molecular se describen por su cociente anti-Xa/anti-IIa (52).

2.3.3.2. Antagonistas de la vitamina K

El efecto anticoagulante de los AVK se alcanza por interferir en la interconversión cíclica de la vitamina K y su 2,3 epóxido, lo que lleva a la producción hepática de

factores de la coagulación parcialmente carboxilados y descarboxilados (VII, IX, X y II) con la actividad coagulante reducida (57).

Aunque efectivos, estos agentes tradicionales asocian varios inconvenientes, incluyendo el necesario control rutinario de la coagulación para el ajuste de dosis. Los recientes esfuerzos en la búsqueda de nuevos enfoques de la anticoagulación se han centrado en una sola diana terapéutica enzimática dentro de la vía de la coagulación, como la trombina y el Factor Xa, de forma que la inhibición de cualquiera de estas enzimas atenúe la formación de fibrina.

La inhibición de la protrombina mediante fármacos antagonistas de la vitamina K (warfarina, acenocumarol) es la terapia más utilizada en la prevención crónica de procesos trombóticos, como se documenta en el trabajo de Navarro et al. (13). Esta publicación, realizada por excelentes unidades especializadas en el control anticoagulante, ilustra la dificultad habitual de mantener de forma permanente el nivel de inhibición de la coagulación que evite fenómenos trombóticos. Ilustra también cómo la inhibición excesiva de un solo factor de la cascada (protrombina) expone al enfermo a hemorragias graves o fatales. La utilización del acenocumarol en España (Sintrom[®]) supone una dificultad añadida debido a la insuficiente dosificación comercial, que no permite al enfermo tomar todos los días la misma dosis.

2.3.3.3. Inhibidores del factor Xa

El factor Xa se ha convertido en una prometedora diana para una anticoagulación eficaz, ya que se coloca en el punto de convergencia de la vía intrínseca y extrínseca vías de la coagulación.

Se han desarrollado varios agentes orales que atacan específicamente el factor Xa, y el Rivaroxaban es uno de los agentes en última fase de desarrollo clínico.

En condiciones normales, el endotelio actúa como una barrera que separa el FT del Factor VIIa que fluye en la sangre. Sin embargo, el FT también está presente en la sangre circulante, y juega un papel importante en la iniciación de la coagulación cuando la lesión del vaso está limitada a la activación del endotelial (45). El factor tisular se une en la circulación al factor VIIa, formando el complejo FT-Factor VIIa, que activa los factores IX y X.

La inhibición del Factor Xa requiere mayor atención. El factor Xa convierte pequeñas cantidades de protrombina en trombina. La trombina amplifica la cascada de la coagulación mediante la activación del factor V y factor VIII (en la superficie de las plaquetas activadas).

2.3.3.4. Trombolíticos

Los agentes trombolíticos incluyen el activador tisular del plasminógeno, la uroquinasa y la estreptoquinasa.

El activador del plasminógeno de tipo tisular, un agente trombolítico local activo, ha mostrado resultados prometedores en modelos de animales y en el tratamiento de anastomosis en microcirugía clínica (58).

La estreptoquinasa y la uroquinasa se han utilizado también, con buenos resultados, en terapia trombolítica local.

Schubert et al. describió el primer uso de la estreptoquinasa intraoperatoria para salvar un colgajo libre, utilizando 7.500 unidades de estreptoquinasa y drenando el afluente venoso para evitar los efectos sistémicos (59).

Para un trombo establecido, la uroquinasa intraarterial ha demostrado una mejoría estadísticamente significativa en la permeabilidad, frente a la heparina o el dextrano (60).

Los riesgos de hemorragia secundaria a los agentes líticos deben considerarse

cuidadosamente antes de su uso, pero pueden ser minimizados por medio de la descarga del efluente venoso sistémico para prevenir la exposición al agente.

2.3.4. EXPANSORES PLASMÁTICOS

2.3.4.1. Dextrano

Polisacárido heterogéneo sintetizado a partir de sacarosa por la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, se produce como polímero de 40 a 70 kDa.

Sus cinco mecanismos de acción incluyen a) el aumento de la electronegatividad en las plaquetas y el endotelio, lo que impide la agregación plaquetaria, b) modificar la estructura de la fibrina, lo que hace más susceptible a la degradación; c) la inhibición de antiplasmina alfa-2 y, posteriormente, la activación del plasminógeno, d) disminución del factor VIII y factor von Willebrand, lo que disminuye la función plaquetaria, 5. modificación de las propiedades reológicas de la sangre actuando como un expansor de volumen.

En anastomosis microvasculares, un solo bolo preoperatorio de dextrano ha demostrado mejorar la permeabilidad en el periodo postoperatorio inmediato (61,62), sin embargo, su efecto a largo plazo sobre la permeabilidad es discutible, según lo determinado de resultados contradictorios en la literatura.

El estudio de Disa et al. (63), uno de los tres únicos estudios prospectivos existentes con respecto a antitrombóticos en microcirugía, comparó tres regímenes de profilaxis antitrombótica en cirugía de cabeza y cuello con dosis diferentes de dextrano y aspirina. Los resultados concluyeron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambos antitrombóticos, pero la tasa de complicaciones sistémicas fue considerablemente mayor con el dextrano, sobre todo el riesgo de anafilaxia, por lo que su uso en microcirugía no está justificado.

2.4. VEHÍCULOS PARA ANTITROMBÓTICOS

2.4.1. REQUISITOS DE LOS VEHÍCULOS DE AGENTES ANTITROMBÓTICOS

El objetivo de cualquier sistema de administración de medicamentos es proporcionar las cantidades terapéuticas de la droga en el sitio adecuado del organismo, para alcanzar rápidamente y mantener la concentración deseada del fármaco (64).

Los requisitos del vehículo ideal para los fármacos antitrombóticos sería aquel que cumpla las siguientes características:

1. Estructura porosa uniforme y estable que permita la distribución homogénea del fármaco en su interior.
2. Tamaño de poro armonioso con gran área superficial
3. Propiedades de superficie bien definidas
4. Gran cantidad de poros que permitan la inserción de la droga.
5. Liberación sostenida del fármaco de forma reproducible y predecible.
6. Mejora de la solubilidad del fármaco.
7. No alteración de las propiedades farmacodinámicas del fármaco
8. Ausencia de propiedades tromboembólicas.

Para obtener dicho propósito, se han diseñado diferentes sistemas de liberación o vehículos de fármacos, que aportan un suministro de la droga en el lugar donde ésta debe ejercer su acción.

2.4.2. TIPOS DE VEHÍCULOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS

Los tipos de vehículos de fármacos actualmente disponibles en el mercado son:

- Pegamentos de fibrina

- Liposomas
- Micelas
- Emulsiones
- Transportadores porosos

El **pegamento o sellador de fibrina** ha sido ampliamente utilizado para la fijación de los tejidos desde mediados de la década de 1970, habiéndose demostrado los efectos beneficiosos de su uso durante el proceso normal de cicatrización de heridas. Además de que, mezclando distintos fármacos con el sellador de fibrina, se produce una liberación lenta y eficaz en el sitio específico de entrega, mientras que el sellador se absorbe (65,66). El pegamento de fibrina se comercializa como polvo liofilizado en un equipo, junto con la trombina, el cloruro de calcio, y la solución de aprotinina, siendo el Tisseel / Tissucol ®(Immuno, Viena, Austria) uno de los productos más utilizados.

El suministro local del fármaco en el injerto, utilizando el pegamento de fibrina como transportador o carrier, se considera ventajoso con respecto a la extensión y duración de las concentraciones del fármaco y a su vez, evita los efectos secundarios sistémicos del mismo (67).

Varios sistemas de administración de fármacos, como los **liposomas, micelas, las emulsiones, polímeros micro / nanopartículas** se han mostrado como una gran promesa en la liberación controlada de fármacos.

Entre estos sistemas, los **materiales porosos** están surgiendo como una nueva categoría de vehículos de administración (68), debido a que poseen características tales como una estructura porosa uniforme y estable, gran área superficial, tamaño de poro armonioso con una distribución estrecha, propiedades de superficie bien definidas (69) y una gran cantidad de nanoporos que permite la inserción de las drogas (64).

Debido a estas propiedades, los transportadores porosos se han utilizado como

productos farmacéuticos para muchos propósitos, incluyendo el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos, liberación sostenida de medicamentos y la mejora de la solubilidad de los medicamentos poco solubles (70,71). Estas características les permiten absorber las drogas y su posterior liberación, de una manera más reproducible y predecible. El uso de los transportistas mesoporosos, microporosa y nanoporoso para la entrega de medicamentos, es una parte de la investigación en crecimiento (72).

2.5. SILDENAFILO

El Sildenafil o Citrato de Sildenafil, fue sintetizado por un grupo de químicos farmacéuticos de la empresa Pfizer, en su centro de investigación de Sandwich (en Inglaterra). Comercializado como citrato de sildenafil, es más conocido por el nombre comercial Viagra[®] (también comercializada como Revatio[®]). Fue inicialmente conocido como componente UK-92,480 y desarrollado para tratar la angina de pecho, pero en la primera fase de las pruebas clínicas la droga resultó tener pocos efectos en la angina, mientras que como efecto secundario producía erecciones masculinas. La empresa decidió entonces comercializarla para tratar la disfunción eréctil en lugar de la angina. La droga fue patentada en 1996, aprobada por la FDA el 27 de marzo de 1998 y ofrecida para la venta en los Estados Unidos ese mismo año.

El nombre "Viagra", como el nombre de muchas drogas, es una invención de mercadeo pero posiblemente fue inspirado por la palabra "vyaghra" en sánscrito, que significa "Tigre", cultura donde son habituales los monumentos de dichos animales con sus penes erectos en los portones de los templos.

Actualmente, las indicaciones establecidas para este principio activo son el tratamiento de la disfunción eréctil, la hipertensión arterial pulmonar y la fibrosis pulmonar, administrado vía oral, pero existen muchas otras posibilidades terapéuticas que se

describen más adelante, todas ellas en fase de experimentación.

2.5.1. DIANAS TERAPÉUTICAS

El citrato de sildenafil es un potente inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5), enzima encargada de la degradación del GMPc (guanosín monofosfato cíclico). Por tanto, como efecto último, el sildenafil, al igual que otros inhibidores de la PDE5 (vardenafilo y tadalafilo), incrementa los valores de GMPc (73) (Figura 8,9).

El NO es un potente vasodilatador endógeno, producido por el endotelio vascular que actúa activando la vía del GMPc en la célula muscular lisa. El GMPc es un potente vasodilatador que ejerce su acción a través de la apertura de los canales de potasio dependientes del calcio, disminuyendo el calcio intracelular con la consiguiente hiperpolarización de la membrana y causando la relajación de la célula muscular.

Además, disminuye la agregabilidad plaquetaria e inhibe la proliferación celular. El GMPc, Este potente mediador químico, sin embargo, tiene una acción muy breve, ya que rápidamente es degradado por la fosfodiesterasa tipo 5.

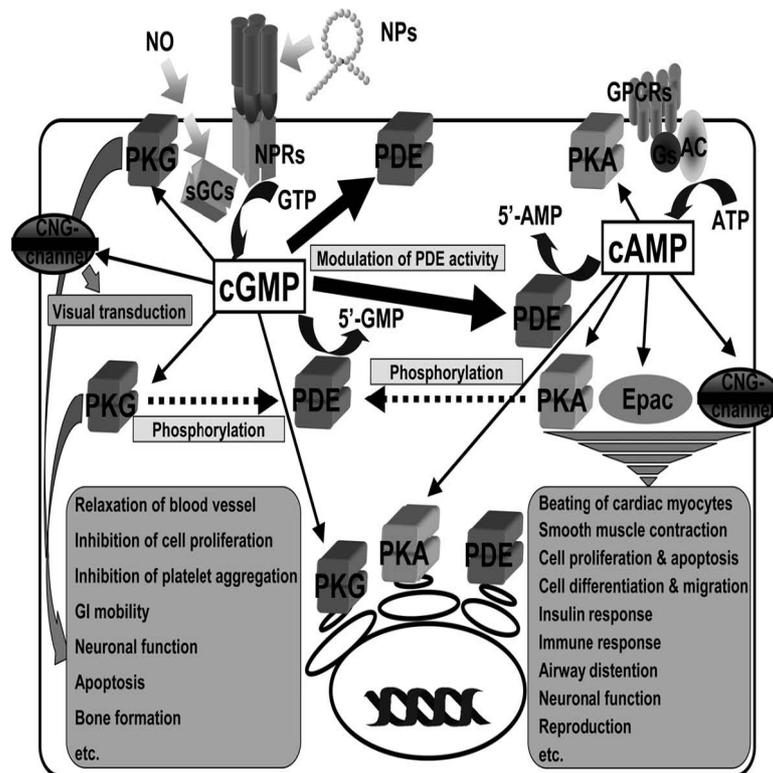


Figura 8 Diagrama de los efectos de la PDE en el ser humano. Se ilustra la localización y los efectos de las moléculas principalmente implicadas en la señal del AMPc y del GMPc. Las moléculas efectoras del AMPc y del GMPc están indicadas con flechas desde cada nucleótido cíclico. La fosforilación de las PDEs por la protein kinasa A(PKA) y la PKG se indica con flechas discontinuas. La modulación de la actividad PDE por el GMPc se muestra con una flecha gruesa. Los efectos celulares y fisiológicos de la señal del nucleótido cíclico se describe en los cuadros grises. AC:adenilil ciclasa; CNG-channel:cyclic nucleotide-gated channel; Epac: exchange protein directly activated by cAMP; GPCRs: G protein-couple receptors; Gs: GTP-binding preotein subunit; NPRs: natriuretic peptide receptors; sGCs: soluble guanylyl cyclase (74).

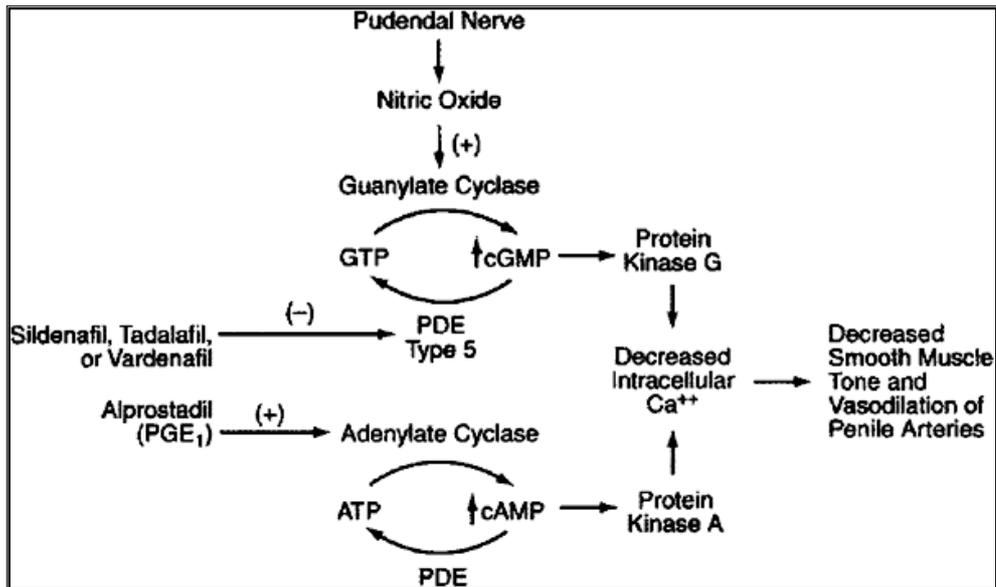


Figura 9 Esquema del mecanismo de acción de los inhibidores de la PDE5 (sildenafil, tadalafilo y vardenafilo). Por medio de la vía de la inhibición de la degradación del GMPc, se produce un descenso en la concentración del calcio intracelular, produciendo en último término la relajación del músculo liso . A nivel de su acción sobre el pene, la disminución del tono del músculo liso y la vasodilatación arterial producirá una erección mantenida (73).

Tras purificarse en un primer momento en pulmón de rata, actualmente la PDE5 ha sido identificada en muchas especies y en una amplia variedad de tejidos .

Dos isoformas de la PDE5, PDE5A1 y PDE5A2, se han identificado en seres humanos y perros (75), y una tercera isoforma, PDE5A3, se ha identificado en humanos (76). Las tres isoformas de la PDE5 humanos difieren sólo en el extremo 5' del ARNm y el radical N-terminal de la PDE5A2. La PDE5A1 y PDE5A3 comparten actividades catalíticas del GMPc similares, actividades diferencialmente inhibidas por el sildenafil

o el zaprinast (ambos fármacos inhibidores de la fosfodiesterasa, siendo el zaprinast el precursor comercial del sildenafil).

Mientras PDE5A1 y PDE5A2 se encuentran en casi todos los tejidos, teniendo PDE5A2 una distribución más amplia, la distribución de PDE5A3 se limita al músculo liso. La expresión de PDE5A2 también se identifica en prácticamente todas las células cultivadas a partir de diferentes tipos de cáncer de mama y de útero, leucemia, fibrosarcoma, en fibroblastos, en el músculo liso de aorta, el músculo liso de la vejiga, músculo liso de la uretra, el músculo liso del pene, el endotelio del pene, y el endotelio de aorta (Tabla 1).

Tejido	Isoforma PDE 5		
	A1	A2	A3
Cerebro	+	+	-
Pulmón	+	+	-
Corazón	+	+	+
Hígado	+	+	-
Riñón	+	+	-
Vejiga	+	+	+
Próstata	+	+	+
Uretra	+	+	+
Pene	+	+	+
Útero	+	+	+
Músculo esquelético	+	+	-

Tabla 1 Isoformas de la fosfodiesterasa 5 y su distribución en los tejidos humanos (76).

Por el contrario, la expresión PDE5A1 está ausente o en expresión mínima en estos cultivos celulares. La disfunción endotelial es un defecto importante que contribuye a la disfunción eréctil, la hipertensión arterial y la cardiopatía, la hipertensión pulmonar, la enfermedad vascular en la diabetes y se asocia por ello también con resistencia a la

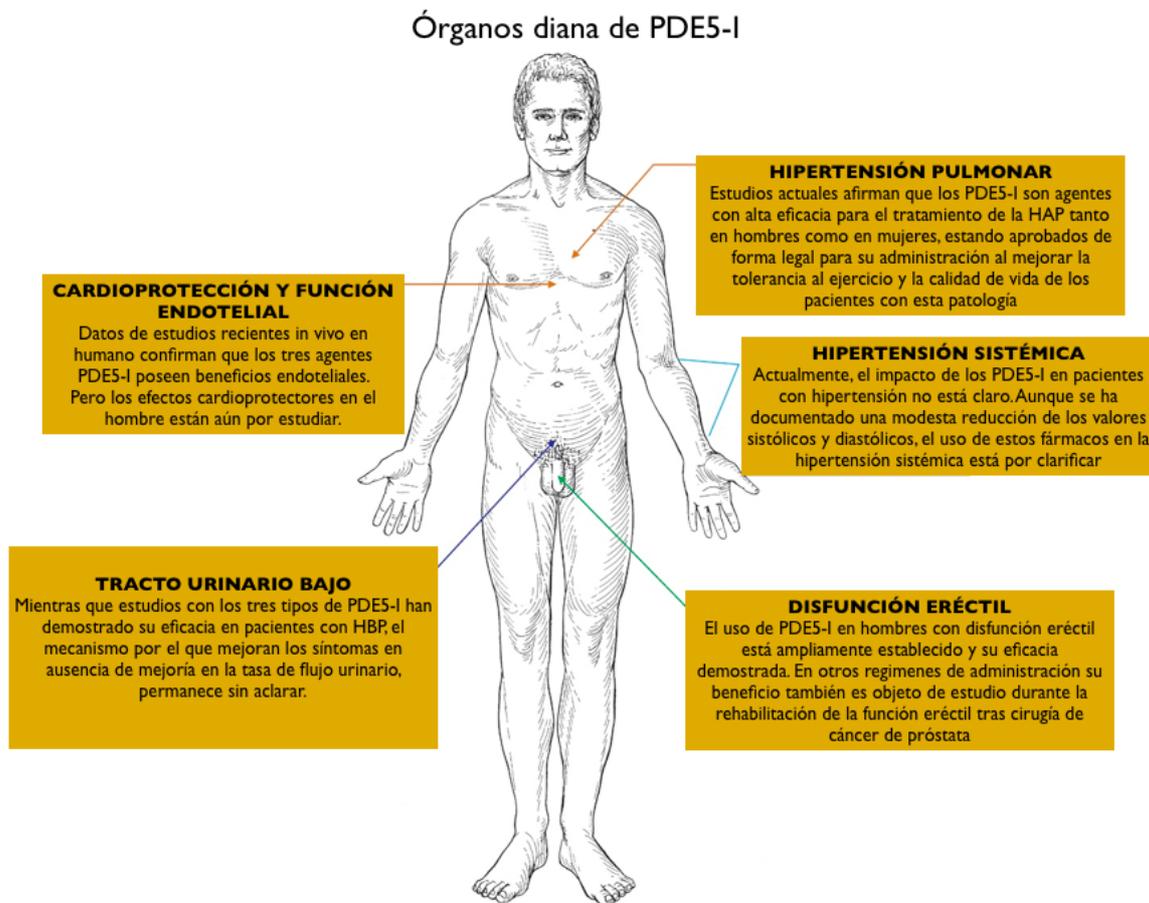


Figura 10 Órganos diana de los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 y el efecto producido en cada sistema en el que actúa.

Tras la estimulación sexual, la erección del pene se produce a través de la liberación de óxido nítrico (NO), que provoca la dilatación de los vasos sanguíneos del cuerpo cavernoso a través una acumulación de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). PDE5, la enzima que descompone el cGMP, puede ser inhibida, y por lo tanto, mejorar el efecto vasodilatador del NO (Figura 9). Los tres inhibidores de la PDE5 comparten este mecanismo de acción común y sólo son farmacológicamente activos cuando se activa la síntesis de GMPc. Por lo tanto, la acción de los inhibidores de la PDE5 requiere excitación sexual.

Eyacuación precoz

Los datos de los ensayos clínicos muestran resultados prometedores para el uso de inhibidores de la PDE-5 en el tratamiento de la eyacuación precoz (EP).

La modulación de las vías mediadas por NO en el sistema nervioso central así como la relajación del músculo liso en los vasos deferentes, vesículas seminales, la próstata y la uretra y la inhibición de la transmisión adrenérgica se han propuesto como mecanismos que subyacen a los efectos inhibidores de la PDE-5 sobre la eyacuación (77).

Los beneficios indirectos de una mejoría en la función eréctil también pueden ser importantes.

Un ensayo clínico evaluó el uso de sildenafil en monoterapia en pacientes con eyacuación precoz primaria (78). Ciento ochenta hombres recibieron aleatoriamente 50 mg de sildenafil o 20 mg de paroxetina diaria durante un período de 6 meses. En ambas evaluaciones a los 3 y 6 meses ambos tratamientos mejoraron significativamente el tiempo de latencia eyaculatoria intravaginal, el grado de eyacuación precoz y el grado de satisfacción sexual. Pero las mejorías con sildenafil fueron significativamente mayores.

Rehabilitación peneana tras prostatectomía radical

En varios modelos animales y estudios en humanos, el daño en el nervio cavernoso tiene como consecuencia cambios histológicos y funcionales en el pene. Estos cambios podrían explicar el desarrollo de la disfunción eréctil después de una prostatectomía radical, incluso cuando se emplean técnicas de preservación neurológica. El uso de fármacos erectógenos en programas de rehabilitación peneana intentan mantener la histología y acelerar la recuperación de la función eréctil espontánea.

En los últimos años se ha desarrollado una amplia actividad investigadora en este

campo. En un modelo de rata de lesión de traumática de los cuerpos cavernosos, la administración diaria de sildenafil conservó la función eréctil por medio de la preservación del músculo liso del pene y de la función endotelial, así como a través de la reducción de la apoptosis en células de tejido eréctil (77). Los hallazgos histológicos de este estudio, también se observaron en las biopsias de pene de los hombres tratados con 50 mg de sildenafil, tres veces a la semana, por un período de dos meses después de prostatectomía radical (79).

2.5.1.2.PRESIÓN ARTERIAL

El sildenafil, por su efecto bloqueante de la degradación de la vía NO-GMPc, juega un papel importante en la *mediación de la presión arterial*. Por lo tanto, es posible que las dosis terapéuticas de sildenafil para tratar la disfunción eréctil puede tener efectos clínicamente significativos en la hemodinámica humana (Figura 10). Mientras que tres estudios publicados demuestran que el sildenafil tanto vía intravenosa, intraarterial u oral, no produce una alteración de la presión arterial, frecuencia cardíaca, gasto cardíaco y flujo sanguíneo en individuos sanos (80-82), un cuarto estudio que evalúa estos mismos parámetros hemodinámicos, esta vez en individuos con cardiopatía isquémica estable, documenta un resultado estadísticamente significativo ($<0,01$) en la disminución de la presión arterial sistólica y diastólica con sildenafil por vía intravenosa (20, 40 y 80 mg) al final del periodo de perfusión cuando los niveles plasmáticos de sildenafil eran más altos (con un descenso medio con respecto a la línea de base de 7.0/6.9 y 9.2/6.7 mm Hg, con dosis de 40mg y de 80 mg, respectivamente) (83).

Los inhibidores de la PDE5 (PDE5-I) han demostrado en estudios animales su posible *efecto cardioprotector* a través de diferentes vías: la cardioprotección se produce a

través de la generación de NO por medio de la eNOS/iNOS, la activación de la proteína quinasa C o la señal de activación proteína quinasa G, abriendo canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP, atenuando la cantidad de células muertas resultantes de los procesos de apoptosis y necrosis, e incrementando el Bcl2/Bax a través de señales de NO en cardiomiocitos adultos (84-86).

Tanto el sildenafil, como el vardenafil y el tadalafil, han demostrado un descenso del tamaño del infarto tras reperfusión de la isquemia en modelos animales, con evidencia probada de los efectos cardioprotectores (87-89). Igualmente, Gori et al. (90) ha documentado resultados in vivo en humanos, confirmando la capacidad del sildenafil oral en inducir protección de forma intensa frente a la isquemia y reperfusión inducida por la disfunción endotelial a través de la vía de apertura de canales de potasio ATP dependientes (100). La administración crónica de PDE5-Is ha demostrado incrementar la vasodilatación dependiente del endotelio en fracaso cardíaco crónico y *mejorar la función endotelial* en pacientes con riesgo cardíaco así como en aquellos con disfunción endotelial (91-93).

Foresta et al. (94) demostró que la administración crónica de tadalafil y vardenafil mejoran la función endotelial e incrementan el número de células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs). Se piensa que las EPC contribuyen a la reparación del endotelio y la reparación neovascular, y la elevación de sus niveles se asocia con bajo riesgo de muerte por patología cardíaca (94,95). El sildenafil está actualmente aprobado para el *tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar (HAP)*, habiendo demostrado mejoría en los parámetros de la HAP establecidos por la OMS junto con el vardenafil, en estudios hemodinámicos y en la capacidad de ejercicio según estudios de referencia (96,97).

2.5.1.3.FUNCIÓN ENDOTELIAL

Raynaud

El Fenómeno de Raynaud (FR) es un signo cardinal de la esclerosis sistémica y ocurre en casi todos los casos. La vasculopatía estructural asociada hace de ésta una patología particularmente problemática y, en combinación con el vasoespasmo intermitente, es responsable de las graves complicaciones vasculares de la esclerosis sistémica incluyendo ulceración digital, infección del tejido blando o hueso, y gangrena (98).

El proceso patológico de la esclerosis sistémica no se conoce por completo. Existe una reducción de la producción y liberación de óxido nítrico y una sobreproducción de endotelina en el endotelio disfuncional, que da lugar a una tendencia hacia la vasoconstricción y una capacidad vasodilatadora reducida. La disfunción de la célula endotelial y el tono vascular alterado puede contribuir directamente al desarrollo de la enfermedad (99).

El fenómeno de Raynaud secundario, como el que se produce en la esclerosis sistémica, suele ser más grave y por lo tanto más difícil de tratar que el Raynaud primario o idiopático (100). Los análogos de la prostaciclina son eficaces administrados por vía intravenosa, pero requieren hospitalización. Por otro lado, los fármacos vasodilatadores han demostrado una eficacia variable en los ensayos clínicos, pero muchos de ellos tienen efectos adversos significativos (98).

Sildenafil y otros inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 son una opción terapéutica.

El reciente estudio clínico de Herrick et al. (98) concluye que el sildenafil reduce de forma significativa la frecuencia de ataques en pacientes con Raynaud secundario a esclerosis sistémica. Estos resultados junto al perfil de seguridad con buena tolerancia del sildenafil, sugieren que el tratamiento con liberación sostenida-modificada de sildenafil podría ser beneficioso como opción terapéutica en estos pacientes.

Cicatrización de heridas

Los Inhibidores de la PDE-5, al menos teóricamente, podrían promover la curación de heridas a través de la reducción en la isquemia local.

En un modelo de rata hembra adulta Wistar-Albino, el sildenafil aumentó significativamente la fuerza tensional en el centro de la incisión, así como la neovascularización (101). También se ha demostrado que disminuye los efectos adversos de la isquemia en la curación de anastomosis de colon isquémico en modelos de rata (102,103) posiblemente, a través de los efectos sobre el metabolismo del óxido nítrico y de la peroxidación lipídica y el aumento en la angiogénesis.

Por lo tanto, los inhibidores de la PDE-5 pueden ser útiles como un factor de apoyo en la cicatrización de heridas, pero hasta el momento no existen datos relevantes en humanos.

2.5.1.4.METABOLISMO DE LA GLUCOSA

Ayala et al. (104) mostraron con su estudio que el tratamiento crónico con sildenafil mejora el *metabolismo de la glucosa* en un modelo de ratones alimentados con alto contenido de grasa, y señalan que los mecanismos moleculares de esta optimización del perfil glucémico sugieren una posible participación del GMPc en la señal de transducción de la insulina.

Todos estos resultados junto con los obtenidos del estudio de Mammi et al. (105) indican que el sildenafil mejora la señalización de la insulina y la producción de NO en las células endoteliales, probablemente por la reducción de el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia y el aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular.

2.5.1.5.SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y PERIFÉRICO

Trastornos neurológicos, memoria y cognición

El papel de los inhibidores de la fosfodiesterasa-5 en el sistema nervioso central es controvertido. Aunque los datos preclínicos y clínicos sugieren que el sildenafil puede tener un potencial terapéutico en ciertos trastornos neurológicos, numerosos informes documentan acontecimientos adversos neurológicos atribuibles a la droga. Los datos experimentales sugieren que la vía NO/cGMP/PDE-5 está implicada en la plasticidad neuronal y la función cognitiva, incluyendo el procesamiento de la información, atención, la memoria, y la memoria de funcionamiento ejecutivo.

Estudios experimentales en los últimos años en ratas, ratones y macacos han demostrado que los inhibidores de la PDE-5 mejoran la memoria (106,107) incluso otros inhibidores de la fosfodiesterasa que no son de tipo 5, especialmente de tipo 2 y 9, pueden jugar un papel importante.

Dado que los inhibidores de la PDE-5 parece que mejoran la memoria en modelos animales y la sintasa de óxido nítrico neuronal se encuentra alterada en los pacientes con esquizofrenia, se llevó a cabo un estudio controlado con placebo en 17 pacientes ambulatorios con esquizofrenia tratados con una dosis estable de medicación antipsicótica con el objetivo de evaluar el rendimiento cognitivo y calificaciones de los síntomas al administrar 50 y 100 mg de sildenafil (108). Ninguna de las dosis obtuvo resultados significativos afectado los resultados en comparación con el placebo. Los autores sugieren que es posible que las dosis utilizadas en este estudio no fueran óptimas o que fueran necesarias dosis repetidas para conseguir efectos terapéuticos.

Motilidad y úlceras gástricas

El óxido nítrico (NO) es un importante neurotransmisor inhibitorio no adrenérgico-nocolinérgico en el tracto gastrointestinal, mediador de la relajación del músculo liso. Hay evidencia de que la disfunción de las neuronas liberadoras de NO en el plexo mientérico puede causar diversas enfermedades del tracto gastrointestinal. En particular, la alteración de la síntesis de NO neuronal parece ser un factor importante que contribuye a la patogénesis de enfermedades tales como acalasia, gastroparesia diabética y la estenosis pilórica hipertrófica infantil.

La literatura sugiere que el sildenafil retrasa el tránsito intestinal de una comida líquida en ratas (109) pero éste no era el caso en los perros, a pesar de la inhibición de tono en el fundus gástrico y la motilidad antral (110). Para dilucidar los efectos en los seres humanos, Cho et al. realizaron un estudio que involucró a nueve voluntarios sanos (111). El sildenafil no cambió el vaciamiento gástrico total o aclaramiento de marcadores radiopacos gástrico, pero sí redujo el volumen proximal, acortó el tiempo para el vaciado proximal, y aumentó significativamente el volumen distal. Estos hallazgos sugieren que sildenafil altera la distribución intra-gástrica de los alimentos en lugar de causar la estasis gástrica.

En un modelo de rata de daño gástrico inducido por etanol (112), sildenafil jugó un significativo papel gastroprotector.

El inhibidor de la sintetasa de óxido nítrico revirtió significativamente este papel protector y la inhibición de la guanilato ciclasa lo abolió por completo.

2.5.1.6.SILDENAFILO EN NEONATOLOGÍA

El papel de sildenafil en el tratamiento de la hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido se documentó por primera vez en prensa no especializada en el año 2002

(113). Hubo muchas críticas sobre su uso; algunos consideraron que el uso estaba justificado (114) ya que no había otras opciones para el neonatólogo tratante ante la falta de disponibilidad de óxido nítrico inhalado y la oxigenación por membrana extracorpórea.

Desde entonces ha habido muchos más casos clínicos y algunos estudios aleatorios con respecto al uso de sildenafil en los recién nacidos con hipertensión pulmonar persistente grave. El fármaco se utiliza hoy en día de forma frecuente en India y otros países en desarrollo, donde la disponibilidad de ventilación de alta frecuencia, óxido nítrico y oxigenación por membrana extracorpórea es muy limitado (115).

Sildenafil también se ha utilizado para tratar la hipertensión pulmonar asociada a cardiopatías congénitas, tanto en recién nacidos como en niños mayores (116).

Fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, potencialmente mortal, como resultado de mutaciones que afectan al regulador de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR). Las mutaciones más común del gen de la FQ tienen como resultado la supresión de un único residuo de fenilalanina en la posición 508 (F508del), causando la síntesis defectuosa y el plegamiento de la proteína mutante que no puede escapar desde el retículo endoplásmico y llegar a la membrana apical de muchos tipos de células epiteliales. Los epitelios de la FQ se caracterizan por un defecto en el transporte de electrolitos con una conductancia reducida de cloro y la conductancia aumentada del sodio. Esto se puede evaluar in vivo mediante la medición de la diferencia de potencial transepitelial nasal.

El sildenafil aumenta la expresión de la proteína F508del-CFTR en las células epiteliales nasales recogidas de pacientes con FQ (117). Asimismo, los resultados del

estudio de Lubamba et al. (118) proporcionan evidencia de que tanto el sildenafil como el vardenafil estimulan la actividad de la proteína F508del-CFTR en el transporte de cloro. Por lo tanto la inhibición de la PDE-5 puede ser una diana terapéutica útil en pacientes con fibrosis quística.

2.5.1.7.SILDENAFILO EN ONCOLOGÍA

El reciente estudio de Shi et al. (119) muestra cómo el sildenafil inhibe el flujo de fármacos mediado por ABCB1 y ABCG2, dos transportadores de membrana pertenecientes a la superfamilia de transportadores transmembrana que han sido identificados como transportadores de fármacos quimioterapéuticos tales como los taxanos, antraciclinas, alcaloides de la vinca e inhibidores de la topoisomeras. Esta inhibición generada por el sildenafil resulta en un incremento del agente anticancerígeno a nivel intracelular con el consiguiente aumento de la sensibilidad celular a dicho agente.

Melanoma e inhibidores de la PDE5

BRAF (V600E) es la mutación más común en el melanoma, que se encuentra en aproximadamente el 50% de los pacientes. Esta forma constitutivamente activa de la quinasa se ha convertido en el único objetivo terapéutico prometedor con el desarrollo de inhibidores específicos de mutante BRAF que comienzan a mostrar una eficacia notable en ensayos clínicos (120). La PDE5A se identificó como uno de los genes regulados a la baja en respuesta a la activación de BRAF.

Arozarena et al. (121) encontró que no sólo la activación de BRAF regula a la baja los niveles de PDE5A (mientras que la inhibición de BRAF aumenta la actividad PDE5A), sino que PDE5A parece estar jugando un inesperado papel crítico en la regulación de

una las facetas de la biología del melanoma: la invasividad celular.

2.5.2. APLICACIÓN DEL SILDENAFILO EN CIRUGÍA RECONSTRUCTIVA

El sildenafil es un fármaco que inhibe la PDE 5 y por lo tanto es capaz de mantener altos los niveles de GMPc celulares. La aplicación de sildenafil en pacientes sanos no ha demostrado estudios previos una mejora de los parámetros hemodinámicos tal y como se explica en el punto anterior, pero la combinación de los donantes de NO y los inhibidores de la PDE 5 debería generar un efecto aditivo (o incluso superaditivo) con respecto a la inhibición de la trombosis y /o la reducción de la presión arterial.

En el estudio de Rehse et al.(122), los autores investigan la interacción de Viagra® con los donadores de NO molsidomina (N-ethoxycarbonyl-3-(4-morfolinil)-sydnominina) y RE 2047 (N-nitroso-3-metil-sydnominina), respectivamente.

El molsidomina fue seleccionado por la larga duración (~ 6 horas) de los efectos antitrombóticos y la reducción de la presión arterial. El RE 2047 de composición química similar sólo muestra propiedades antitrombóticas.

Esto es importante porque en la terapia antitrombótica, la disminución de la presión arterial es un efecto secundario no deseado.

Los experimentos en ratas del estudio de Rehse et al. muestran que el sildenafil en dosis de hasta 30 mg/kg no presenta efectos antitrombóticos. El molsidomina, donante de NO dosis-dependiente, en cambio sí que inhibe la formación de trombos, siendo este efecto más pronunciado en las arteriolas que en las vénulas. La razón es la baja velocidad de la sangre en las vénulas que hace que la formación de trombos sea más fácil y por lo tanto su inhibición más difícil.

El efecto es aún más evidente con RE 2047, en cuyo caso, el efecto antitrombótico

dosis-dependiente sólo se puede observar en las arteriolas.

La comparación de los experimentos muestra que el sildenafil en dosis de 5 mg/kg o 10 mg/kg no aumenta las actividades antitrombóticas de molsidomina. Por el contrario, el efecto antitrombótico de RE 2047 se fortalece con el sildenafil (122).

La conclusión de este estudio es que sí es posible mejorar el efecto antitrombótico de los donadores de NO añadiendo un inhibidor de la PDE-5, obteniendo un efecto superaditivo con la combinación de ambos.

Por otro lado, los inhibidores de la PDE 5 desempeñan un papel más importante en la vitalidad del colgajo cutáneo de los injertos microvasculares en el periodo postoperatorio temprano según el estudio realizado por Hart et al. (123). Los resultados de este estudio muestran una reducción estadísticamente significativa de la extensión de la necrosis en el grupo de ratas al que se les administra sildenafil de forma intraperitoneal. De aquí los autores concluyen que los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 podrían reducir la extensión de la necrosis en colgajos microvascularizados realizados para cirugía reconstructiva.

Este es el único estudio encontrado hasta ahora en la literatura científica sobre cirugía de colgajos, y merece atención especial por el trabajo de experimentación que la autora presenta, que no existe hasta la fecha ningún estudio sobre el efecto del sildenafil tópico en anastomosis vasculares.

2.6. MODELOS EXPERIMENTALES DE OCLUSIÓN VASCULAR

2.6.1. EL MODELO DE ANASTOMOSIS TROMBOGÉNICA MICROVASCULAR IDEAL

Los modelos animales se utilizan habitualmente para investigar la eficacia de los agentes farmacológicos antes de su uso clínico. Las cuatro características del modelo animal ideal de anastomosis trombogénica microvascular fueron definidos por Kersh et al.(124); *primero*, se debe realizar una modificación vascular permanente para proporcionar una fuente trombogénica continua; en *segundo* lugar, el modelo debe imitar la reparación clínica de la anastomosis; *tercero*, el diámetro de los vasos debe medir entre 1 a 3 mm para permitir la completa obstrucción por un trombo; *cuarto*, la formación del trombo debe ser gradual.

2.6.2. MODELO DEL PLIEGUE O "TUCK MODEL"

El modelo del pliegue de trombosis microvascular fue definido por Stepnick (125). Este modelo introduce un colgajo de la pared vascular en el lumen del vaso (Figura 11), habiéndose teorizado que la introducción de la adventicia en la luz de un vaso es una causa potencial de trombosis del pedículo. El procedimiento en sí es técnicamente simple y fácilmente reproducible.

Stepnick (125) encontró una tasa de trombosis del 66% en los primeros 5 a 15 minutos, en las arterias femorales de conejo sometidas a este modelo de sutura trombogénica. Esta tasa de trombosis es susceptible a la manipulación farmacológica, y el modelo fue aplicado por Hadlock et al. (126) a las ratas de su estudio experimental para el estudio de fármacos antitrombóticos.

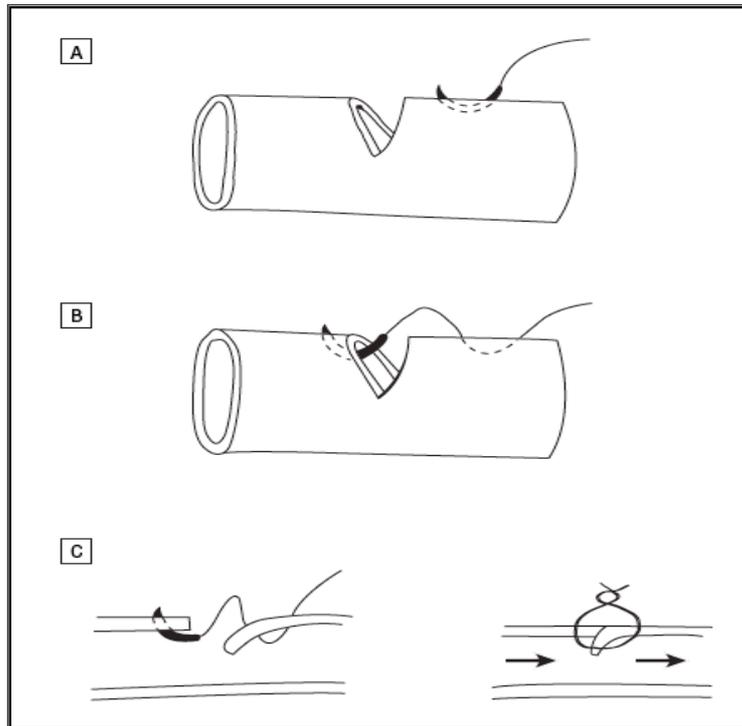


Figura 11 Modelo de sutura trombogénica “tuck model” descrito por Stepnick (125).

2.6.2.1. Aplastamiento

La lesión por aplastamiento se realiza por medio de una hemostasia tipo Webster Needle de mandíbula lisa.

La arteria se coloca entre las dos mandíbulas cerrando la hemostasia hasta engranar la cremallera durante 2 segundos. En el estudio de Eom (127), de modelo trombogénico en ratas, la anchura de la mandíbula de la hemostasia utilizada es de 3mm, al igual que el diámetro de la arteria lesionada.

Otra modalidad de modelo de aplastamiento es la realizada por Chen et al. (128), en cuyo estudio someten a dos de los grupos de un total de 95 ratas, a una carga de 15Kg y otros dos grupos a una carga de 25Kg. En este estudio, los autores estudian tanto el

efecto trombogénico de las distintas cargas, como el efecto antitrombótico al irrigar los vasos dañados con diferentes fármacos de forma tópica.

2.6.2.2.Arteriotomía

Este modelo consiste en realizar una sección longitudinal (de unos 7-8 mm) de forma que se exponga la luz del vaso. Esto se consigue disecando el vaso con dos pinzas microvasculares para aislar un segmento de 10 mm de la arteria. Seguidamente, el interior de la luz del vaso se disecciona con una hoja de bisturí para exponer las capas profundas de la túnica media (128).

Finalizado este procedimiento, la arteriotomía se cierra con sutura monofilamento de nylon 10/0.

2.6.2.3.Punto de pared posterior

Este modelo trombogénico comienza realizando las dos primeras suturas a 0° y 180° a ambos lados de la anastomosis, para recolocar los dos cabos del vaso a anastomosar.

Antes de comenzar el estudio, hay que determinar la localización del vaso en la que se va a realizar el punto de pared posterior.

.En el estudio de Nasir et al. (129), los autores estudian la repercusión en la permeabilidad vascular según la realización del punto de pared posterior a 30°, 60° y 90° en arteria femoral y en arteria carótida de rata (Figura 12). En este estudio, no se encontró una disminución de la permeabilidad de ningún vaso 1 hora tras la anastomosis, pero la permeabilidad de la arteria femoral fue significativamente menor que la permeabilidad de la arteria carótida en 24 horas. Esto indica que este modelo genera un proceso trombogénico lento que funciona con mayor eficacia en los vasos de pequeño calibre. La diferencia entre las permeabilidades de los vasos podrá ser como

resultado de una mayor velocidad del flujo sanguíneo y, por tanto, el resultado de más turbulencias en las arterias femorales, en comparación con las arterias carótidas.

El procedimiento de este modelo consiste en que la aguja debe introducirse en la capa íntima de la pared posterior antes de salir por el lado opuesto a la zona de entrada en la cara anterior. No se debe salir por la hendidura entre los cabo de la anastomosis para evitar dar una puntada extra de pared posterior.

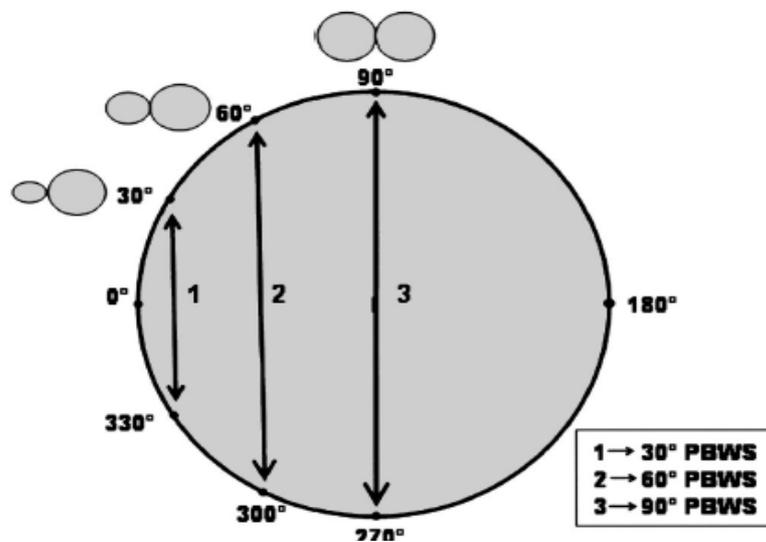


Figura 12 Modelo de sutura trombogénica “punto de pared posterior” descrito por Nasir et al. (129). PBWS: Purposeful Back-Wall Stitch.

2.6.2.4. Modelo de estenosis

En este modelo, en la zona distal a la anastomosis microquirúrgica se sujeta la arteria con una pinza vascular para generar una lesión endotelial. En esa zona lesionada se coloca un cilindro de plástico rodeando la parte externa de la arteria, consiguiendo de esta forma una "estenosis crítica."

Con esta maniobra se consigue generar un trombo plaquetario agudo en el lumen estenosado, aumentando gradualmente la cantidad de la estenosis. Esto hace que el flujo sanguíneo en la arteria estudiada disminuya, llegando a un flujo nulo cuando el diámetro del vaso está completamente obstruido. A continuación, el trombo es

embolizado a la circulación distal, y el flujo se restaura a los niveles normales. Esto ocurre en varias ocasiones provocando la reducción cíclica de flujo. Estas tasas de daño en el flujo vascular se pueden hacer mayores y más frecuentes al aumentar la actividad plaquetaria in vivo, mediante el aumento de los niveles plasmáticos de catecolaminas, o bien incrementando el colágeno expuesto en el lumen estenosado por medio de la generación de un daño interno mayor. Si se administra una dosis efectiva de un agente antiplaquetario, la tasa de letalidad se reducirá en tamaño y frecuencia o será abolida por completo. Así, el modelo puede ser útil para el estudio de mecanismos que facilitan o inhiben la trombosis arterial en las arterias con estenosis o lesión endotelial (130).

2.6.2.5. Modelo de torsión vascular

La arteria a anastomosar se disecciona, marcando una línea paralela al eje longitudinal en la superficie externa del vaso con tinta china o azul de metileno. Seguidamente se coloca el clamp vascular doble y se procede a la sección del vaso en la zona en que se va a realizar la anastomosis microquirúrgica.

El extremo distal del vaso se somete a una torsión de 90° y en esta posición, una vez eliminada la adventicia de cada extremo del vaso, se ejecutan los puntos de sutura (131).

2.7. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

2.7.1. ESTIMACIÓN CLÍNICA DEL COLGAJO MICROVASCULARIZADO

2.7.1.1. Evaluación intraoperatoria de la permeabilidad

Después de retirar el clamp del vaso, reestablecer el flujo sanguíneo y garantizar la permeabilidad, el método primario para reevaluar la permeabilidad vascular en el contexto experimental es el test de Acland o Milk test (132) a los 5, 15 y 30 minutos de la reperfusión. Con la monitorización clínica directa, la formación del trombo es a menudo visible en los vasos no permeables (Fig. 4) y será el momento de reevaluar cuál ha sido el fallo en la técnica quirúrgica.

2.7.1.2. Técnicas tradicionales o métodos clínicos no invasivos: constantes vitales del colgajo microvascular

Los métodos tradicionales de control de la vitalidad del injerto incluyen la evaluación clínica del *color* de la piel de la isla cutánea del injerto, la *temperatura* de la isla cutánea y el *relleno capilar*.

La temperatura se puede controlar con palpación directa, sondas de temperatura, tiras termosensibles o termómetros (133).

Para algunos autores, la monitorización por temperatura sólo tiene valor en la vigilancia de reimplantes y en colgajo libre para pequeñas reconstrucciones, debido a su incapacidad para detectar cambios antes de fracaso del colgajo (no sirve como detector del trombo antes de que exista isquemia franca) o indicar la reintervención en injertos de arteria perforante epigástrica inferior profunda (134).

2.7.1.3. La fotografía estandarizada

En cirugía experimental animal y su comparación con los hallazgos intraoperatorios, ha

sido utilizada ocasionalmente por algunos autores (135,136). En cirugía reconstructiva donde la monitorización de los injertos microvasculares es crucial, cada vez están disponibles un gama más amplia de sofisticados métodos para la comprobación de la permeabilidad de los vasos, con la desventaja de ser a menudo muy caros. Varkey et al. en su estudio publicado en el 2008 (136), describe cómo mediante fotografía digital y el envío de las imágenes por internet, es posible obtener un método altamente eficiente, de gran rentabilidad coste-efectividad, al alcance de todo cirujano. Las fotografías las realiza el personal biosanitario que se encuentra en la sala de reanimación postquirúrgica del hospital a cargo del paciente o el cirujano de guardia en caso de haberlo. Las imágenes seriadas se envían por internet al microcirujano reconstructivo responsable, y de esta forma, es posible valorar el color, el relleno capilar y el edema del injerto, de forma objetiva por un cirujano experimentado, a tiempo real.

2.7.2. MEDICIÓN DEL FLUJO VASCULAR

2.7.2.1. Ecografía Doppler

La reflexión de las ondas sonoras, principalmente del flujo sanguíneo intravascular y el desplazamiento de fase inherente que se detecta, es la base para la identificación de características acústicas de las arterias y las venas superficiales mediante ecografía Doppler. El medidor portátil de caudal de ultrasonido Doppler no direccional es ubicuo en la mayoría de los hospitales y es una herramienta esencial en la consulta del cirujano microvascular, para el análisis rápido del estado vascular del paciente. La ecografía Doppler, que es compacta, altamente portátil, fácil de usar y relativamente fácil de interpretar, se ha incorporado a la práctica de la microcirugía desde la creación de colgajos libres en la década de 1970. Este dispositivo se ha utilizado desde entonces para justificar el flujo a través de microanastomosis, predecir la permeabilidad del vaso,

y como medio de seguimiento postoperatorio del injerto libre.

La ecografía Doppler permite la identificación preoperatoria precisa de las perforantes cutáneas con una alta sensibilidad (es decir, con una tasa alta de verdaderos positivos).

Una evaluación cualitativa basada en la dureza del sonido relacionado con un línea de base estandarizada permite una comparación subjetiva para establecer una jerarquía de dominancia de perforantes en un territorio dado de piel.

La ecografía doppler color es una técnica de monitorización no invasiva que combina la determinación de la velocidad del flujo sanguíneo con la determinación de la dirección del flujo sanguíneo.

La ecografía doppler color es de uso frecuente en los injertos microvasculares con islas cutáneas enterradas así como en las reconstrucciones de cabeza y cuello, porque en estas circunstancias, la isla de piel no pueden controlarse por métodos convencionales. Su potencia diagnóstica radica en la caracterización precisa y cuantitativa del flujo de entrada y salida, y se ha documentado que evita innecesarias revisiones (137).

2.7.2.2.Láser Doppler implantable

El Doppler implantable es una técnica invasiva que permite la monitorización directa y continua del injerto.

La técnica fue introducida en 1988 por Swartz et al. (138) en las reconstrucciones microquirúrgicas.

La máxima utilidad de esta técnica reside en la monitorización de los injertos microvasculares enterrados, es decir, aquellos injertos que no presentan isla cutánea con la que poder monitorizar a simple vista el injerto a través de los métodos convencionales de color, temperatura o relleno capilar. Este es el caso de las reconstrucciones faringeadas.

La tasa de fracaso de estos injertos (6.5%) es mucho más alta que la de los injertos no enterrados (1.8%) (139), por lo que la utilidad del Doppler implantable en estos casos es considerable.

2.7.3. MEDICIÓN DE LA OXIGENACIÓN

2.7.3.1. Espectroscopia de infrarrojos.

La espectroscopia de infrarrojos es una técnica no invasiva, que permite la monitorización continua de la oxigenación y perfusión del colgajo.

Fue descrita por primera vez por Jobsis en 1977 en corazón y cerebro expuestos (140), y publicado por primera vez en una revista de cirugía plástica en 1995 para supervisar los injertos y las extremidades en conejos (141).

La espectroscopia infrarroja emplea los principios de la espectrometría óptica al medir el contenido de hemoglobina y la oxigenación en los tejidos locales. El sistema ofrece longitudes de onda de luz seleccionados y calibrados a través de una sonda de infrarrojos conectada a la piel.

En esta técnica, el resultado no está influido por los movimientos de la sonda, como por ejemplo en la flujometría por láser Doppler (142), sino que se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos (modos normales vibracionales).

La espectroscopia de infrarrojos permite detectar un fracaso incipiente del flujo. Se puede identificar con precisión los primeros signos de trombosis arterial y venosa, antes de que la trombosis se manifieste con los signos clínicos de color, turgencia y temperatura en la isla de piel del injerto. En las primeras horas del postoperatorio, sin embargo, también puede haber una disminución fisiológica leve de la saturación de

oxígeno, lo cual no debe entenderse como una complicación vascular.

Después de 12 horas, la saturación de oxígeno vuelve a la normalidad. Tres estudios, con una población total de 98 los pacientes, informaron los valores predictivos positivo y negativo del 100% (137,138,142).

3. HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

La oclusión de las anastomosis microvasculares producida por trombosis y/o espasmo vascular, es un proceso patológico susceptible de modificarse farmacológicamente.

Esa modificación farmacológica puede llevarse a cabo mediante la aplicación tópica de ciertos fármacos, en dosis única, alrededor de la anastomosis microvascular.

El sildenafil, por sus propiedades vasodilatadores e inhibidoras de la agregación plaquetaria, es un fármaco potencialmente útil para prevenir la oclusión de la anastomosis microvascular.

A partir de estas circunstancias, **la hipótesis central** del trabajo que la autora presenta ha sido que la aplicación tópica de sildenafil alrededor de una sutura microvascular trombogénica, producirá una relajación sostenida de la pared vascular así como una inhibición de la función plaquetaria, que reducirá la probabilidad de trombosis y espasmo vasculares.

El efecto protector del sildenafil sobre la anastomosis vascular será más intenso que el de la papaverina, dado que esta última no tiene actividad antiagregante específica.

En consonancia con ello, **el objetivo fundamental** del presente estudio ha sido:

Determinar el beneficio producido por la aplicación tópica de sildenafil en la permeabilidad de la anastomosis vascular en comparación tanto con el método estándar (ausencia de fármaco antitrombótico) como con la vasodilatación con papaverina tópica.

Asimismo, se han fijado una serie de **objetivos secundarios**:

1. Revisar un modelo experimental de trombosis microvascular en la arteria femoral de la rata Sprague-Dawley.
2. Determinar la utilidad del colgajo inguinal en la valoración de la permeabilidad del pedículo vascular.
3. Determinar la utilidad de la fotografía estandarizada en la valoración de la supervivencia de los colgajos cutáneos en la rata.

4. Estudiar las características histológicas de la oclusión microvascular en la arteria femoral de la rata.

4. MATERIAL

Y

MÉTODO

4.1. MATERIAL

4.1.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado 40 ratas machos Sprague-Dawley de 250-300 g.

Los animales proceden del animalario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital Universitario La Paz. En todo momento se siguió la normativa vigente sobre protección de los animales destinados a la investigación RD 1201/2005 (Anexo B)

4.1.2. MATERIAL PARA LA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

4.1.2.1. Material quirúrgico

- Instrumental de cirugía microvascular (S&T ®):
 - 2 pinzas rectas de relojero
 - 1 pinza acodada de dilatación de Dumont
 - 1 pinza porta-clamps
 - 1 microtijera de disección
 - 1 tijera de Wescott
 - 1 clamp doble S&T modelo APP-33 para vasos de 0.5 mm a 1.5 mm
- Microscopio óptico (tecnoscopio Zeiss, con lente de 200 mm, ocular de 12.5x y aumentos de 0.4x, 1x ,1.6x y 2.5x).
- Bisturíes desechables con hoja del número 11.
- Jeringa de 5 ml con catéter intravenoso o abbocath 22G para irrigación.
- Aguja subcutánea 25G.
- Nylon 10/0 (Ethicon®): con aguja curva de punta cilíndrica de 75 µm, 5.1 mm de longitud, 3/8 de radio de curvatura e hilo con longitud de 13cm.

- Seda trenzada (Mersilk. Ethicon®) 3/0 con aguja curva cilíndrica.

4.1.2.2. Material farmacológico

4.1.2.2.1. Anestesia para el procedimiento quirúrgico

- Ketamina (ketolar ® 50mg): Dosis 80 mg/Kg peso i.v / Dosis de refuerzo 30% de la dosis inicial.
- Diazepam (Diazepam 10 mg/2 ml): Dosis 5 mg/Kg peso i.v

4.1.2.2.2. Anestesia para la eutanasia

- Isoflurano al 4% mezclado con oxígeno a con un flujo de 2 litros por minuto (lpm).

4.1.2.2.3. Analgesia

- Buprenorfina (Buprex®) 0,1 mg/Kg s.c cada 24h
- Tramadol (Tramadol Ratiopharm®) 20 mg/Kg s.c cada 12 h

4.1.2.2.4. Fármacos de administración tópica

- Cloruro Sódico 0.9%.
- Gel de fibrina (Tissucol®). (Baxter Industriestrasse. Viena, Austria)
- Papaverina CIH 3% ampolla de 1 ml. (Fada Pharma. Buenos Aires, Argentina)
- Citrato de Sildenafil en polvo (Laboratorios Pfizer. Nueva York, EEUU).
Fármaco suministrado por los laboratorios Pfizer. Se administran 10 mg en cada animal.

4.1.2.3. Otro instrumental

- Báscula para pequeños animales.
- Maquinilla eléctrica de afeitado.
- Equipo de anestesia inhalatoria preparado para dispensación de isoflurano y oxígeno.
- Balanza de precisión Ishiba UB-H-8200 (0.1 g-8200 g) (Figura 13).
- Tubos de Eppendorf de 1.5 ml (Figura 14).
- Rotulador negro (para pintar el colgajo).
- Cronómetro.



Figura 13 Balanza de precisión (0.1g-8200g)



Figura 14 Tubo Eppendorf de 1.5ml

4.1.3. MATERIAL PARA LA HISTOLOGÍA

- Microscopio óptico Zeiss®.
- Proyector de mesa de preparaciones histológicas.
- Ultramicrotomo digital semiautomático (Sorvall MT-5000).
- Agujas de 20G.
- Jeringuillas de 50ml.

- Parafina.
- Tintes histológicos.
- Etanol 70°.
- Solución salina 100ml/rata.
- Solución de fijado: formaldehído 500ml/rata.

4.1.4. ORDENADOR, CÁMARA FOTOGRÁFICA Y SISTEMAS INFORMÁTICOS

- Ordenador MacBook 2.1 con sistema operativo Mac OS X 10.6.7
- Programas Microsoft Word 2009 para Mac y Numbers '09 versión 2.0.5 del paquete iWork 2009.
- Programa EndNote X3 (Bld 5276).
- Cámara fotográfica digital Sony DSC-T70.
- Programa estadístico SAS (Local, XP_PRO) Enterprise Guide 3.0.

4.2. MÉTODO

4.2.1. PREPARACIÓN DE LOS MATERIALES

- Los animales se mantienen alojados en instalaciones ambientales de temperatura y humedad estándar, con dieta y agua ad libitum.
- Anestesia general de la rata.
- Rasurado amplio del pliegue inguinal.
- Colocación de la rata en posición decúbiteo supino con las patas traseras fijadas a una tablilla quirúrgica.
- Marcaje del cogajo inguinal centrado en el pliegue inguinal de la pata derecha de la rata.

4.2.2. ESTABLECIMIENTO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

La aleatorización de los grupos se realiza tras finalizar la anastomosis de la arteria femoral y comprobar la permeabilidad de la misma.

- Grupo I (10 ratas): sirve como grupo control. En este grupo de ratas no se aplica ningún fármaco tras la anastomosis vascular, sólo se utiliza el suero fisiológico como irrigación en la luz del vaso durante el procedimiento.
- Grupo II (10 ratas): Tras la anastomosis, se aplican 0.5 ml de gel de fibrina (tissucol®) alrededor de la sutura vascular.
- Grupo III (10 ratas): A la anastomosis se le añade 75 mg de papaverina distribuidos en 0.5 ml de gel de fibrina (transportador del fármaco).
- Grupo IV (10 ratas): Al modelo de anastomosis trombogénica se le añade 10 mg de citrato de sildenafil aplicados sobre 0.5 ml gel de fibrina (este último se utiliza como transportador del sildenafil).

4.2.3. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Durante un periodo de entrenamiento previo de 3 meses, la autora que ya tenía experiencia previa en anastomosis vasculares, en clínica y en animal de experimentación, y había efectuado cursos específicos, realiza un total de 19 anastomosis en arteria femoral según el modelo trombogénico de “punto de pared posterior” para perfeccionar el modelo experimental.

La intervención se efectúa de la siguiente manera en todos los animales:

1. Se induce la anestesia general mediante inyección intraperitoneal de ketamina más diazepam según peso (ver arriba). Se pueden administrar dosis suplementarias según se necesite (30% de la primera dosis calculada).
2. La piel inguinal se afeita con maquinilla eléctrica y esteriliza con solución de alcohol.
3. Se diseña un colgajo de 2x1 cm, centrado en el surco inguinal entre el abdomen y la

pata de la rata. (Figura 15).

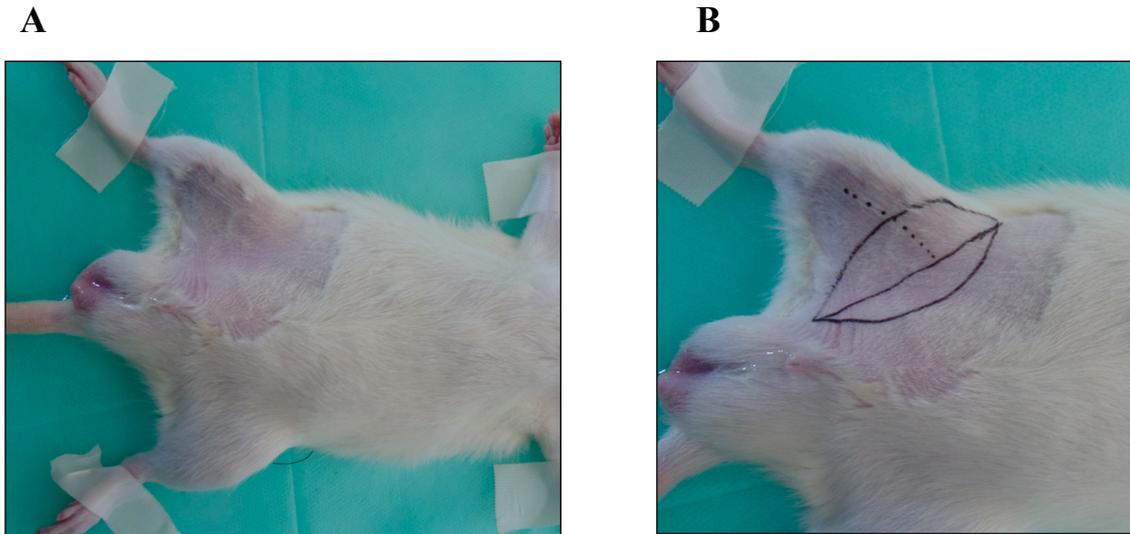


Figura 15 *A) Tras la anestesia general del animal se procede al rasurado de la región inguinal derecha de la rata, posición de decúbito supino y sujeción de las extremidades. B) Diseño del colgajo inguinal del lado derecho de la rata, centrado en el surco inguinal.*

Para el modelo del estudio se utiliza el colgajo inguinal del lado derecho en cada una de las cuarenta ratas del estudio.

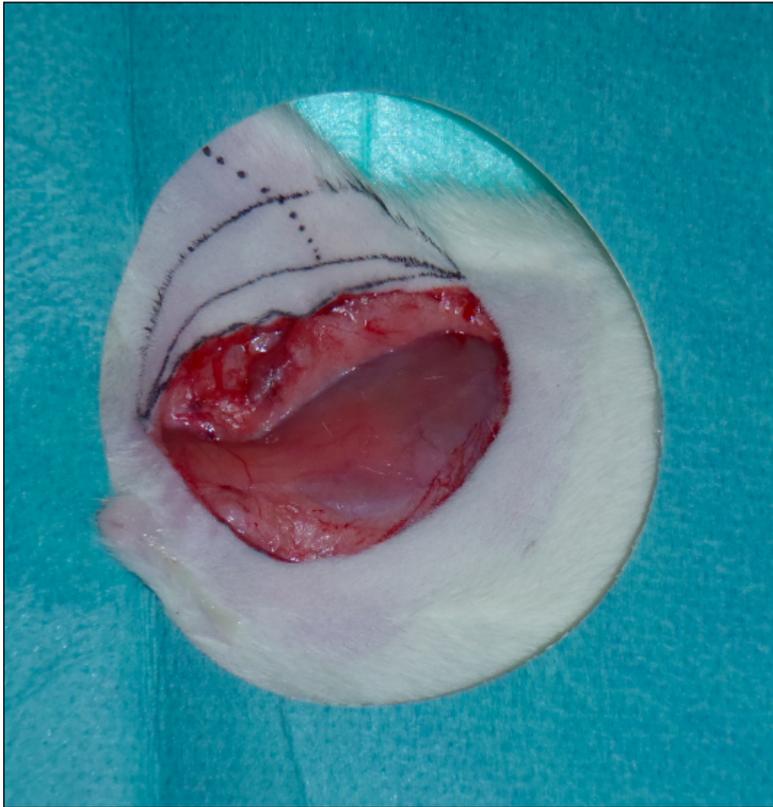


Figura 16 Aislamiento del campo quirúrgico e incisión de la piel del

4. El campo quirúrgico se aísla para mantener las condiciones de esterilidad y teniendo como referencia que en el punto medio del ligamento se encuentra la arteria femoral superficial, se amplifica el campo quirúrgico con 16 aumentos y se incide la piel con bisturí (Figura 16). El resto de la disección del colgajo se efectúa con tijeras.

5. Los vasos femorales aparecerán siguiendo una dirección latero-caudal, en el borde inferior del colgajo en el plano por debajo del tejido celular subcutáneo. Se realiza la disección del tejido celular subcutáneo con pinzas, dejando al descubierto la arteria femoral superficial y el plano muscular. Al movilizar el colgajo cranealmente se identifican los vasos epigástricos superficiales (pedículo del colgajo) (Figura 17).

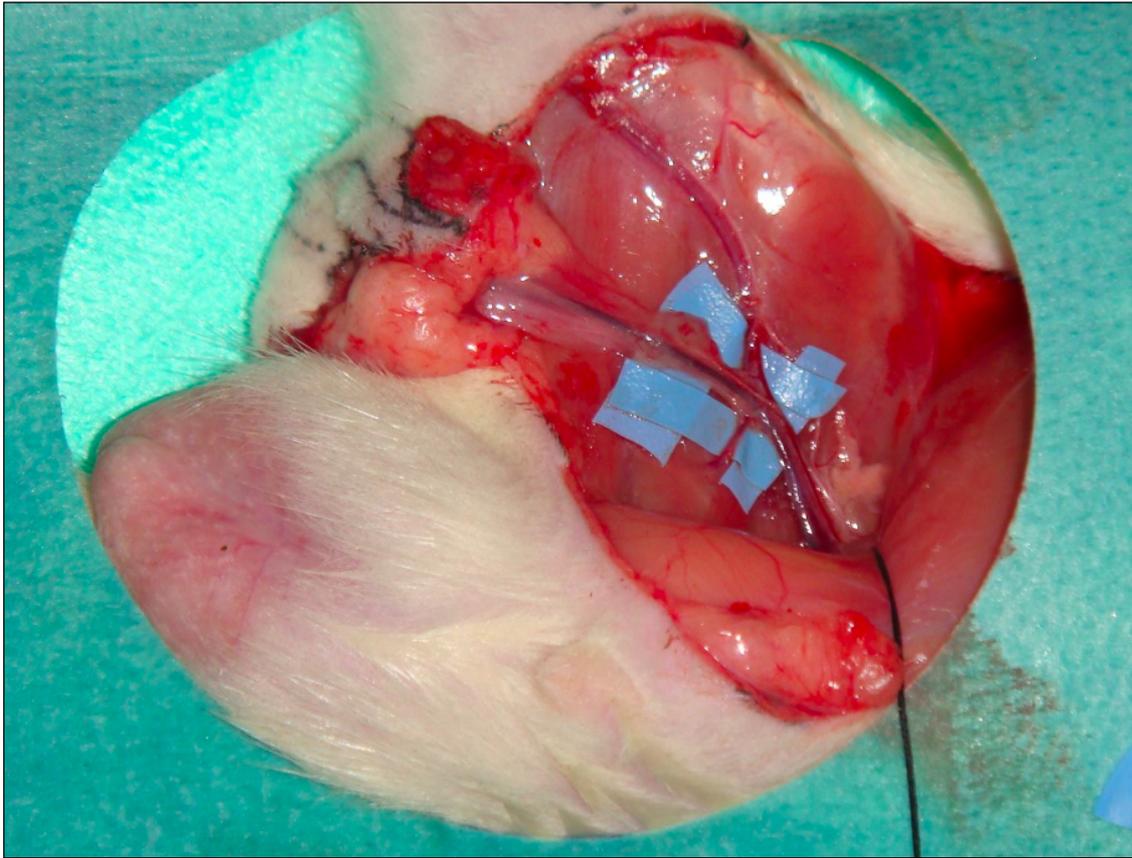


Figura 17 Colgajo inguinal pediculado en los vasos epigástricos superficiales que emergen directamente de los vasos femorales.

6. Tras disecar adicionalmente el tejido celular subcutáneo se identifican y ligan con ligadura de seda los vasos pudendos externos así como la arteria y vena femoral caudal lateral, ambos vasos distales a la salida de los vasos epigástricos. De esta forma el colgajo queda pediculado en los vasos epigástricos superficiales que se continúan con el pedículo principal formado por la arteria y vena femoral (Figura 18).

Se preserva el nervio femoral al igual que el nervio que acompaña a los vasos epigástricos.

7. El vaso utilizado para realizar el modelo de anastomosis trombogénica es la arteria femoral derecha. Se aísla el pedículo con un plástico a modo de contraste y se clampa la arteria femoral (Figura 19). Se pone en marcha el cronómetro para la medición del

tiempo que se tarda en realizar la anastomosis.

8. Para la anastomosis se magnifica el campo quirúrgico con microscopio óptico con entre 25 a 40 aumentos. Se corta la arteria y se lavan con solución salina los cabos del vaso a anastomosar (Figura 20).

9. La anastomosis se realiza con sutura de nylon 10/0. Cada anastomosis se completa con 7 puntos de sutura a 0° y 180°; en la cara anterior a 60, 90 y 150° ; en la cara posterior a 60 y 120° (Figura 21).

El punto trombogénico de pared posterior se realiza en cada anastomosis en la localización de 90° de la cara anterior.

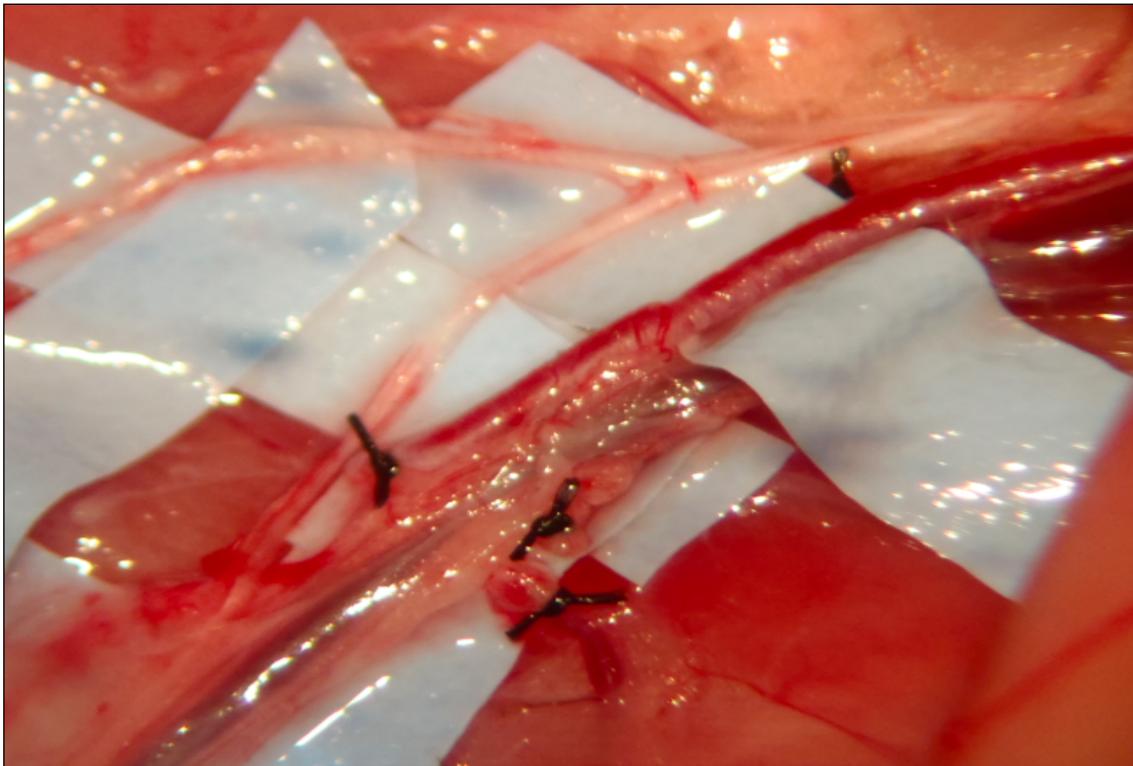


Figura 18 Imagen de la arteria femoral liberada tras ligar con sutura de seda los vasos circunflejos femorales laterales, vasos pudendos externos y arteria y vena caudal femoral lateral. Se ven los cabos de los vasos ligados tras completar la disección. A la derecha de la arteria se ve el nervio femoral totalmente liberado de las fascias que lo recubren siguiendo la misma dirección que sus vasos homónimos.

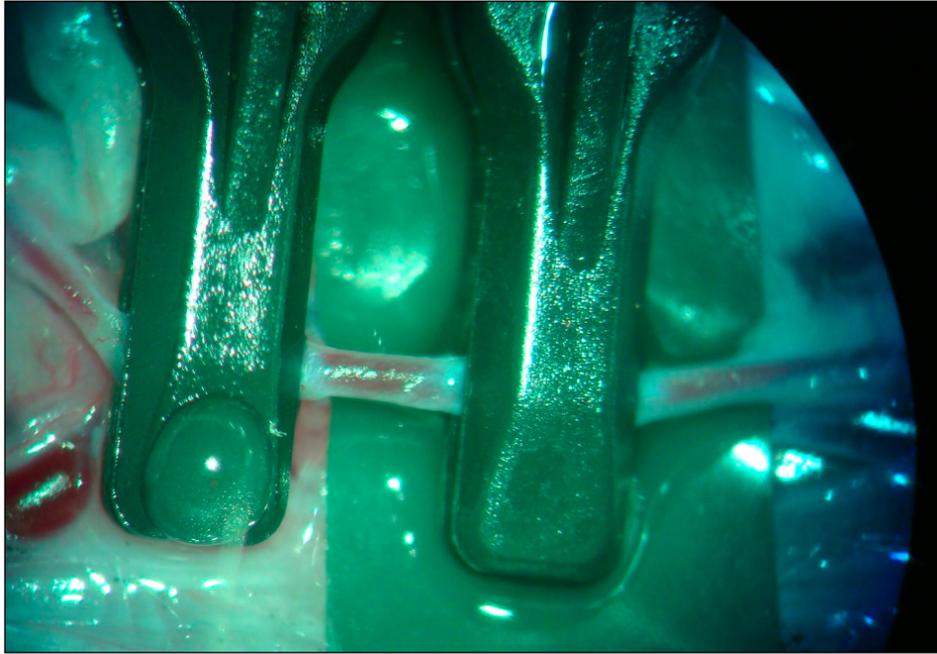


Figura 19 Imagen bajo el microscopio óptico con 25 aumentos. Colocación del clamp doble para el aislamiento del segmento de arteria femoral a anastomosar.



Figura 20 Imagen bajo el microscopio óptico a 25 aumentos tras la escisión de la arteria. Previo al comienzo de la anastomosis, se irrigará con suero fisiológico en el interior del lumen de cada cabo del vaso.

Se irriga con solución salina ambos cabos del vaso, dilatando apropiadamente el lumen de la arteria con pinzas dilatadoras de Dumont.

4.2.3.1. Anastomosis microvascular

Se procede a la realización del modelo estándar de sutura término-terminal, con la modificación del punto de pared posterior para obtener una anastomosis con potencial trombogénico.

Durante todo el procedimiento los puntos de sutura se realizan con una amplificación de 40 aumentos y el anudado de los cabos del hilo con una amplificación de 25 aumentos.

Se comienza con los dos primeros puntos de sutura localizados a 0° y 180° del vaso (Figura 21).

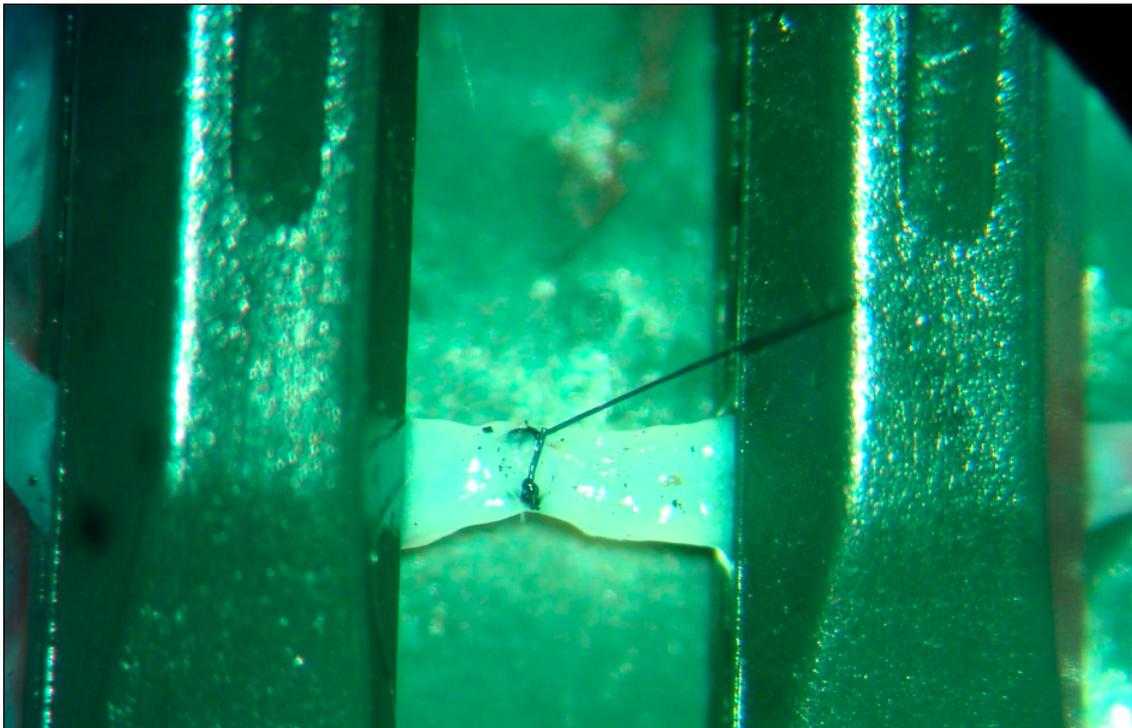


Figura 21 Bajo amplificación microscópica con 40 aumentos se ejecutan los dos primeros puntos del modelo trombogénico, localizados a 0° y 180° .

Seguidamente en la cara anterior de la anastomosis, se dan los puntos del vaso a 30° y 150° . En cada punto realizado la aguja saldrá por la hendidura entre los cabos del vaso a anastomosar para asegurar que la pared posterior del vaso no está implicada en la

sutura. Para finalizar la anastomosis de la cara anterior, en la localización a 90° se realiza el punto trombogénico de forma que la aguja se introduzca en la cara posterior del vaso estenosándolo a ese nivel (ver Figura 12). En esta ocasión, la aguja no emerge por la hendidura entre los cabos del vaso, sino que es el único punto en donde la aguja, tras abrazar la cara posterior, emerge por el cabo opuesto de la cara anterior y seguidamente se anudan los extremos de la sutura con 25 aumentos.

Tras este punto, se da la vuelta en bloque al segmento de la arteria con el clamp doble para proceder a suturar la pared posterior del vaso.

En la pared posterior del vaso, es muy importante sacar la aguja por la hendidura entre ambos cabos de la anastomosis, en cada punto de sutura, para evitar con esta maniobra dar de forma inesperada un punto extra trombogénico.

Después de la colocación de la última sutura, se retiran las pinzas o clamps vasculares, se para el cronómetro para ver el tiempo que se ha tardado en realizar el procedimiento y se evalúa la permeabilidad del vaso mediante el test de Acland (143) (Figura 22).

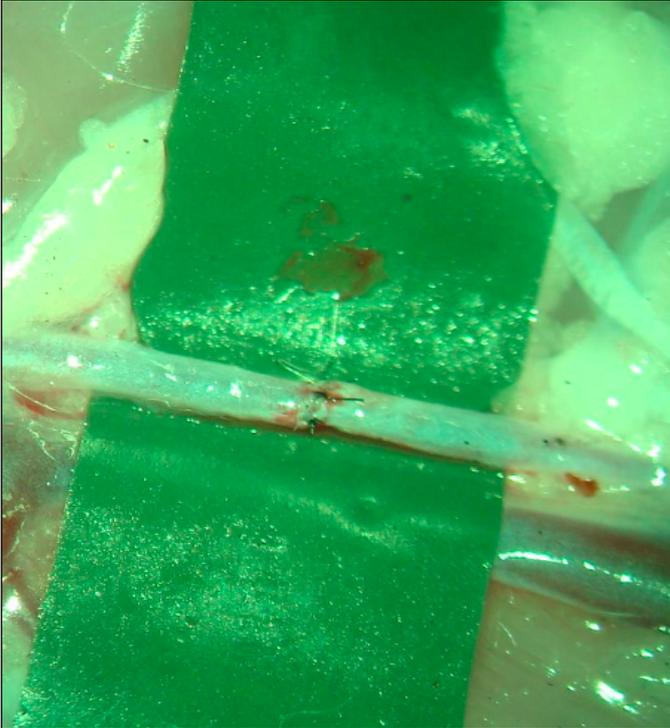


Figura 22 Tras finalizar el modelo de anastomosis trombogénica con 7 puntos

Cualquier vaso sin flujo tras retirar el clamp vascular o con test de Acland negativo, es eliminado del estudio.

En los vasos con permeabilidad positiva (test de Acland positivo) tras la anastomosis, se aplica el fármaco correspondiente al grupo asignado en el estudio según la distribución aleatoria, la cual se realiza al terminar la sutura de la arteria femoral.

Tras acabar el procedimiento se realiza la recolocación del colgajo en el pliegue inguinal y se sutura con seda 3/0. (Figura 23).



Figura 23 Recolocación del colgajo inguinal y sutura con seda para su posterior monitorización.

4.2.4. CUIDADOS POSTOPERATORIOS

Durante los 7 días de monitorización, los animales se mantienen con analgesia con buprenorfina 0.1 mg/Kg s.c cada 24 h y en caso necesario, asociando tramadol 20mg/Kg peso s.c, en las ratas en que se prevee un mayor sufrimiento al sufrir la necrosis del colgajo.

Todas las ratas sobrevivieron los 7 días del estudio.

4.2.5. ESTUDIO MACROSCÓPICO Y FOTOGRÁFICO

El colgajo se monitoriza a las 24 h y a los 7 días de realizar la anastomosis, tomando fotografías digitales del colgajo inguinal bajo anestesia general inhalatoria con isoflurano al 4%.

4.2.6. MÉTODO DE EUTANASIA Y DISECCIÓN DE LA MUESTRA PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO

Bajo anestesia general, se realiza una perfusión intravital de formaldehído a través de la arteria aorta, para el procesamiento histológico del segmento de anastomosis.

Descripción de la técnica:

1. Una vez anestesiada la rata y alcanzado el plano quirúrgico (ausencia de reflejo podal) colocarlo en posición decubito supino sobre una placa/rejilla adecuada para la recogida de los líquidos de lavado y fijación.
2. Estirar y sujetar las extremidades.
3. Lavar la superficie de la rata con etanol 70°.
4. Realizar un corte en la piel a la altura del final del esternón, separar la piel y cortar las costillas en paralelo a los pulmones para exponer el corazón.
5. Insertar la aguja conectada a la jeringuilla que contiene la solución de lavado, en el ventrículo izquierdo y profundizar hasta alcanzar la aorta clampando la aguja a este nivel.
6. Realizar una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado.
7. Proceder al lavado con la solución salina a una velocidad de 10ml/min hasta alcanzar el volumen de 100ml. El tiempo de lavado será de 10 minutos.
8. Proceder a la perfusión de la solución de fijado (500ml de formaldehído 10%)

9. Una vigorosa contracción muscular es indicativa de la correcta fijación del animal. En este momento retirar la aguja y proceder a la extracción de los órganos deseados.

4.2.7. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Tras la perfusión para fijación intravital de los vasos femorales se procede al levantamiento del colgajo inguinal. El segmento de 5 mm de arteria femoral de la rata que incluye la anastomosis microquirúrgica, se coloca verticalmente en un paramol de 10 mm de profundidad. Cada paramol se rellena con parafina caliente, y sobre ésta se coloca un casete estándar. Todo ello se deja enfriar a 5 °C durante 24 h. Posteriormente el paramol se desprende y cada bloque de parafina está listo para ser seccionado.

Cada bloque de parafina se secciona con un ultramicrotomo perpendicularmente al eje longitudinal del vaso, en la región de la anastomosis con mayor signos de trombosis macroscópica periadventicia (sufusión hemática, edema de la pared, tonalidad violácea, induración del vaso), obteniendo una sección transversal de 5 µm de espesor que se tiñe con hematoxilina-eosina evaluada por un anatomopatólogo con experiencia.

Para las observaciones histológicas se utilizó el microscopio óptico zeiss con oculares de 12.5, y objetivos de 0.4x, 0.6x, 1x, 1.6x y 2.5x, y con una distancia focal de 200 mm. Se realiza una clasificación de acuerdo a las características histológicas de las arterias sin trombosis y las arterias con trombosis, teniendo en cuenta el momento de establecimiento de esta última.

Se describen las particularidades encontradas en cada grupo de estudio.

4.2.8. ESTUDIO ESTADÍSTICO

- Test Chi-cuadrado y justificación de la invalidez de resultados de este test para el tamaño muestral del estudio.
- Test exacto de Fisher para tablas r x c.
- Tablas y diagramas de barras para análisis descriptivo de los grupos muestrales y variables del estudio.

Para cuantificar la relevancia estadística de los resultados se utiliza el sistema SAS (Local, XP_PRO) Enterprise Guide 3.0.

La existencia o ausencia de necrosis es una variable cualitativa, por lo que el examen estadístico consiste en un primer momento en un estudio Chi-cuadrado. Al realizar este estudio se observa que no es un test válido ya que el tamaño muestral es demasiado pequeño (Anexo A: tablas 4-5, 6-7).

Por tanto, las comparaciones y las correlaciones se realizan mediante la prueba exacta de Fisher.

Un valor de $p \leq 0,05$ se considera significativo

5. RESULTADOS

5.1. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

El estudio lo constituyen un total de 42 modelos de anastomosis trombogénica, desechando 2 ratas al obtener un test de Acland negativo (143).

El tamaño muestral está compuesto por 40 ratas. Todos los animales sobreviven al procedimiento durante los 7 días de estudio.

La duración media de cada anastomosis desde la colocación de los clamps a su retirada es de 34,8 minutos con una desviación estándar de $\pm 8,3$ minutos.

5.2. ESTUDIO MACROSCÓPICO

El estudio macroscópico visual del colgajo da un total de 24 colgajos viables y 16 colgajos necrosados del total de 40 colgajos (60% y 40% respectivamente).

La necrosis es nula o completa. No existe necrosis parcial.

Colgajos viables: la piel del colgajo es de color blanco-rosado, similar a la piel adyacente de la zona inguinal de la rata. El pelo rasurado ha crecido al igual que la piel circundante y a la presión la sangre que emana por los bordes de la herida es roja sin signos de congestión venosa. (Figura 24).



Figura 24

Imagen macroscópica de una rata del grupo 1 tras los 7 días de estudio. Se observa que no existen signos de congestión, ni edema del colgajo, indicativo de vitalidad.

Colgajos necrosados: La extremidad de la rata con el colgajo necrosado está mucho más fría, con éxtasis venoso, mal olor y bordes cianóticos. A los 7 días del procedimiento, ningún colgajo necrosado mantiene la piel necrótica. En todos ellos la rata se ha comido la piel sin vitalidad y se han perdido gran parte de los puntos de sutura del colgajo. El aspecto es ulcerado, con supuración purulenta. (Figura 25 y 26).



Figura 25 Visión general de una rata del grupo III anestesiada, con el aspecto macroscópico del colgajo inguinal a los 7 días de la intervención.



Figura 26 Imagen ampliada que muestra los bordes ulcerados con dehiscencia de herida quirúrgica y pérdida del colgajo cutáneo.

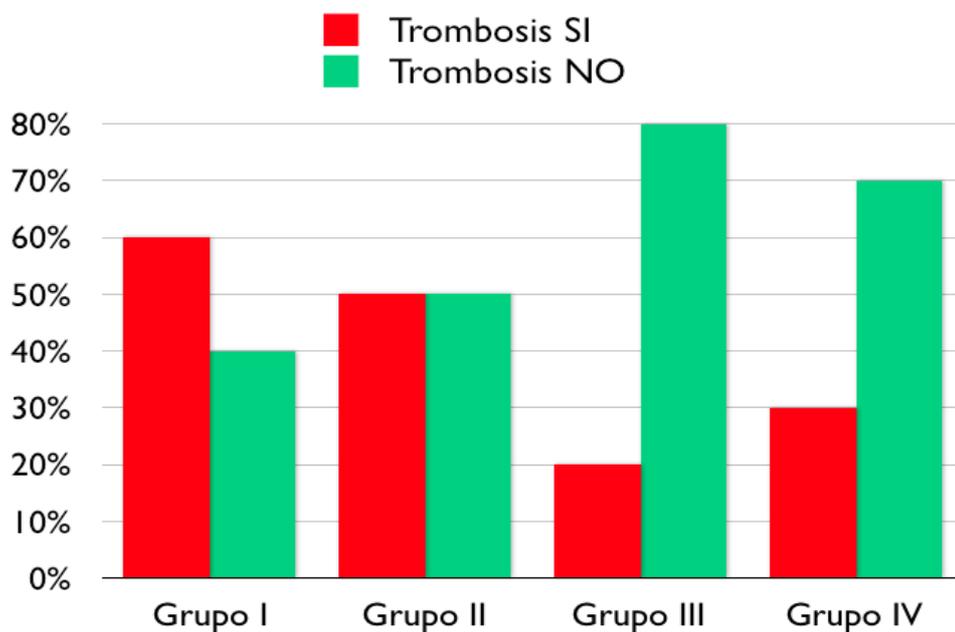
La distribución del número de colgajos necrosados según los grupos se indica en la tabla 2 y en la gráfica 1.

TROMBOSIS	Grupo I (control)	Grupo II (tissucol®)	Grupo III (papaverina)	Grupo IV (sildenafil)
SÍ	6/10	5/10	2/10	3/10
NO	4/10	5/10	8/10	7/10

n= 40 ratas

Trombosis=necrosis del colgajo inguinal a los 7 días

Tabla 2 Distribución de los colgajos necrosados según grupo de estudio.



Gráfica 1 Representación en diagrama de barras de la necrosis de los colgajos por grupos de estudio

El estudio macroscópico visual del colgajo a las 24 horas evidencia 11 colgajos necrosados. A los 7 días se observa necrosis en 5 colgajos adicionales, lo que da un total de 16 necrosis de colgajos a los 7 días. En todos los casos en los que la piel estaba necrosada, la arteria estaba necrosada, y viceversa.

La distribución de la necrosis del colgajo según grupos de estudio y momento de establecimiento es la siguiente (tabla 3 y gráfica 2):

Grupo I: De los colgajos necrosados, en 4/6 (66%) se estableció la trombosis en las primeras 24 h y en 2/6 colgajos (33%) entre el segundo y el séptimo día postquirúrgico.

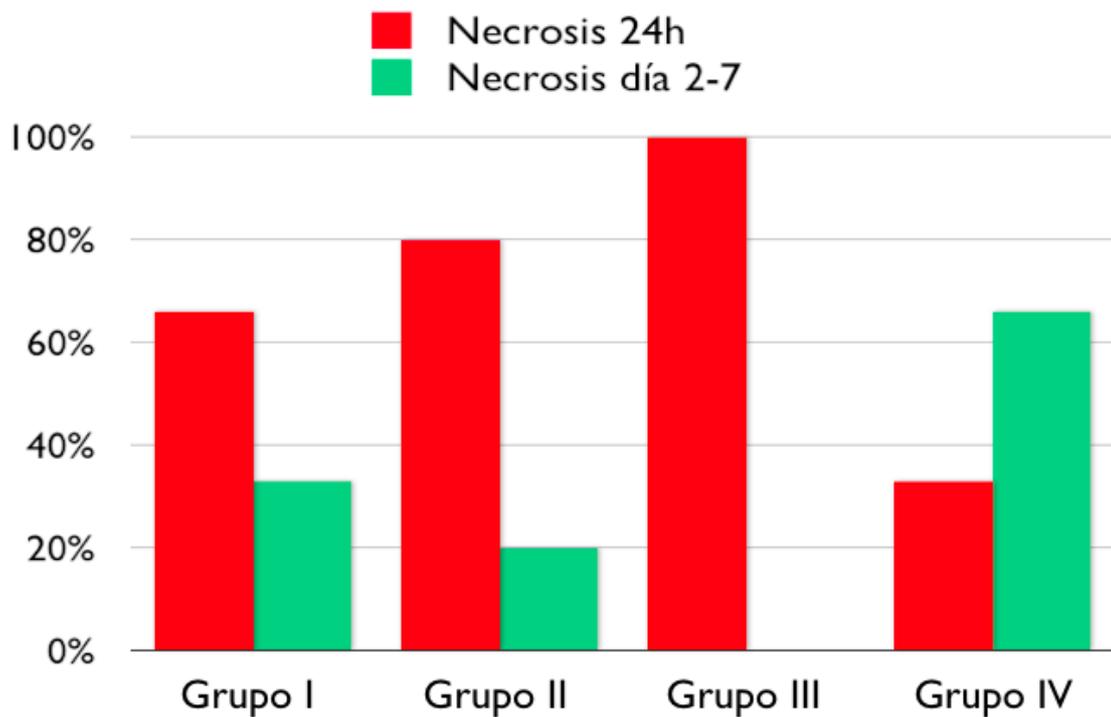
Grupo II: La necrosis se produjo en 4/5 de los colgajos (80%) en las primeras 24 horas y en 1/5 de los colgajos (20%) entre el día 2-7 postquirúrgico.

Grupo III: Establecimiento de la necrosis en el 100% de los colgajos (2/2) en las primeras 24 horas.

Grupo IV: En 1/3 casos (33%) la necrosis se produjo en las primeras 24 horas y en 2/3 casos (66%) la necrosis del colgajo se estableció entre el segundo y el séptimo día postquirúrgico.

TROMBOSIS	Grupo I (control)	Grupo II (tissucol®)	Grupo III (papaverina)	Grupo IV (sildenafil)
a las 24h	4/6	4/5	2/2	1/3
día 2-7	2/6	1/5	0/2	2/3

Tabla 3 Distribución de la necrosis del colgajo por grupos de estudio y momento de establecimiento.



Gráfica 2 Representación en diagrama de barras de la necrosis de los colgajos por grupos de estudio y momento de establecimiento.

5.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las características histológicas de las arterias no dependen del grupo al que está adscrito cada rata, sino a que hubiera o no trombosis, hallando una correlación perfecta entre necrosis de piel y trombosis arterial.

5.3.1. ARTERIAS SIN TROMBOSIS

En todas las secciones de 5 μm se puede observar el material de sutura (Figuras 27 y 28) correspondiente a la zona de la pared arterial donde se produce estenosis.

La capa de células endoteliales delimita la luz del vaso.

Alrededor de la estenosis se observan infiltrados de eritrocitos así como las pocas regiones donde aún se delimita la LEI.



Figura 27 Imagen a 100 aumentos de la sección transversal de 5 μ m de la arteria femoral, en donde se identifica en el polo superior, el punto trombogénico del modelo experimental. Histología correspondiente a una rata del grupo IV (Sildenafil).

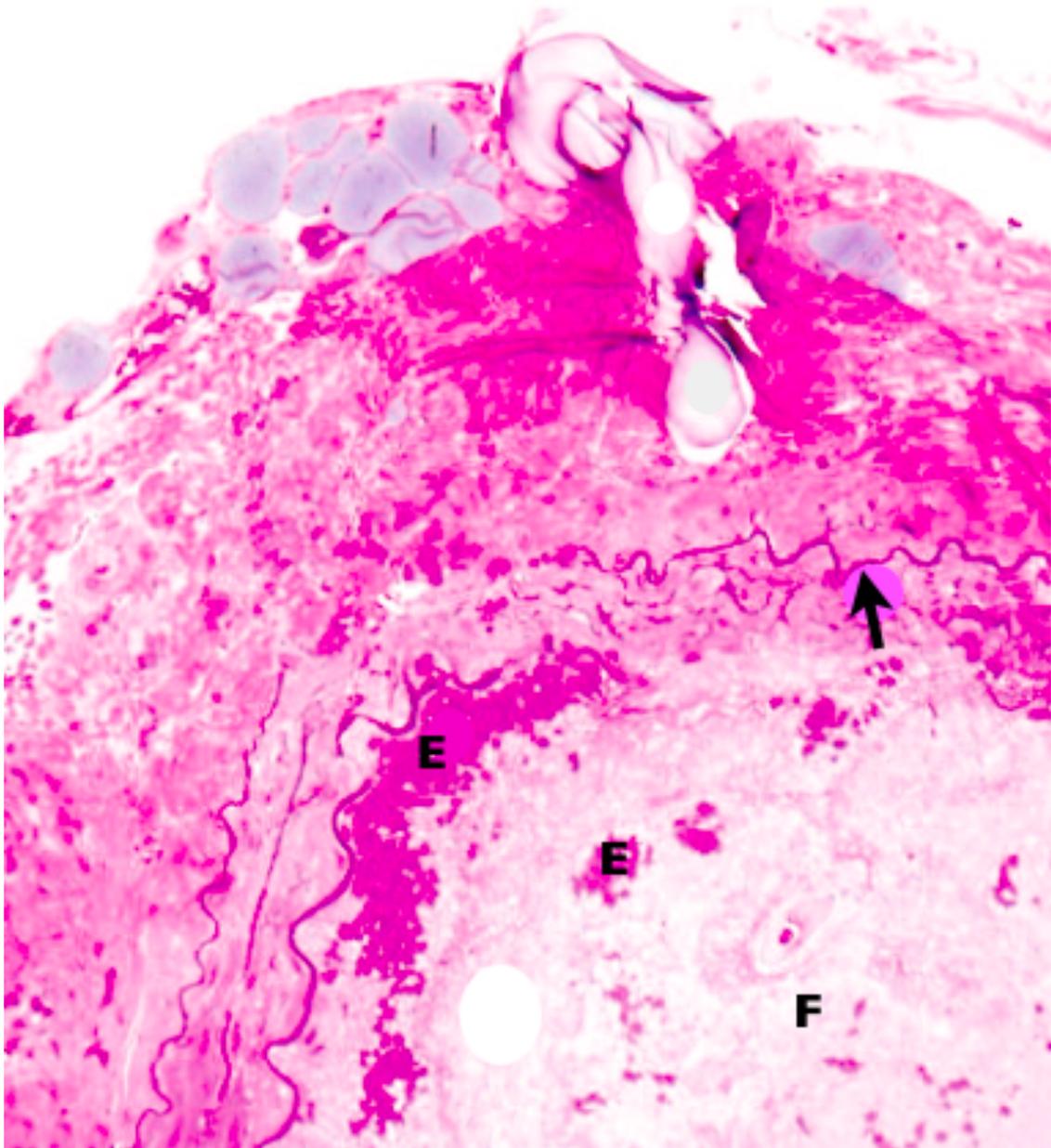


Figura 28 Ampliación a 400 aumentos de la región de la pared arterial en donde el hilo de sutura genera una zona de estenosis. Alrededor de la estenosis se observa las pocas regiones donde aún se delimita la LEI (flecha) así como infiltrados de eritrocitos (E) y la oclusión de la luz por la red de fibrina (F).

La sección transversal de una arteria permeable a los 7 días, muestra la pérdida parcial de la íntima con presencia de trombos pequeños multifocales en el lado luminal de la pared del vaso (Figura 29).

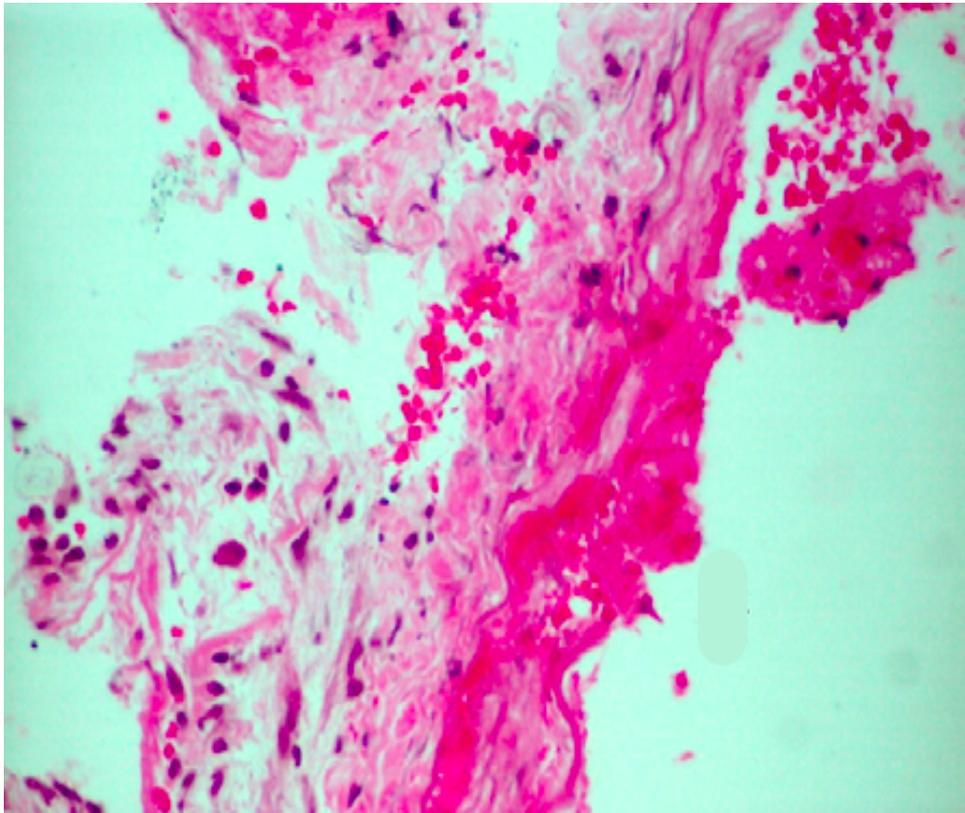


Figura 29 Imagen a 400 aumentos de un segmento de arteria permeable. Destacan los pequeños trombos multifocales junto a la luz del vaso (lado derecho de la imagen)

5.3.2. ARTERIAS CON TROMBOSIS A LAS 24 HORAS

Las arterias con trombosis a las 24 horas muestran una mayor delimitación de los agregados eritrocitarios y plaquetarios (Figura 30) en comparación con las necrosis del colgajo producidas a los 7 días del procedimiento (Figura 31) en las que la oclusión de luz arterial por el trombo es completa.

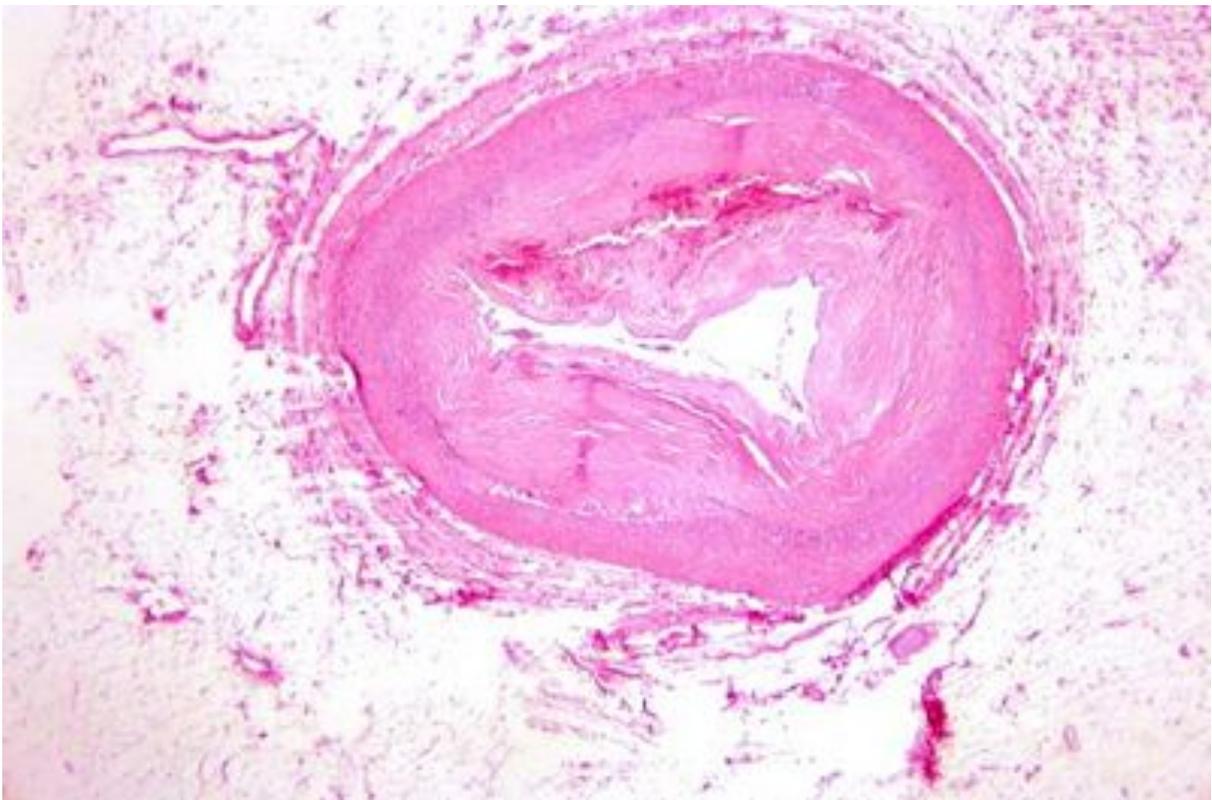


Figura 30 Oclusión subtotal de la luz arterial por trombo de fibrina y agregados plaquetarios, establecido a las 24h de la intervención en una rata del Grupo III.

La histología muestra en la arteria con trombosis a las 24h, una mayor delimitación de los agregados eritrocitarios y plaquetarios con un pequeño porcentaje de luz permeable en los vasos no suficiente para la irrigación del colgajo.

5.3.3. ARTERIAS CON TROMBOSIS A LOS 7 DÍAS

El lumen de las arterias está completamente ocluido por un trombo formado por fibrina y agregado eritrocitario.

El trombo de fibrina tiene un aspecto eosinófilo y acelular y la túnica media está infiltrada por fibrosis e histiocitos. Se observan áreas parcheadas de hemorragia de forma interdigitante con los focos de fibrosis. (Figuras 28 y 31).

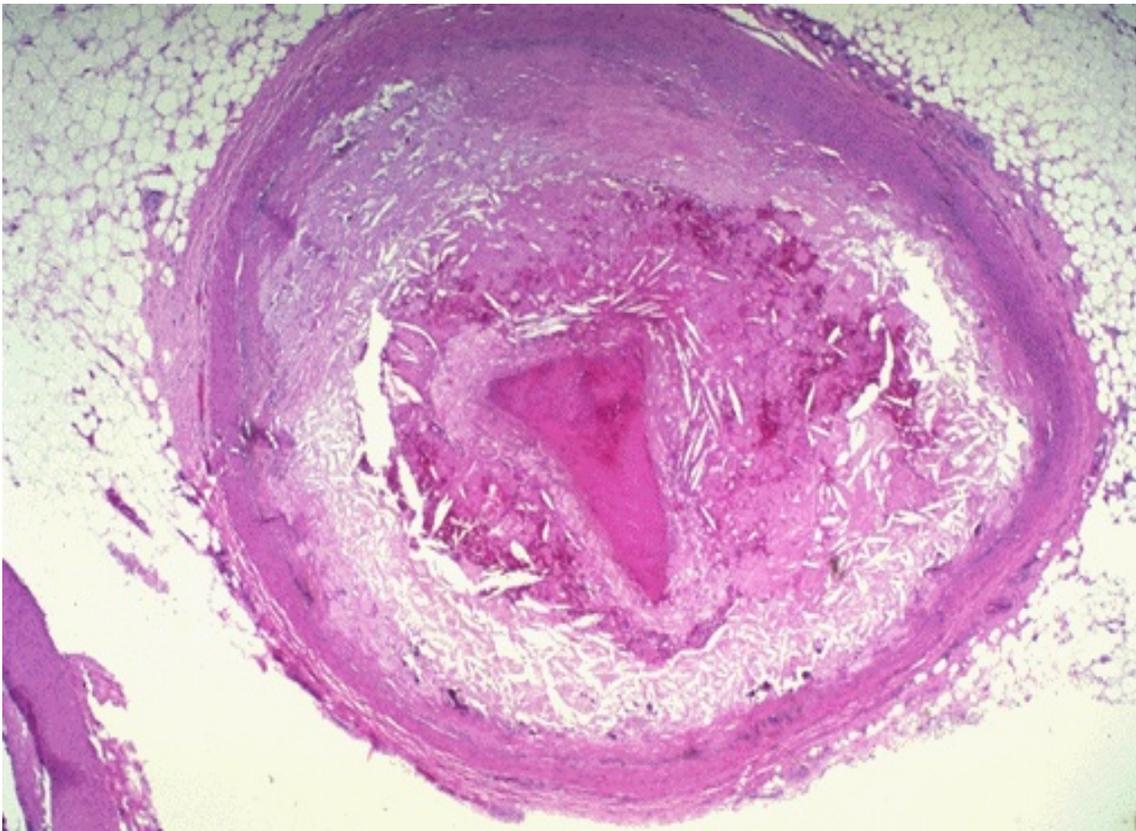


Figura 31 Sección transversal de una arterial femoral con trombosis completa, establecida entre los días 2-7 postintervención. El trombo de fibrina tiene un aspecto eosinófilo y acelular y la túnica media está infiltrada por fibrosis e histiocitos. Áreas parcheadas de hemorragia de forma interdigitante con los focos de fibrosis.

En las arterias con oclusión completa de los grupos III y IV, se observa la fibrina y un abundante agregado granulocítico no presente en los grupos I y II, a todo lo largo de la capa endotelial borrando su delimitación (Figura 32).

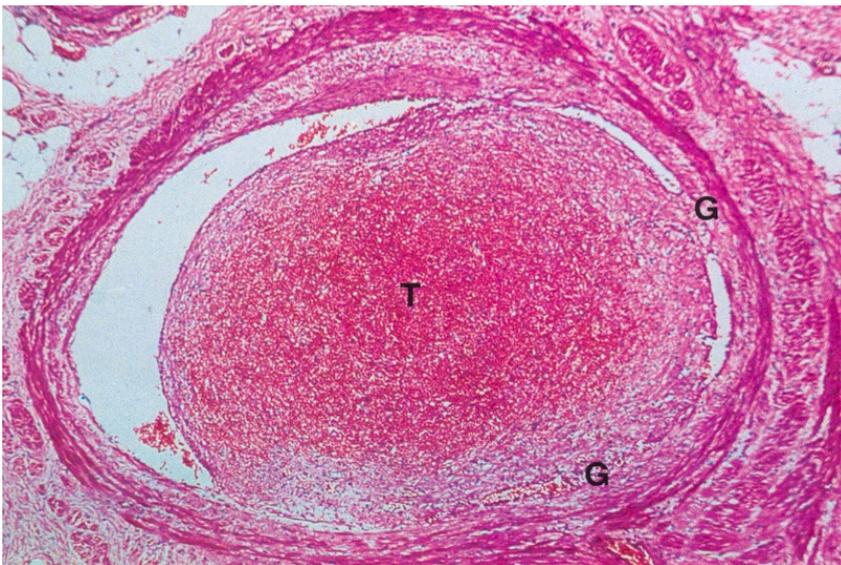


Figura 32 Sección transversal de un segmento de arteria femoral del grupo IV, con trombosis entre el día 2-7. La luz del vaso está

La sección de un corte transversal de las arteria de un colgajo necrosados a los 7 días muestra el coágulo de fibrina y las células rojas que forman un gran trombo, ocupando la casi totalidad del diámetro del lumen arterial y la íntima se ha perdido completamente (Figura 33).

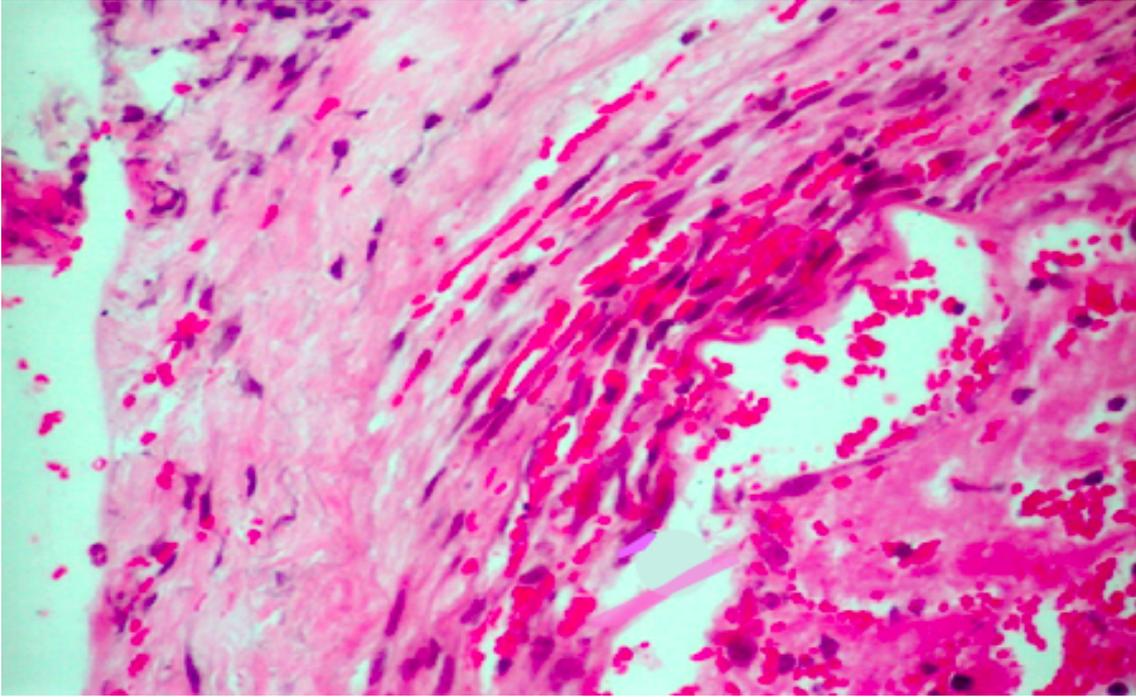


Figura 33 Región pobremente recanalizada de una arteria trombosada, compuesta por tejido conectivo fibroso (porción central de la imagen). Infiltrado histiocitario con hemosiderina en la túnica media.

En la luz de los vasos, tanto en los segmentos con trombosis y oclusión completa como los colgajos no necrosados con trombo que ocluye parcialmente la luz, se ve adherida a la pared arterial el trombo de fibrina, más eosinófilo (rosa) y acelular. En el espesor de la pared se ve un predominio de fibrosis de la capa media y un infiltrado linfoplasmocitario con histiocitos con hemosiderina (Figura 34-35)

En todos los segmentos anastomosados la cuantía de formación del trombo varía pero está presente en el 100% de los casos, y se identifican componentes tanto de la hemostasia primaria (agregados plaquetarios) como de la hemostasia secundaria (fibrina).

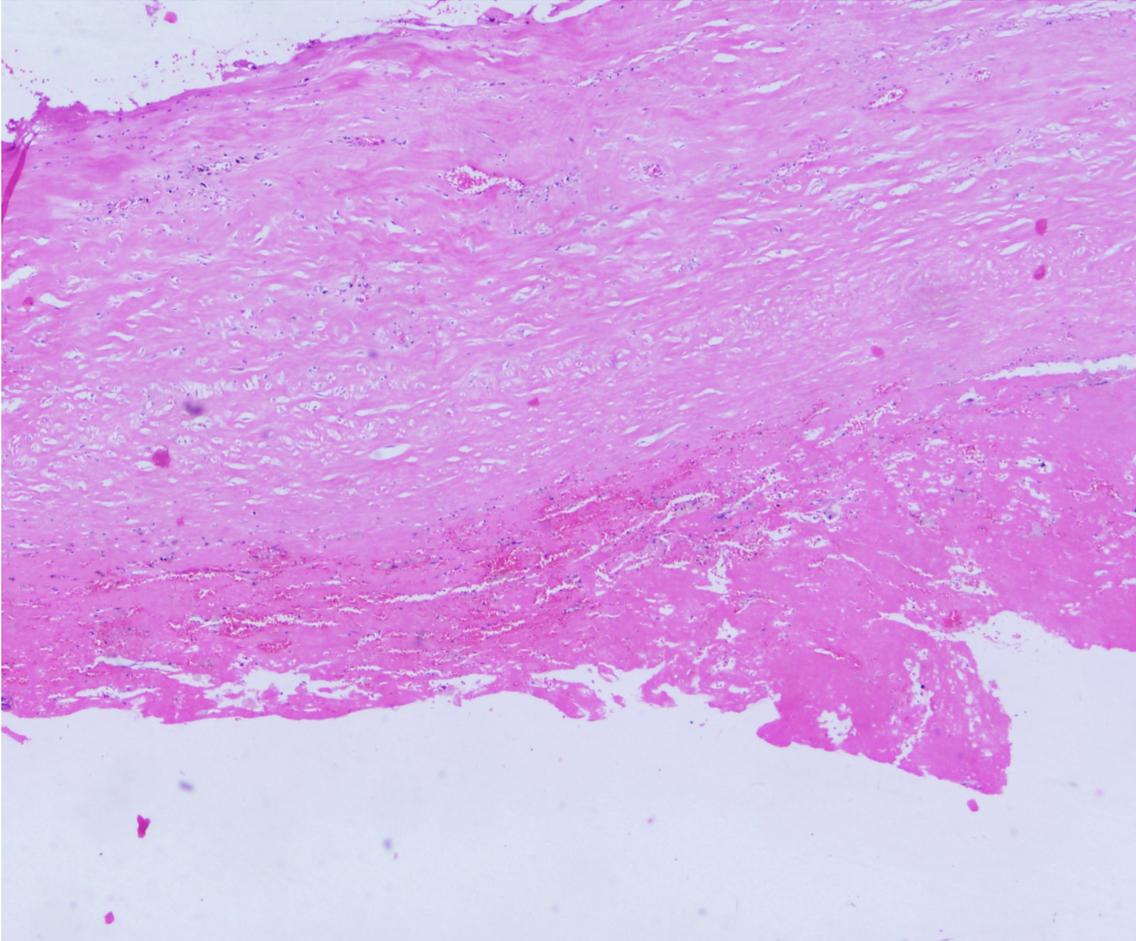


Figura 34 Pérdida de delimitación de la capa endotelial (polo inferior de la imagen) con una gruesa capa de fibrina adherida con sus características distintivas de eosinofilia y acelularidad. En la túnica media hay un predominio de infiltrado linfoplasmocitario.

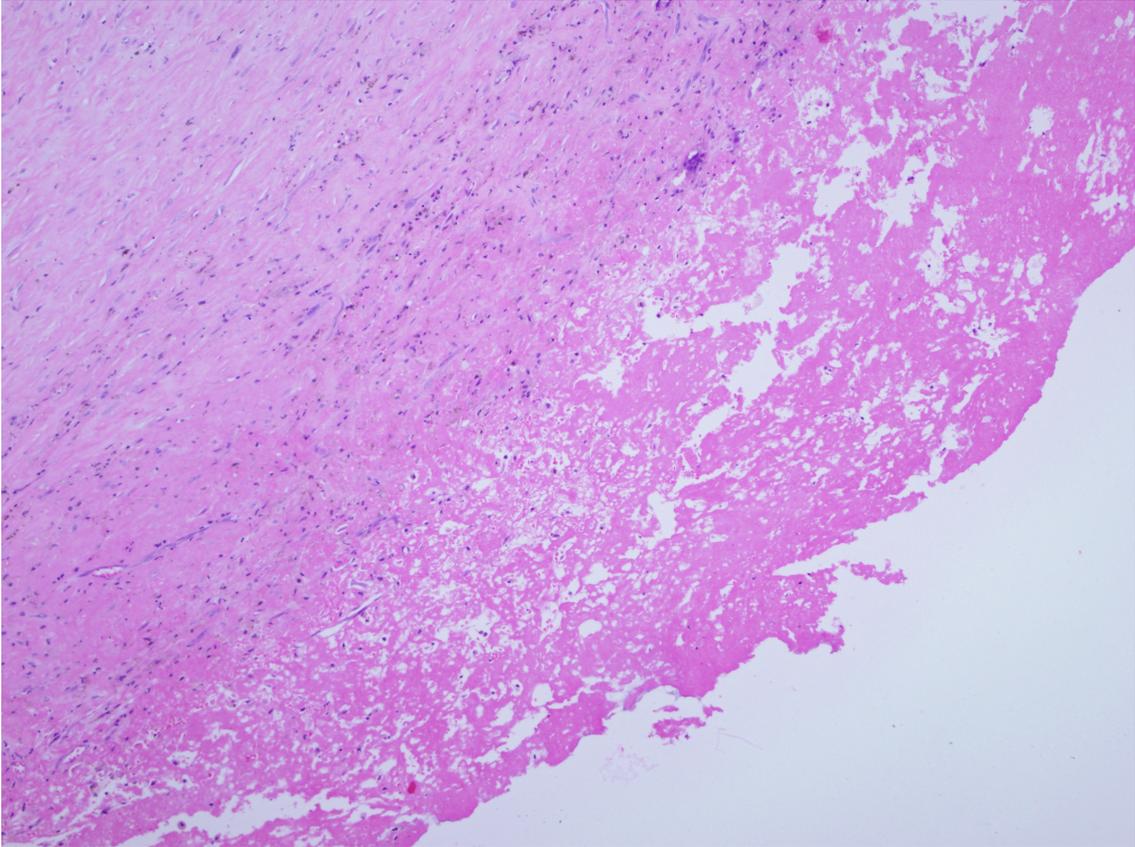


Figura 35 Abundancia de histiocitos con hemosiderina infiltrando la túnica media. Banda de fibrina ocluyendo parcialmente la luz del vaso.

5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados según grupo de estudio y momento de establecimiento de la necrosis, muestran que el grupo IV es el único en el que la mayor parte de las necrosis de los colgajos (el 66% de los colgajos necrosados) se produjo entre el segundo y el séptimo día del procedimiento quirúrgico. (Anexo A: Tabla 3).

Los valores absolutos de los colgajos necrosados comparando los grupos sin fármaco antitrombótico (grupos I y II) y grupos con fármaco antitrombótico (grupos III y IV) muestra una media de 55% de necrosis en los grupos sin fármaco (grupos control y tissucol) frente a una media del 25% de necrosis en los grupos con terapia

antitrombótica (grupos papaverina y sildenafil). (Tabla 4).

La comparación entre los 4 grupos con el test exacto de Fisher obtiene una $p=0.3118$ por lo que no se obtiene una significación estadística de los resultados (Anexo A: Tabla 5).

Si consideramos en un sólo grupo a los animales sin fármaco trombogénico (grupos I y II) (Figura 8), el resultado del test de Fisher es $p=0.1731$, más cercano a la significación estadística, pero sin llegar a ella (Figura 9).

El análisis de los grupos a las 24 horas del procedimiento, comparando las tasas de trombosis de las arterias según grupos experimentales (tabla 6), da un valor de $p=0.6706$ (Anexo A: Tabla 7).

Si consideramos en un solo grupo a los animales sin fármaco trombogénico (grupos I y II) (tabla 10), para aumentar con ello el tamaño muestral del grupo control, se obtiene un valor de $p=0.4793$, que no alcanza la significación estadística (Anexo A: Tabla 11) pese a aproximarse más a ella.

Si fusionamos el grupo control y el grupo tissucol (grupos I y II) para aumentar el tamaño muestral (Anexo A: Tabla 8), la comparación a los 7 días del procedimiento daría un resultado del test exacto de Fisher con una tendencia estadística hacia el beneficio antitrombótico de uso de papaverina y sildenafil, pero cuyo valor $p=0.1731$ no alcanza la significación (Anexo A: Tabla 9).

6. DISCUSIÓN

6.1. SITUACIÓN ACTUAL

El factor más importante en la permeabilidad de los vasos en microcirugía reconstructiva es la técnica quirúrgica, lo que incluiría una adecuada preparación de los vasos, la alineación del pedículo sin torsiones ni pliegues, mínima tensión en la anastomosis, manipulación apropiada de los vasos disecando la adventicia y no la íntima y minimización del número de suturas (144). Sin embargo, es un hecho el que todos los equipos refieren un porcentaje de fracasos (1-10%), debido a problemas técnicos, patología vascular previa, injertos vasculares de interposición, radioterapia previa o estados de hipercoagulabilidad o estasis vascular.

Existen múltiples estudios en animales en la literatura, pero escasos estudios clínicos prospectivos en humanos al respecto, y hasta el momento, ninguno a conseguido resultados concluyentes que determinen un protocolo de anticoagulación eficaz.

No existen protocolos internacionales sobre la utilización de anticoagulantes en injertos libre microvascularizados.

6.2. ELECCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

6.2.1. LA RATA COMO ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Habitualmente se utilizan modelos animales para investigar la eficacia de farmacológica de los distintos agentes antes de su uso clínico.

El modelo animal ideal de anastomosis microvascular ha sido definido por Kersh et al. (134) como aquel que cumple las siguientes características:

- En primer lugar, debe realizar un modificación vascular permanente para proporcionar una fuente continua de trombos.
- En segundo lugar, el modelo anastomótico debe imitar una reparación vascular clínica.

-En tercer lugar, el diámetro de los vasos debe medir entre 1 a 3 mm para permitir la completa obstrucción por un trombo.

-Por último, la formación del trombo debe ser gradual.

La rata es el animal elegido para el modelo de trombosis del presente estudio al ser habitualmente utilizado por cirujanos microvasculares en la práctica de anastomosis, proporcionar el tamaño adecuado de los vasos en comparación con la práctica clínica y ser relativamente barato.

En la rata, la histología de la pared de los vasos es extrapolable al humano, siendo ésta una de las causas que hacen de la rata un animal idóneo de experimentación para estudios sobre alteración de la dinámica, la fisiopatología o la anatomía vascular.

En este modelo experimental, se tiene en cuenta el sexo de la rata, ya que se ha demostrado que uno de los más potentes agentes proinflamatorios endógenos es el PAF (factor activador de plaquetas), involucrado en un gran número de enfermedades que incluyen el asma, el shock endotóxico y las enfermedades cardiovasculares.

A su vez, la actividad de la enzima inhibidora del PAF, la PAF-acetilhidroxilasa plasmática (PAF-AH) está regulada por las hormonas plasmáticas, fundamentalmente por la progesterona y los estrógenos (145).

Pese a que ninguno de los fármacos aplicados en nuestro estudio tiene descrito en la literatura una alteración en las hormonas plasmáticas, los datos descritos por Yasuda et al. (145) sugieren que el sexo es muy importante, por lo que a la hora de hacer el diseño del modelo se decide utilizar todas las ratas macho.

En cuanto al peso de las ratas, la literatura reciente afirma que el diámetro de la arteria femoral de rata se mantiene constante, en torno a 1mm, en ratas de entre 250-350g (127,146).

Incluso Rickard et al. describe en un reciente estudio que el diámetro de la arteria femoral distal al origen de la arteria epigástrica superficial caudal, no varía con el peso del animal en ratas de entre 300-500g (146).

De estos datos se concluye que cambios en el peso del roedor, en un rango amplio, no implican cambios significativos en el diámetro de los vasos, por lo que el peso de los animales de nuestra muestra estaría dentro del rango de homogeneidad del diámetro de sus arterias.

Partiendo de este animal, la arteria femoral de la rata ha sido desde las últimas tres décadas una de las herramientas más utilizadas para la práctica experimental de la anastomosis de pequeños vasos en el marco de la microcirugía, al proporcionar un modelo perfecto para el estudio de la prevención de la formación de trombos tras microanastomosis con posibilidad de diseñar un colgajo microvascular (124).

En el estudio que se expone, se ha escogido la arteria femoral de la rata para la creación de un modelo de anastomosis trombogénica reproducible, fiable, con posibilidad de repermeabilización y monitorizable por medio del colgajo inguinal. Esto cumpliría las características del modelo ideal de Kersh.

La elección del lado derecho para el diseño del colgajo inguinal en todas las ratas se debe a un intento de homogeneizar la muestra de estudio basándonos en el estudio de Rickard RF et al. (146), el cual encuentra un aumento significativamente mayor en el flujo sanguíneo de la arteria femoral derecha de las ratas que estudia con respecto al flujo sanguíneo de la arteria femoral izquierda.

6.2.2. MODELO DE SUTURA TROMBOGÉNICA

El modelo de sutura de la pared posterior lleva apenas 6 años en conocimiento de los investigadores, lo que puede explicar que haya pocos estudios basados en él.

El punto de pared posterior produce una forma de "8" en la luz. Esto aumenta la resistencia contra el paso de sangre, lo que a su vez desencadena la ruptura de la estructura laminar del flujo. La turbulencia cerca de la pared del vaso aumenta la resistencia e incrementa el contacto entre las células sanguíneas y tejido subendotelial. Esto aumenta aún más el riesgo de trombosis.

El flujo sanguíneo turbulento puede desencadenar un proceso inflamatorio. La evidencia de la inflamación en la pared del vaso con una sutura de la pared posterior se determina en este trabajo en el estudio histológico de las anastomosis de 24 horas de evolución (Figura 30) en consonancia con los datos descritos en la literatura (129). El flujo turbulento no puede crear una inflamación adecuada para causar trombosis en una hora. De aquí que en el estudio de Nasir (129) se documentaran más vasos con trombosis en 24 horas en comparación con las anastomosis estudiadas 1 hora tras la sutura, debido a que la inflamación es un proceso lento y progresivo. Por otro lado, la velocidad de la sangre tiene un perfil parabólico, que disminuye desde el centro a la periferia del vaso. Materiales trombogénicos como la adventicia pueden ser arrastrados hacia la zona intravascular por la puntada, pudiendo también causar un efecto de barrera intraluminal que perturba el patrón de flujo sanguíneo.

Nasir en su estudio, encontró una tasa de trombosis de la arteria femoral del grupo control (modelo trombogénico sin fármaco) del 28 % 1 hora tras la realización de la anastomosis y del 50 % a las 24 horas de realizar el modelo experimental. Esta ausencia de trombosis inmediata en el vaso hace que el modelo sea apto para el estudio de fármacos antitrombóticos al ser susceptible de modificar la permeabilidad del vaso al

añadir sustancias que impidan la agregación granulocítico-plaquetaria y los infiltrados de fibrina responsables de la oclusión de la luz del vaso.

Por último, recalcar que en el estudio que se presenta, en todos los segmentos anastomosados la cuantía de formación del trombo varía, pero está presente en el 100% de los casos. Esto se explica por el potencial trombogénico del punto de sutura de pared posterior en la arteria femoral que cumple las características del modelo trombogénico ideal de Kersh (124). De esta forma, el modelo ejerce su efecto de forma independiente a la adición de uno u otro tipo de fármaco antitrombótico.

6.3. ELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE EVALUACIÓN

Pese a la introducción de varios métodos punteros en los últimos años, ninguna de estas técnicas cumple todos los denominados “criterios ideales” de monitorización de un colgajo: 1. Debe ser manejable; 2. El resultado obtenido debe ser rápido; 3. Debe ser sensible y específico; 4. Reproducibilidad de resultados; 5. Aplicabilidad a todo tipo de colgajos en cualquier localización; 6. El equipamiento del dispositivo debe ser de montaje sencillo de forma que incluso personal inexperto sea capaz de identificar un fracaso circulatorio del colgajo.

El sistema de vigilancia ideal sería aquel que cumpla las características de seguridad, confiabilidad, sencillez de manejo, bajo costo, no invasivo y alta sensibilidad y especificidad (137). El estudio de Gimber (138) es el primero en analizar de forma específica los dispositivos para monitorización del injerto libre microvascularizado, describiendo su capacidad para diagnosticar la oclusión venosa parcial, pero pese a que el láser Doppler se identifica como el método no invasivo de mayor éxito en la detección de oclusión venosa parcial, no cumpliría las características del modelo ideal al precisar entrenamiento específico del manejo del instrumental sin tampoco obtener un

100% de especificidad y sensibilidad de los resultados.

En este estudio, la autora identifica de visu por el color del colgajo la obstrucción vascular, y para ello la inspección clínica era suficiente. Este hecho se demuestra en el estudio histológico de las anastomosis ya que siempre que el colgajo epigástrico estaba negro había trombosis, y siempre que el color de la piel era normal, en la histología la arteria funcionaba, lo cual corrobora la validez de la técnica de evaluación del estudio.

Ante la amplia gama de sofisticados métodos de monitorización de los injertos microquirúrgicos, el cirujano reconstructivo no debe perder la idea de que lo primero es observar las características de la zona reconstruida, y más aún en el caso de injertos microvasculares con isla cutánea de la que se puedan obtener datos objetivos a tiempo real. Varkey et al. en su estudio publicado en el 2008 (136), describe cómo mediante fotografía digital y el envío de las imágenes por internet, es posible obtener un método altamente eficiente, de gran rentabilidad coste-efectividad, al alcance de todo cirujano. Este autor presenta un análisis de 67 casos monitorizados con esta técnica, a través del envío por internet de las imágenes realizadas por el personal de enfermería del servicio de reanimación postquirúrgica, valoradas a tiempo real por el microcirujano reconstructor responsable. Este método permitió disminuir considerablemente el sesgo interobservador y así poder solucionar situaciones de dudosa congestión del injerto para rescatar el pedículo vascular.

6.3.1. ELECCIÓN DEL COLGAJO INGUINAL

Con el colgajo inguinal, se pretende reproducir una situación clínica que ocurre en la práctica habitual del cirujano reconstructivo cuando se realiza la transferencia de tejido microvascularizado, en la cual el pedículo vascular que irriga el tejido a reimplantar se

secciona y se anastomosa en los vasos receptores, siendo susceptible de trombosis por factores intrínsecos al paciente (alteraciones en la coagulación tanto por hipercoagulabilidad como por necesidad de anticoagulación por cardiopatía) como fundamentalmente por fallos en la técnica quirúrgica.

El modelo de colgajo inguinal se ha utilizado anteriormente para una amplia gama de estudios experimentales sobre isquemia y reperfusión (148-151).

Las dimensiones del colgajo diseñado en este trabajo son de 2x1 cm, tamaño menor que los colgajos descritos por otros autores cuyas dimensiones medias son de 6 x 3.5 cm (148-151). La autora no considera la necesidad de un diseño mayor, ya que podría ser susceptible de sesgo tanto a favor de la vitalidad del colgajo por vascularización de los bordes del colgajo por ramas comunicantes del recto del abdomen o del dorsal ancho, como por mayor susceptibilidad de necrosis de los bordes por déficit de vascularización terminal.

Por ello, el diseño del colgajo inguinal de este estudio se centra en la piel concéntrica al pedículo femoral.

Pese a que la paleta cutánea del colgajo del modelo se basa en la arteria epigástrica, ésta se aleja del diámetro habitual de los vasos receptores y donantes que se anastomosan en la práctica clínica habitual en microcirugía, aumentando en gran medida el riesgo de trombosis por la gran dificultad técnica que supondría la anastomosis. Por ello, el modelo de sutura trombogénica utilizado se centra en el pedículo principal de la arteria femoral, cuyo diámetro de 1 mm simula la anastomosis realizada en humanos.

Ante la amplia gama de sofisticados métodos de monitorización de los injertos microquirúrgicos, el cirujano reconstructivo no debe perder la idea de que lo primero es observar las características de la zona reconstruida, y más aún en el caso de injertos microvasculares con isla cutánea de la que se puedan obtener datos objetivos a tiempo

real. Los métodos convencionales de medición de la temperatura del colgajo, la turgencia, el color y el relleno capilar, son los pilares en los que debemos centrar nuestra primera valoración del injerto y así como las posteriores valoraciones seriadas para contrastar los resultados. De ahí la utilización de un modelo microquirúrgico que permita de forma directa, rápida y sencilla, la monitorización de la permeabilidad de la anastomosis a través de las constantes clínicas de la isla de piel.

La desventaja que aparece en el modelo del colgajo inguinal es que está muy a mano para que la rata, cuando aparece la necrosis del colgajo, se muerda los puntos y se coma el colgajo, como ocurre en el trabajo que se presenta.

6.4. GRUPOS EXPERIMENTALES

6.4.1. GRUPO CONTROL

La lesión artificial generada en el vaso elegida para nuestro estudio, debe aumentar el porcentaje de trombosis precisamente para poder demostrar diferencias estadísticamente significativas o una tendencia estadística que permita sacar conclusiones.

Sin embargo, tras la crítica reducción del flujo vascular ocasionado por el punto de pared posterior, el cuál es considerado en la práctica clínica humana una reconocida causa de trombosis, cabría esperar un porcentaje de permeabilidad cercano a 0% y sin embargo en el grupo control se obtiene un 40% de colgajos con anastomosis permeables.

Este dato hace pensar en un mejor comportamiento biológico de la rata frente al humano, con algún mecanismo de dilatación reactiva que permite que el flujo arterial supere el obstáculo en el interior del vaso.

Esta hipótesis se apoya en los hallazgos histológicos que se obtienen, ya que ninguna sección de las anastomosis arteriales muestra la imagen en “8” en la zona del punto de

pared posterior como cabría esperar según el diseño del modelo de sutura trombogénica. También ayudaría el que la estructura anatómica de la arteria, con sus capas musculares y elásticas, tienda a mantener la forma circular evitando el aplastamiento. Esto se observa en los cortes histológicos de la figura 29, donde pese a la desestructuración completa de la túnica íntima y la túnica media, la LEE mantiene el esqueleto externo del vaso y la integridad estructura en capas de la arteria.

Por otro lado, las cirugías conllevan un sangrado, y por lo tanto se produce algo de hipovolemia que la rata revierte al terminar la cirugía y la anestesia con la ingesta de líquido. Esto ocasiona una cierta hemodilución que favorecería el flujo sanguíneo con disminución de la turbulencia.

6.4.2. GRUPO “TISSUCOL”

Los hallazgos macroscópicos y el examen histológico de las muestras en las que al modelo de trombosis se le ha añadido únicamente el vehículo transportador de fármacos (tissucol[□]), son congruentes con la literatura previa en la que este pegamento de fibrina no muestra propiedades trombogénicas inherentes (65,67). La tasa de trombosis de este grupo presenta datos similares al grupo control (50% de colgajos trombosados frente a un 40% de colgajos trombosados en el grupo control), diferencias no estadísticamente significativas ($p=0.3118$).

En la literatura no hay nada que apoye la trombogénicidad del tissucol, incluso podría reducir un potencial efecto antitrombótico tanto al reducir la movilidad de la arteria al fijarla de forma elástica en el lecho quirúrgico, como por su efecto sellador impidiendo la filtración de sangre en anastomosis técnicamente imperfectas y por tanto, impidiendo la formación de un trombo transmural.

Aunque se precisarían estudios experimentales para probar estos datos ya que también

cabría la posibilidad de que contrariamente, el tissucol aumentara el riesgo de trombosis por su composición de fibrina que filtre por la pared o por la hendidura entre las suturas de la anastomosis al interior del vaso.

En todo caso, existe una diferencia del 10% de necrosis entre el grupo control y el grupo tissucol, que pudiera mantenerse o aumentar si incrementáramos el tamaño muestral.

La histología de las arterias de este grupo muestra las características generales presentes en el grupo control, con la capa íntima comprometida de forma total o parcial, perdiendo su delimitación celular y siendo infiltrada por células inflamatorias, pero sin infiltrado granulocítico-macrófago en mayor grado que el grupo control, lo que indica que no existe indicativa reacción mayor a cuerpo extraño y, en la opinión de la autora esto se debe a que el tissucol es bien tolerado por el organismo.

6.4.3. GRUPO “PAPAVERINA”

Comparando los valores absolutos de los colgajos trombosados de los grupos I y II con respecto a los grupos III y IV, se observa que la adición de papaverina o sildenafil disminuye la tasa de necrosis del colgajo pero no se obtiene significación estadística (tabla 4).

El vasoespasmó reduce el flujo sanguíneo del injerto microvascular lo cual es un factor con potencial de aumentar la morbilidad/mortalidad del paciente, incrementa la dificultad técnica de la anastomosis, (152) y puede influir en las decisiones a la hora de reconstruir un defecto oncológico con un injerto libre microvascularizado o por el contrario, optar por un colgajo pediculado o regional. A su vez, el descenso del flujo vascular de forma intraoperatoria hace que el vaso sea más susceptible de sufrir una oclusión crónica.

En la práctica clínica habitual de la autora, la papaverina sólo se utiliza en

ocasionalmente para irrigar las perforantes durante la disección del injerto microvascular para evitar el vasoespasmó, pero no habitualmente durante la anastomosis microvascular a no ser que la arteria tenga mucho espasmó, ya que se ha comprobado que las arterias irrigadas pierden su estructura externa y quedan desfleçadas. Este dato apoyaría los resultados del estudio de Gao et al. (32).

Generalmente, la autora y el equipo en el que trabaja, utilizan en su práctica clínica habitual intraoperatoria 10mg de papaverina para prevenir y tratar el vasoespasmó en una concentración de 1mg/ml, por lo que se utiliza la misma dosis en el estudio experimental con ratas que se describe.

La dosis de papaverina empleada en la literatura varía ampliamente hasta un máximo de 50 mg (153) y las concentraciones descritas varían desde 0.3 mg/ml a 1.5 mg/ml, lo que dificulta los resultados entre estudios comparativos. Sin embargo, Dregelid et al. (30) encontraron que el incremento de la concentración de papaverina tópica de 0.8 mg/ml a 1.5 mg/ml, no incrementa el flujo en el injerto de arteria mamaria interna, lo que sugiere que las concentraciones dentro de ese rango tienen efectos similares.

El resultado en la tasa de trombosis del grupo experimental tratado con papaverina, indica un descenso considerable en el porcentaje de colgajos necrosados, datos acordes con los encontrados en la literatura publicada hasta ahora (40). La explicación a este hecho podría ser que al dilatar la arteria el flujo es menos turbulento pese a que teóricamente, al dilatar el vaso, se podría pensar que el flujo se endentece, y habría más trombosis. Pero esto no sucede en la rata ya que todo el flujo que debería ir a la pata va por esa anastomosis, hasta llegar a los vasos epigástricos que irrigan directamente el colgajo inguinal que se monitoriza clínicamente.

Esto da una idea de la enorme presión que llevan los vasos femorales en nuestro modelo y que por tanto, la anastomosis se ve favorecida tras la aplicación de fármacos

vasodilatadores como la papaverina.

6.4.4. GRUPO “SILDENAFILO”

Los resultados del estudio presentan un porcentaje de trombosis en las arterias irrigadas con sildenafil muy similar al porcentaje de trombosis obtenido con la irrigación con papaverina (30% trombosis con sildenafil frente al 20% de trombosis con papaverina).

La histología arterial es igualmente muy similar en este grupo al compararla con el grupo anterior, con la única diferencia en el momento de presentación de la trombosis; mientras que en el grupo tratado con papaverina en el 100% de los colgajos necrosados dicha necrosis se estableció clínicamente a las 24h de la intervención (2/2 injertos trombosados), en el grupo tratado con sildenafil la necrosis de los colgajos se presentó clínicamente en un 66% de las ocasiones entre los días 2-7 postquirúrgicos (2/3 colgajos necrosados presentaron datos clínicos de necrosis pasadas las 24h tras la anastomosis).

Este dato no es estadísticamente significativo ($p=0.3118$) pero indica una tendencia, lo que podría estar en relación con el doble efecto del sildenafil (vasodilatador y antiagregante plaquetario) en comparación con la papaverina (sólo tiene propiedades vasodilatadoras). Este hecho sería la causa del retraso en el establecimiento de la trombosis del pedículo vascular.

6.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Se decidió realizar su trabajo con un tamaño muestral de 40 ratas basándose en estudios previos de similares características (139,154,155) y estando limitada su investigación por los factores tiempo de estudio, subvención económica e infraestructura del departamento de experimentación animal.

Se podrían haber hecho sólo dos grupos comparando el fármaco a estudiar, el sildenafil, con el grupo control, o tres grupos si también comparamos con el vehículo, pero la autora quería comparar el sildenafil con algún fármaco ya muy probado para poder tener una idea más clara de la importancia relativa que pudiera tener el sildenafil.

Otra limitación del estudio que se discute es la temperatura a la que se irrigan los fármacos.

Según el estudio publicado por Mulay y colaboradores (156), cuando la papaverina se administra de forma tópica diluida en una solución normotérmica (37°), el poder vasodilatador es superior a cuando la disolución está a temperatura ambiente (21°).

La papaverina inhibe la actividad de la enzima fosfodiesterasa intracelular, incrementando el AMP cíclico. La actividad de la fosfodiesterasa es mayor en normotermia.

Por otro lado, algunos autores han descrito que la hipotermia relativa de una solución podría ser vasoespástica por sí misma (152). Este hecho sería interesante tenerlo en cuenta en el caso del tissucol, ya que para su administración requiere previamente ser descongelado, siendo muy variable la temperatura de administración entre sujetos de estudio.

La autora de este estudio no efectúa un control de la temperatura exacta a la que se irriga el fármaco una vez que lo descongela, hecho que puede ser fuente de variabilidad interindividual de una rata a otra. Esto sería objeto de investigaciones adicionales para

demostrar si ciertamente, la actividad de un fármaco varía por el hecho de ser administrado a una temperatura u otra.

En el estudio que se presenta no se ha controlado el factor térmico a la hora de administrar la droga. Sin embargo, todos los modelos trombogénicos se han realizado en las mismas condiciones ambientales, así como el mantenimiento de las ratas durante los 7 días de estudio postquirúrgico, el cual se ha llevado a cabo en condiciones idóneas de humedad, luz, temperatura y alimentación regidas por el Instituto de Investigación Experimental del Hospital Universitario La Paz.

6.6. RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS RESULTADOS

La demostración de que el sildenafil y la papaverina aumentan la probabilidad de éxito de las anastomosis microvasculares en este modelo animal podría servir de base para utilizar un protocolo similar en la microcirugía en el ser humano. Sin embargo, este paso debería darse con cierta cautela, y sería necesario efectuar nuevos experimentos, con animales de mayor tamaño, como el cerdo, antes de utilizar esta terapia en la clínica humana.

El retraso encontrado en el establecimiento de la trombosis del grupo “sildenafil” podría indicar un beneficio terapéutico mayor que el generado por la papaverina, al otorgar un mayor tiempo para el rescate de los injertos necrosados en el caso de establecerse una trombosis irreversible.

El modelo de sutura trombogénica utilizado, se muestra como un modelo de gran utilidad para futuros estudios experimentales con fármacos antitrombóticos, al demostrar en este estudio que presenta las características de idoneidad para tal efecto.

El tissucol se muestra como un adecuado vehículo de transporte de fármaco en anastomosis vascular, al carecer de propiedades tromboembólicas y no alterar las

propiedades de los fármacos a estudiar. Este hecho puede ser de gran utilidad para futuros estudios en terapia antitrombótica.

7. CONCLUSIONES

1. En este estudio no se establece un beneficio estadísticamente significativo con la aplicación del sildenafil en la anastomosis microvascular en comparación con la papaverina.
2. El estudio no demuestra diferencias significativas entre los diferentes grupos, pero sí sugiere un beneficio al aplicar papaverina y sildenafil en la anastomosis trombogénica, frente a la no aplicación de fármacos antitrombóticos.
3. El establecimiento de la trombosis en los colgajos necrosados en el grupo tratado con sildenafil se produjo de forma más tardía que en el grupo tratado con papaverina, con una tendencia estadística pero sin llegar a ser significativa.
4. Los resultados demuestran que el tissucol por sí mismo no parece ser trombogénico, objetivando su utilidad como vehículo transportador de fármacos en microcirugía.
5. El modelo de sutura de pared posterior asociado al colgajo inguinal con anastomosis microvasculares, es apto para el estudio de la oclusión vascular en microcirugía, así como para evaluar múltiples candidatos a fármacos antitrombóticos. Se trata de un modelo animal relativamente sencillo, barato y reproducible.
6. La técnica de monitorización mediante estimación clínica del colgajo inguinal microvascularizado y registro con fotografía digital, se presenta como un método fiable, reproducible, rápido, de fácil aplicabilidad y con un 100% de

sensibilidad y de especificidad en este estudio.

7. Este trabajo puede servir de base para efectuar nuevos experimentos con animales de mayor tamaño, como el cerdo, antes de investigar su utilidad en el ser humano.

8. RESUMEN

La trombosis de las anastomosis vasculares en el campo de la microcirugía reconstructiva es un problema clínico de extraordinaria relevancia por las consecuencias que supone para el paciente. El fracaso de los procedimientos microvasculares se relaciona estrechamente con la trombosis y/o con el espasmo vascular en el sitio de la anastomosis.

El uso de vasodilatadores en microcirugía humana es controvertido ya que su administración sistémica podría provocar hipotensión y afectar negativamente a la perfusión del colgajo. Por ello, los vasodilatadores sólo se utilizan tópicamente alrededor de la anastomosis vascular. La papaverina es un alcaloide del opio también ampliamente utilizado por su potente efecto vasodilatador se debe a la inhibición de la fosforilación oxidativa y del flujo del calcio durante la contracción muscular.

El sildenafil, potente inhibidor de la PDE5, ha demostrado su acción relajante vascular sobre el sistema vascular periférico y su capacidad in vivo de reducir la agregación plaquetaria, mejorando la vascularización de colgajos locales experimentales con vascularización aleatoria, administrado vía oral, intraperitoneal y local en el colgajo.

No existe ningún estudio hasta la fecha sobre el efecto del sildenafil en las anastomosis microvasculares, ni en el ámbito experimental ni en el ámbito clínico. Por ello el objetivo fundamental del presente estudio ha sido determinar el beneficio producido por la aplicación tópica de sildenafil en la anastomosis vascular en comparación con el método estándar de vasodilatación con papaverina tópica.

Material y Métodos

Se utilizan 40 ratas a las que se efectúa un colgajo inguinal pediculado en la arteria femoral, en la que se lleva a cabo una anastomosis microvascular con el modelo de sutura trombogénica de pared posterior. Tras la anastomosis microquirúrgica se

comprueba la permeabilidad del vaso y posteriormente los animales son distribuidos equitativamente y de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales, según el fármaco aplicado tópicamente sobre el segmento arterial anastomosado. Los grupos fueron: Control (no se irriga el vaso con ningún fármaco), Tissucol, Papaverina, Sildenafil.

Se recoloca finalmente el colgajo en su localización inguinal y los animales se estudian a las 24 horas y a los 7 días mediante estudio macroscópico y fotografía digital del colgajo.

A los 7 días, los animales se sacrifican y se preparan para el estudio histológico del segmento arterial anastomosado.

Resultados

El estudio macroscópico visual del colgajo a las 24 horas da como resultado 11 colgajos necrosados del total de 16 colgajos. A los 7 días se estableció la necrosis del colgajo en 5/16 colgajos necrosados.

Grupo I: De los colgajos necrosados, en 4/6 (66%) se estableció la trombosis en las primeras 24 h y en 2/6 colgajos (33%) entre el segundo y el séptimo día postquirúrgico.

Grupo II: La necrosis se produjo en 4/5 de los colgajos (80%) en las primeras 24 horas y en 1/5 de los colgajos (20%) entre el día 2-7 postquirúrgico.

Grupo III: Establecimiento de la necrosis en el 100% de los colgajos (2/2) en las primeras 24 horas.

Grupo IV: En 1/3 casos (33%) la necrosis se produjo en las primeras 24 horas y en 2/3 casos (66%) la necrosis del colgajo se estableció entre el segundo y el séptimo día postquirúrgico.

En el estudio histológico de los segmentos arteriales, se observa que en todas las muestras la cuantía de formación del trombo varía pero está presente en el 100% de los

casos, y se identifican componentes tanto de la hemostasia primaria (agregados plaquetarios) como de la hemostasia secundaria (fibrina).

Los resultados según grupo de estudio y momento de establecimiento de la necrosis, muestran que el grupo IV es el único en el que la mayor parte de las necrosis de los colgajos (el 66% de los colgajos necrosados) se produjo a las 24 horas (Tabla 3).

Los valores absolutos de los colgajos necrosados comparando los grupos sin fármaco antitrombótico (grupos I y II) y grupos con fármaco antitrombótico (grupos III y IV) muestran una clara reducción en la tasa de necrosis de los colgajos al utilizar papaverina o sildenafil frente al no utilizar terapia antitrombótica (grupo control y grupo tissucol) (Tabla 4).

La comparación entre los 4 grupos con el test exacto de Fisher obtiene una $p=0.3118$ por lo que no se obtiene una significación estadística de los resultados (tabla 5).

Conclusiones

En este estudio no existen diferencias significativas entre los grupos de estudio, ni con los controles ni entre los experimentos. Asimismo, no hay diferencias entre los tiempos de isquemia con o sin fármacos.

El establecimiento de la trombosis en los colgajos necrosados en el grupo tratado con sildenafil se produjo de forma más tardía que en el grupo tratado con papaverina, con una tendencia estadística pero sin llegar a ser significativa.

Los resultados demuestran que el tissucol por si mismo no parece ser trombogénico, objetivando su utilidad como vehículo transportador de fármacos en microcirugía.

El modelo de sutura de pared posterior asociado al colgajo inguinal con anastomosis microvasculares, es apto para el estudio de la oclusión vascular en microcirugía, así como para evaluar múltiples candidatos a fármacos antitrombóticos. Se trata de un

modelo animal relativamente sencillo, barato y reproducible.

9. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Chance GE. Anatomy of the rat. American philosophical society. Hafner Publishing company 1963.
- (2) Popesko P, V.Rajtová, J. Horák. A colour Atlas of Anatomy of small laboratory animals, vol 2. Wlofe Publishing 1992.
- (3) Wheater P.R., Birkitt H.G., Stevens A., Lowe JS. Histopatologia básica, Texto y atlas en color. Alhambra Logman S.A. 1992.
- (4) Curran RC, Croker J. Currant's atlas of Histopatology. Harvey Miller Publishers. 2000.
- (5) Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:17-25.
- (6) Caterina RD, Husted S, Wallentin L. For the Task Force of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;28:880-913.
- (7) MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 1964;202:98-99.
- (8) Schafer AI. Coagulation cascade: an overview. Thrombosis and hemorrhage. Blackwell Scientific, Boston, 1994.
- (9) Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Platelet coagulation complex assembly in a tissue-factor initiated system. *Br J Haemat* 1994;88:364-371.
- (10) Gardiner E.E, Berndt M.C. Arterial thrombosis: going, gone!. *Blood* 2010;116:2201-2202.
- (11) Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Berndt MC. Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life* 2004;56:13-18.
- (12) Halperin JL. Ximegalatran compared with warfarin for prevention of thromboembolism in patients with non-valvular atrial fibrillation: rationales, objectives and design of a pair of clinical studies and baseline patient characteristics. *Am Heart J*

2003;146:431-438.

(13) Navarro JL, Cesar JM, Fernández MA, Fontcuberta J, Reverter JC, Gol-Freixas J. Morbilidad y mortalidad en pacientes con tratamiento anticoagulante oral. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:1226-1232.

(14) Mandava P, Thiagarajan P, Kent TA. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists in acute ischaemic stroke: current status and future directions. *Drugs* 2008;68:1019-1028.

(15) Zhanga L, Zhanga Z, Zhanga RL. Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. *Brain Research* 2006;1118:192-198.

(16) Mac Donald D.J.F. Anaesthesia for microvascular surgery. A physiologic approach. *Br J Anaesthesia* 1985;57:904.

(17) Cochrane D.F. Anaesthesia for microvascular surgery. *Clinical Anaesthesiology* 1987;1:747.

(18) Hallock, G G. Intimal staining for visibility enhancement during microanastomosis. *Ann Plast Surg* 2006;122:192.

(19) Furnas H, Rosen JM. Monitoring in microvascular surgery. *Ann Plast Surg* 1990;86:492.

(20) Sesin J, Tamargo J. Efecto del cilazapril, un inhibidor de la enzima de conversión , sobre la hipertrofia cardiovascular del paciente hipertenso. *Medicina* 1996;56:75-85.

(21) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.

(22) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.

(23) Ignarro LJ. Nitric oxide-mediated vasorelaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;255:1256-1264.

- (24) Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1993;268:8410-1413.
- (25) Souto S, Palma P, Riccetto C, Seabra AB, Oliveira M. Impacto en la administración de un donante de óxido nítrico en gel en el flujo sanguíneo clitoridiano, medido por eco-Doppler. *Actas Urol Esp* 2010;34:708-712.
- (26) Banic A, Krejci V. et al. Effects of extradural anaesthesia on microcirculatory blood flow in free latissimus dorsi musculocutaneous flaps in pigs. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1997;100:945-956.
- (27) Zhang J, Lipa J.E, Huang N, Neligan P.C, Ling F.T, Levine R.H, et al. Pharmacological characterization of vasomotor activity of human musculocutaneous perforator artery and vein. *J Appl Physiol* 2000;89:2268-2275.
- (28) Nitz RE, Fiedler VB. Molsidomine: alternative approaches to treat myocardial ischemia. *Pharmacotherapy* 1987;7:28-37.
- (29) Kopitnik TA, Purdy PD, Batjer HH, Samson DS. Treatment of traumatic arterial vasospasm with intraarterial papaverine infusión. *Am J Neuroradiol* 1995;16:319-321.
- (30) Dregelid E, Heldal K, Resch F, Strangeland L, Breivik K, Svendsen E. Dilation of the internal mammary artery by external and intraluminal papaverine application. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:697-703.
- (31) Evans GRD, Gherardini G, Gurlek A. Drug-induced vasodilation. An in vitro and in vivo study: The effects of nicardipine, papaverine and lidocaine on the rabbit carotid artery. *Plast Reconstr Surg* 1997;100:1475-1481.
- (32) Gao Y.J, Yang H, Teoh K. Detrimental effects of papaverine on the human internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:179-185.
- (33) Sasson L, Cohen AJ, Hauptman E, Schachner A. Effect of topical vasodilators on internal mammary arteries. *Ann Thorac Surg* 1995;59:494-496.

- (34) Takeuchi K, Sakamoto S, Nagayoshi Y, Nishizawa H, Matsubara J. Reactivity of the human internal thoracic artery to vasodilators in coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;26:956-959.
- (35) Vilandt J, Kjaergard H, Aggestrup S, Andreasen JJ, Olesen A. Intraluminal papaverine with pH 3 doubles blood flow in the internal mammary artery. *Scand Cardiovasc J* 1999;33:330-332.
- (36) Schwartz A, Matlib M, Balmwierzczak J, Lathrop DA. Pharmacology of calcium antagonists. *Am J Cardiol* 1985;15:234-241.
- (37) Scarborough NL, Carrier CO. Nifedipine and Alpha Adrenoreceptors in rat aorta. Role of extracellular calcium in Alpha 1 and Alpha 2 Adrenoreceptor mediated vasoconstriction. *J Pharma Exp Ther* 1984;231:597-602.
- (38) Panagiotopoulos KE, Koutsouris M, Panagiotopoulos E. The effect of Nifedipine on the Patency of Microvascular Anastomosis in rats. *Acta Chirurgiae Plasticae* 2008;50:33-35.
- (39) Emery F.M, Kodey T.R, Bomberger R.A, Mc Gregor D.B. The effect of nifedipine on skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1990;85:61-63.
- (40) Miller A.P, Falcone R.E, Nappi J. The lack of effect of nifedipine on failing skin flap. *Dermatol Surg Oncol* 1985;11:612.
- (41) Hira M, Tajima S, Sano S. Increased survival length of experimental flap by calcium antagonist nifedipine. *Ann Plast Surg* 1990;24:454-458.
- (42) Pal S, Khazanchi RK, Moudgil K. An experimental study on the effect of nifedipine on ischemic flap. *Br J Plast Surg* 1991;44:299-301.
- (43) Gherardini G, Jernbeck J, Samuelson U, Heden P. Effects of Calcitonin gene-related peptide and lidocaine on mechanically induced vasospasm in an island flap in the rat. *J Reconstr Microsurg* 1995;11:179-183.

- (44) Gherardini G, Evans G.R.D, Milner S.M. Comparison of vascular effects of calcitonin gene-related peptide and lidocaine on human veins. *J Reconstr Microsurg* 1996;12:239-243.
- (45) Clarke R.J, Mayo G, Price P, Fitzgerald G.A. Suppression of thromboxane A2 but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J Med* 1991;325:1137.
- (46) Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 1994;330:1287.
- (47) Taylor D.W, Barnett H.J, Haynes R.B. Low-dose and high-dose acetylsalicylic acid for patients undergoing carotid endarterectomy: A randomised controlled trial-ASA and Carotid Endarterectomy (ACE) Trial Collaborators. *Lancet* 1999;353:2179.
- (48) Awtry E.H, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation* 2000;101:1206.
- (49) Conrad M.H, Adams W.P. Pharmacologic Optimization of Microsurgery in the New Millennium. *Plast Reconstr Surg* 2001;108:2088.
- (50) Ching S, Thoma A, Monkman S, Kelton JG. Inhibition of microsurgical thrombosis by the platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist SR121566A. *Plast Reconstr Surg* 2003;112(1):177-185.
- (51) Yates Y.J, Farias C.L, Kazmier F.R, Puckett C.L, Concannon M.J. The effect of tirofiban on microvascular thrombosis: crush model. *Plast Reconstr Surg* 2005;116(1):205-208.
- (52) Hirsh J, Raschke R. Heparin and low – molecular – weight heparin. The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:188S-203.
- (53) Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy: II. Maintenance of vascular graft or arterial patency by antiplatelet therapy. *Br Med J* 1994;308:159.

- (54) Hsia J, Hamilton W.P, Kleiman N, Roberts R, Chaitman B.R, Ross A. A comparison between heparin and low-dose aspirin as adjuvntive therapy with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: Heparin-Aspirin Reperfusion Trial (HART) Investigators. *N Engl J Med* 1990;323:1433.
- (55) Pugh C.M, Dennis R.H, Massac E.A. Evaluation of intraoperative anticoagulants in microvascular free-flap surgery. *J Natl Med Assoc* 1996;88:655.
- (56) Von Segesser LK, Mueller X, Marty B, Horisberger J, Corno A. Alternatives to unfractionated heparin for anticoagulation in cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 2001;16:411-416.
- (57) Reichel C.A, Croll G.H, Puckett C.L. A comparison of irrigation solutions for microanastomoses. *J Hand Surg* 1988;13:33.
- (58) Atiyeh B.S, Hashim H.A, Hamdan A.M, Musharafieh R.S. Local recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) thrombolytic therapy in microvascular surgery. *Microsurgery* 1999;19:265.
- (59) Schubert W, Hunter D.W, Guzman-Stein G. Use of streptokinase for the salvage of a free flap: Case report and review of the use of thrombolytic therapy. *Microsurgery* 1987;8:117.
- (60) Rooks M.D, Rodriguez J Jr, Blechner M, Zusmanis K, Hutton W. Comparative study of intraarterial and intravenous anticoagulants in microvascular anastomoses. *Microsurgery* 1994;15:123.
- (61) Salemark L, Wieslander J.B, Dougan P, Arnljots B. Studies of the antithrombotic effects of dextran 40 following microarterial trauma. *Br J Plast Surg* 1991;44:15.
- (62) Zhang B.M, Wieslander J.B. Dextran's antithrombotic properties in small arteries are not altered by low-molecular weight heparin or the fibrinolytic inhibitor tranexamic acid: An experimental study. *Microsurgery* 1993;14:289.

- (63) Disa JJ, Polvora VP, Pusic AL, Singh B, Cordeiro PG. Dextran-related complications in head and neck microsurgery: do the benefits outweigh the risk? A prospective randomized analysis. *Plast Reconstr Surg* 2003;112:1534-1539.
- (64) Kwon I.K, Jeong S.H, Kang E, Park K. Nanoparticulate drug delivery systems for cancer therapy. *Cancer Nanotechnol* 2007;19:333-344.
- (65) Cheng H, Fraidakis M, Blomback B. Characterization of a fibrin glue-GDNF slow-release preparation. *Cell Transplant* 1998;7:53-61.
- (66) Osada T, Yamamura K, Yano K. Distribution and serum concentration of sisomicin released from fibrin glue-sealed Dacron graft in the rat and human. *J Biomed Mater Res* 2000;52:53-57.
- (67) Gürhan Ulusoy M, Uysal A, Koçer U. Improved Flap Viability With Site-Specific Delivery of Sildenafil Citrate Using Fibrin Glue. *Ann Plast Surg* 2005;55:292-296.
- (68) Lai C.Y, Trewyn B.G, Jęftinija D.M, Jęftinija K, Xu S, Jęftinija S, Lin V.S.Y. A mesoporous silica nanosphere-based carrier system with chemically removable CdS nanoparticle caps for stimuli-responsive controlled release of neurotransmitters and drug molecules. *J Amer Chem Soc* 2003;125:4451-4459.
- (69) Meseguer-Olmo L, Ros-Nicolas M.J, Vicente-Ortega V. A bioactive sol-gel glass implant for in vivo gentamicin release. *J Orthop Res* 2006;24:454-460.
- (70) Korteso P, Ahola M, Karlsson S, Kangasniemi I, Yli-Urpo A, Kiesvaara J. Silica xerogel as an implantable carrier for controlled drug delivery-evaluation of drug distribution and tissue effects after implantation. *Biomater* 1999;21:193-198.
- (71) Arruebo M, Galan M, Navascues N, Tellez C, Marquina C, Ibarra M.R, Santamaria J. Development of magnetic nanostructured silica-based materials as potential vectors for drug-delivery applications. *Chem Mater* 2006;18:1911-1919.
- (72) Slowing I.I, Vivero-Escoto J.L, Wu Ch-W, Lin V.S-Y. Mesoporous silica

nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008;60:1278-1288.

(73) Butt E, Bernhardt M, Smolenski A. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2000;275:5179-5187.

(74) Lin C-S. Tissue expression, distribution, and regulation of PDE5. *International Journal of Impotence Research* 2004;16:S8-S10.

(75) Lin CS, Lau A, Tu R, Lue TF. Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:628-635.

(76) Lin CS, Lau A, Tu R, Lue TF. Identification of three alternative first exons and an intronic promoter of human PDE5A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 596–602.

(77) Konstantinos G, Petros P. Phosphodiesterase-5 Inhibitors: Future Perspectives. *Current Pharmaceutical Design* 2009;15:3540-3551.

(78) Wang WF, Wang Y, Minhas S, Ralph DJ. Can sildenafil treat primary premature ejaculation? A prospective clinical study. *Int J Urol* 2007;14:331-335.

(79) Iacono F, Prezioso D, Somma P, Chierchia S, Galasso R, Micheli P. Histopathologically proven prevention of post-prostatectomy cavernosal fibrosis with sildenafil. *Urol Int* 2008;80:249-252.

(80) Cheitlin MD, Hutter AM, Brindis RG, Ganz P, Kaul S, Russell RO Jr, Zusman RM. Use of sildenafil citrate (Viagra) in patients with cardiovascular disease: ACC/AHA expert consensus document. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:272-282.

(81) Vlachopoulos C, Hirata K, O'Rourke MF. Sildenafil reduces arterial stiffness and wave reflection in patients with coronary artery disease. *Vasc Med* 2003;8:243-248.

- (82) Tousoulis D, Papageorgiou N, Briasoulis A. Conflicting effects of nitric oxide and oxidative stress in chronic heart failure: potential therapeutic strategies. *Heart Fail Rev* 2012;17:65-79.
- (83) Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD. PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. *Circ HeartFail* 2011;4:8-17.
- (84) Kukreja RC, Salloum F, Das A. Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 2005;42:219-232.
- (85) Raja SG. Cardioprotection with sildenafil: implications for clinical practice. *Curr Med Chem* 2006;13:155-164.
- (86) Kukreja RC. Cardiovascular protection with sildenafil following chronic inhibition of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 2007;150:538-540.
- (87) Das A, Xi L, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis: essential role of NO signaling. *J Biol Chem* 2005;280:12944-12955.
- (88) Das A, Smolenski A, Lohmann SM, Kukreja RC. Cyclic GMP-dependent protein kinase Ia attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2006;281:38644-38652.
- (89) Salloum F, Takenoshita Y, Ockaili R. Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K_{ATP} channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:453-458.
- (90) Gori T, Sicuro S, Dragoni S, Donati G, Forconi S, Parker JD. Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine

triphosphate-sensitive potassium channels: a human in vivo study. *Circulation* 2005;111:721-723.

(91) Rosano GM, Aversa A, Vitale C, Fabbri A, Fini M, Spera G. Chronic treatment with tadalafil improves endothelial function in men with increased cardiovascular risk. *Eur Urol* 2005;47:214-222.

(92) Schwarz ER, Kapur V, Rodriguez J, Rastogi S, Rosiano. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. *Int J Import Res* 2007;19:139-148.

(93) Solomon H, Man JW, Anderson TJ. Erectile dysfunction and the cardiovascular patients: endothelial dysfunction is the common denominator. *Heart* 2003;89:251-253.

(94) Foresta C, Lana A, Cabrelle A, PDE-5 inhibitor vardenafil increases circulating progenitor cells in humans. *Int J Impot Res* 2005;17:377-380.

(95) Werner N, Kosiol S, Schiegl T. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.

(96) Ghofrani HA, Pepke-Zaba J, Barbera JA. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:68-72.

(97) Aizawa K, Hanaoka T, Kasai H. Long-term vardenafil therapy improves hemodynamics in patients with pulmonary hypertension. *Hypertens Res* 2006;29:123-128.

(98) Herrick A.L, van den Hoogen F, Gabrielli A. Modified-Release Sildenafil Reduces Raynaud's Phenomenon Attack Frequency in Limited Cutaneous Systemic Sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 2011;63:775-782.

(99) Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2007;9:1-8.

- (100) De LaVega AJ, Derk CT. Phosphodiesterase-5 inhibitors for the treatment of Raynaud's: a novel indication. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18:23-29.
- (101) Derici H, Kamer E, Unalp HR. Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study. *Langenbecks Arch Surg* 2010;395:713-718.
- (102) Irkorucu O, Ucan BH, Cakmak GK. Does sildenafil reverse the adverse effects of ischemia on ischemic colon anastomosis: yes, 'no'. *Int J Surg* 2009;7:39-43.
- (103) Uzun H, Konukoglu D, Nuri MK, Ersoy EY, Ozçevik S, Yavuz N. The effects of sildenafil citrate on ischemic colonic anastomotic healing in rats: its relationship between nitric oxide and oxidative stress. *World J Surg* 2008;32:2107-2113.
- (104) Ayala JE, Bracy DP, Julien BM. Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fatfed conscious mice. *Diabetes* 2007;56:1025-1033.
- (105) Mammi C, Pastore D, Lombardo MF. Sildenafil Reduces Insulin-Resistance in Human Endothelial Cells. *Plos One* 2011;6:e14542.
- (106) Rutten K, Basile JL, Prickaerts J, Blokland A, Vivian JA. Selective PDE inhibitors rolipram and sildenafil improve object retrieval performance in adult cynomolgus macaques. *Psychopharmacology* 2008;196:643-648.
- (107) Rutten K, Van Donkelaar EL, Ferrington L. Phosphodiesterase Inhibitors Enhance Object Memory Independent of Cerebral Blood Flow and Glucose Utilization in Rats. *Neuropsychopharmacology* 2009;34(8):1914-1925.
- (108) Goff DC, Cather C, Freudenreich O. A placebo-controlled study of sildenafil effects on cognition in schizophrenia. *Psychopharmacology* 2009;202:411-417.
- (109) Graça JR, Macedo GM, Palheta RC. Sildenafil delays the intestinal transit of a liquid meal in awake rats. *Braz J Med Biol Res* 2008;41:78-81.
- (110) Zhu H, Xu X, Chen JD. Inhibitory effects of sildenafil on gastric motility and

- gastric slow waves in dogs. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:218-224.
- (111) Cho SH, Park H, Kim JH, Ryu YH, Lee SI, Conklin JL. Effect of sildenafil on gastric emptying in healthy adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:222-226.
- (112) Medeiros JV, Gadelha GG, Lima SJ. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. *Br J Pharmacol* 2008;153:721-727.
- (113) Kumar S. Indian doctor in protest after using Viagra to save “blue babies”. *British Medical Journal* 2002;325:181.
- (114) Oliver J, Webb DJ, Patole S, Travadi J. Sildenafil for “blue babies”. *Sildenafil for “blue babies”*. *British Medical Journal* 2002;325:1174.
- (115) Malik M, Nagpal R. Emerging Role of Sildenafil in Neonatology. *Indian Pediatric* 2011;48:11-13.
- (116) Carroll WD, Dhillon R. Sildenafil as a treatment for pulmonary hypertension. *Arch Dis Child* 2003;88:827-828.
- (117) Dormer RL, Harris CM, Clark Z. Sildenafil (Viagra) corrects DeltaF508-CFTR location in nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2005;60:55-59.
- (118) Lubamba B, Lecourt H, Lebacq J. Preclinical evidence that sildenafil and vardenafil activate chloride transport in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:506-515.
- (119) Shi Z, Tiwari AK, Shukla S. Sildenafil Reverses ABCB1- and ABCG2-Mediated Chemotherapeutic Drug Resistance. *Cancer Res* 2011;71(8):3029-3041.
- (120) Flaherty K.T, Puzanov I, Kim K.B. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809-819.
- (121) Arozarena I, Sanchez-Laorden B, Packer L. Oncogenic BRAF induces melanoma

cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell* 2011;19:45-57.

(122) Rehse K, Scheffler H, Reitner N. Interaction of Viagra with the NO Donors Molsidomine and RE 2047 with Regard to Antithrombotic and Blood Pressure Lowering Activities. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 1999;332:182-184.

(123) Hart K, Baur D, Hodam J. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. *Laryngoscope* 2006;116:522-528.

(124) Kersh R.A, Handren J, Hergrueter C, May J.W.Jr. Microvascular surgical experimental thrombosis model: Rationale and design. *Plast Reconstr Surg* 1989;83:866.

(125) Stepnick D, Hayden R, Hogikyan N. Development of thrombosis models in the rabbit. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:997-1002.

(126) Hadlock TA, Kim J, Deschler DG. The effect of subcutaneously administered lowmolecular- weight heparin on microarterial thrombosis in the rat. *Arch Facial Plast Surg* 2003;5:36-39.

(127) Eom J.S, Koh K.S, Al-Hilal T.A, Park J.W, Jeon O.C, Moon H.T, Byun Y. Antithrombotic efficacy of an oral low molecular weight heparin conjugated with deoxycholic asset on microsurgical anastomosis in rats. *Thrombosis Research* 2010;126:220-224.

(128) Chen L.E, Seaber A.V, Urbaniak J.R. Thrombosis and thrombolysis in crushed arteries with or without anastomosis: a new microvascular thrombosis model. *J Reconstr Microsurg* 1996;12:31-38.

(129) Nasır S, Aydın M.A, Özgüner M. Thrombotic Effect of Purposeful Back-Wall Stitch for Different Suture Locations and Vessels in Rats. *Ann Plast Surg* 2005;55:508-511.

- (130) Folt J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991;83:3-14.
- (131) Topalan M, Bilgin S.S, Ip W.Y, Chow S.P. Effect of torsion on microarterial anastomosis patency. *Microsurgery* 2003;23:56-59.
- (132) Acland RD. Signs of patency in small vessel anastomosis. *Surgery* 1972;71:744.
- (133) Chiu E.S, Altman A, Allen R.J Jr, Allen R.J. Free flap monitoring using skin temperature strip indicators: Adjunct to clinical examination. *Plast Reconstr Surg* 2008;122:144-145.
- (134) Basic V, Das-Gupta R. Temperature monitoring in free flap surgery. *Br J Plast Surg* 2004;57:588.
- (135) Lindsey W.H, Franz D.A, Toung J.S. A nasal critical-size defect: an experimental model for the evaluation of facial osseous repair techniques. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;124:912-915.
- (136) Varkey P, Tan N.C, Girotto R, Tang W.R, Liu Y.T, Chen H.C. A picture speaks a thousand words: the use of digital photography and the Internet as a cost-effective tool in monitoring free flaps. *Ann Plast Surg* 2008;60:45-48.
- (137) Smit JM, Whitaker IS, Liss AG, Audolfsson T, Kildal M, Acosta R. Post operative monitoring of microvascular breast reconstructions using the implantable Cook-Swartz doppler system: A study of 145 probes and technical discussion. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62:1286-1292.
- (138) Swartz WM, Jones NF, Cherup L, Klein A. Direct monitoring of microvascular anastomoses with the 20-MHz ultrasonic Doppler probe: An experimental and clinical study. *Plast Reconstr Surg* 1988;81:149-161.
- (139) Disa JJ, Cordeiro PG, Hidalgo DA. Disa JJ, Cordeiro PG, Hidalgo DA. *Plast Reconstr Surg* 1999;104:97-101.

- (140) Jöbbsis FF. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 1977;198:1264-1267.
- (141) Irwin M.S, Thorniley M.S, Dore C.J, Green C.J. Near infrared spectroscopy: A non-invasive monitor of perfusion and oxygenation within the microcirculation of limbs and flaps. *Be J Plast Surg* 1995;48:14-22.
- (142) Repez A, Oroszy D, Arnez Z.M. Continuous postoperative monitoring of cutaneous free flaps using near infrared spectroscopy. *J Plast Reconst Aesthet Surg* 2008;61:71-77.
- (143) Acland R.D. Signs of patency in small vessel anastomosis. *Surgery* 1972;72:744.
- (144) Conrad M.H, Adams W.P. Pharmacologic Optimization of Microsurgery in the New Millennium. *Plast Reconstr Surg* 2011;108:2088.
- (145) Yasuda K, Takashima M, Sawaragi I. Influence of a cigarette smoke extract on the hormonal regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase in rats. *Biol Reprod* 1995;53:244-252.
- (146) Rickard RF, Wilson J, Hudson DA. Characterization of a rodent model for the study of arterial microanastomoses with size discrepancy (small-to-large). *Lab Anim* 2009;43:350-356.
- (147) Gimber M.L. Monitoring Partial and Full Venous Outflow Compromise in a Rabbit Skin Flap Model. *Plast Reconstr Surg* 2009;124:796.
- (148) Kulahci Y, Siemionow M. A New Composite Hemiface/Mandible/Tongue Transplantation Model in Rats. *Annals of Plastic Surgery* 2010;64:114-121.
- (149) Siemionow M, Kulahci Y, Bozkurt M. Composite tissue allotransplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(Suppl.):1S–13S.
- (150) Ulusal BG, Ulusal AE, Ozmen S, et al. A new composite facial and scalp transplantation model in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112:1302–1311.

- (151) Tai CY, France MA, Strande LF, et al. An extraperitoneal isolated vascularized bone marrow transplant model in the rat. *Transplantation*. 2003;75:1591–1593.
- (152) Girard D.S, Sutton III J.P, Williams T.H, Crumbley III A.J, Zellner J.L, Kratz J.M, Crawford F.A. Papaverine Delivery to the Internal Mammary Artery Pedicle Effectively Treats Spasm. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1295-1298.
- (153) Hausmann H, Photiadis J, Hetzer R. Blood flow in the internal mammary artery after the administration of papaverine during coronary artery bypass grafting. *Text Heart Inst J* 1996;23:279-283.
- (154) Farina J.A, Piccinato C.E, Rossi M.A, Mazzer N, Llorach-Velludo M.A. Effects of isovolemic hemodilution with 3% albumin on thrombus formation at venous microanastomosis in rats. *Microsurgery* 2002;22:152.157.
- (155) Farina J.A, Piccinato C.E, Campos A.D, Rossi M.A. Comparative Study of Isovolemic Hemodilution with 3% Albumin, Dextran-40, and Prophylactic Enoxaparin (LMWH) on Thrombus Formation at Venous Microanastomosis in Rats. *Microsurgery* 2006;26:456-464.
- (156) Mulay A.V, Dev K.K, Nair R.U. Prevention of internal thoracic artery spasm. *Ann Thorac Surg* 1997;6:564.

10. ANEXO A:

Tablas y Gráficas

Tejido	Isoforma PDE 5		
	A1	A2	A3
Cerebro	+	+	-
Pulmón	+	+	-
Corazón	+	+	+
Hígado	+	+	-
Riñón	+	+	-
Vejiga	+	+	+
Próstata	+	+	+
Uretra	+	+	+
Pene	+	+	+
Útero	+	+	+
Músculo esquelético	+	+	-

Tabla 1 Isoformas de la fosfodiesterasa 5 y su distribución en los tejidos humanos.

TROMBOSIS	Grupo I (control)	Grupo II (tissucol®)	Grupo III (papaverina)	Grupo IV (sildenafil)
SÍ	6/10	5/10	2/10	3/10
NO	4/10	5/10	8/10	7/10

n= 40 ratas

Trombosis=necrosis del colgajo inguinal a los 7 días

Tabla 2 Distribución de los colgajos necrosados según grupo de estudio.

TROMBOSIS	Grupo I (control)	Grupo II (tissucol®)	Grupo III (papaverina)	Grupo IV (sildenafil)
a las 24h	4/6	4/5	2/2	1/3
día 2-7	2/6	1/5	0/2	2/3

Tabla 3 Distribución de la necrosis del colgajo por grupos de estudio y momento de establecimiento.

Procedimiento FREQ

Frecuencia Pct col	Tabla de Trombo 7 días por Grupo					
	Trombo 7 días(Trombo 7 días)	Grupo(Grupo)				Total
		1	2	3	4	Total
0	4 40.00	5 50.00	8 80.00	7 70.00	24	
1	6 60.00	5 50.00	2 20.00	3 30.00	16	
Total	10	10	10	10	40	

Tabla 4 Valores absolutos de colgajos necrosados por grupos de estudio a los 7 días.

Estadísticos para Tabla de Trombo 7 días por Grupo

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
Chi-cuadrado	3	4.1667	0.2440
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	3	4.2924	0.2316
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	2.9250	0.0872
Coefficiente Phi		0.3227	
Coefficiente de contingencia		0.3071	
V de Cramer		0.3227	

Aviso: 50% de las celdas esperaban cuentas menores que 5. Puede que chi-cuadrado no sea un test válido.

Test exacto de Fisher	
Tabla de probabilidad (P)	0.0045
Pr <= P	0.3118

Tamaño de la muestra = 40

Tabla 5 Análisis estadístico de los colgajos trombosados de los grupos de estudio a los 7 días.

**Análisis de tabla
Resultados**

Procedimiento FREQ

Frecuencia Pct col	Tabla de Trombo 24h por Grupo				
	Trombo 24h(Trombo 24h)	Grupo(Grupo)			
		1	2	3	4
0	6	6	8	8	28
	60.00	60.00	80.00	80.00	
1	4	4	2	2	12
	40.00	40.00	20.00	20.00	
Total	10	10	10	10	40

Tabla 6 Valores absolutos de tasas de trombosis de las arterias según grupos

experimentales a las 24 horas.

Estadísticos para Tabla de Trombo 24h por Grupo

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
Chi-cuadrado	3	1.9048	0.5924
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	3	1.9326	0.5865
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	1.4857	0.2229
Coefficiente Phi		0.2182	
Coefficiente de contingencia		0.2132	
V de Cramer		0.2182	

Aviso: 50% de las celdas esperaban cuentas menores que 5. Puede que chi-cuadrado no sea un test válido.

Test exacto de Fisher	
Tabla de probabilidad (P)	0.0160
Pr <= P	0.6706

Tamaño de la muestra = 40

Tabla 7 Análisis de los grupos a las 24 horas del procedimiento, comparando las tasas de trombosis de las arterias según grupos experimentales.

Procedimiento FREQ

Frecuencia Pct col	Tabla de Trombo 7 días por Grupo2				
	Trombo 7 días(Trombo 7 días)	Grupo2			Total
		1	3	4	
0	9	8	7	24	
	45.00	80.00	70.00		
1	11	2	3	16	
	55.00	20.00	30.00		
Total	20	10	10	40	

Tabla 8 Valores absolutos de colgajos necrosados tras considerar en un solo grupo a

las ratas sin fármaco antitrombótico (grupos 1 y 2).

Estadísticos para Tabla de Trombo 7 días por Grupo2

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
Chi-cuadrado	2	3.9583	0.1382
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	2	4.0900	0.1294
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	2.9491	0.0859
Coefficiente Phi		0.3146	
Coefficiente de contingencia		0.3001	
V de Cramer		0.3146	

Aviso: 33% de las celdas esperaban cuentas menores que 5. Puede que chi-cuadrado no sea un test válido.

Test exacto de Fisher	
Tabla de probabilidad (P)	0.0144
Pr <= P	0.1731

Tamaño de la muestra = 40

Tabla 9 Análisis estadístico tras considerar en un solo grupo a las ratas sin fármaco antitrombótico (grupos 1 y 2).

Procedimiento FREQ

Frecuencia Pct col	Tabla de Trombo 24h por Grupo2				
	Trombo 24h(Trombo 24h)	Grupo2			Total
		1	3	4	
0		12 60.00	8 80.00	8 80.00	28
1		8 40.00	2 20.00	2 20.00	12
Total		20	10	10	40

Tabla 10 Valores absolutos de colgajos necrosados a las 24horas, tras considerar en

un solo grupo a las ratas sin fármaco antitrombótico (grupos 1 y 2).

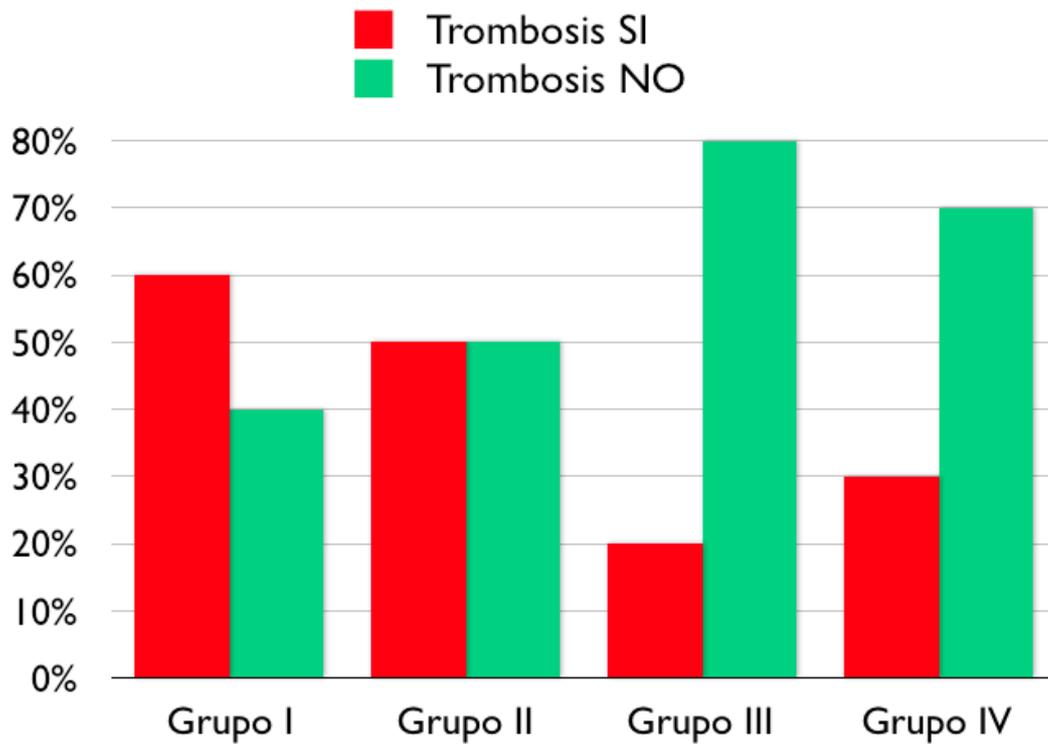
Estadísticos para Tabla de Trombo 24h por Grupo2

Estadístico	DF	Valor	Probabilidad
Chi-cuadrado	2	1.9048	0.3858
Ratio chi-cuadrado de la verosimilitud	2	1.9326	0.3805
Chi-cuadrado Mantel-Haenszel	1	1.7196	0.1897
Coeficiente Phi		0.2182	
Coeficiente de contingencia		0.2132	
V de Cramer		0.2182	
Aviso: 33% de las celdas esperaban cuentas menores que 5. Puede que chi-cuadrado no sea un test válido.			

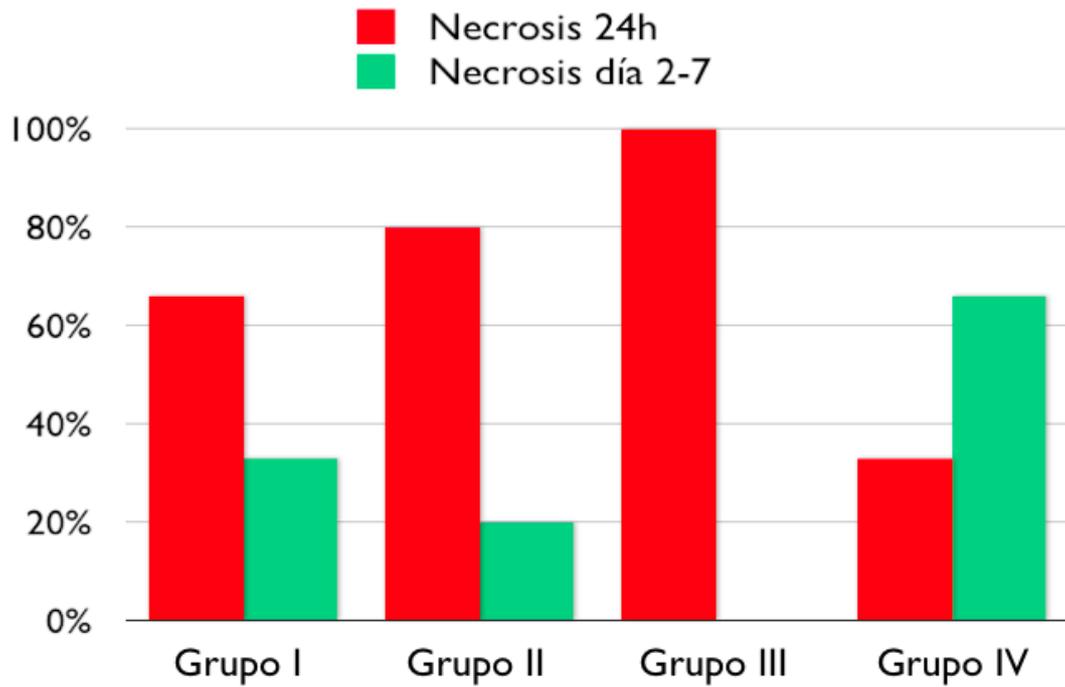
Test exacto de Fisher	
Tabla de probabilidad (P)	0.0457
Pr <= P	0.4793

Tamaño de la muestra = 40

Tabla 11 Análisis estadístico a las 24horas, tras considerar en un solo grupo a las ratas sin fármaco antitrombótico (grupos 1 y 2).



Gráfica 1 Representación en diagrama de barras de la necrosis de los colgajos por grupos de estudio.



Gráfica 2 Representación en diagrama de barras de la necrosis de los colgajos por grupos de estudio y momento de establecimiento.

11. ANEXO B:

Informe del Comité

Ético de Bienestar

Animal

Evaluación de Procedimiento de Experimentación

COMITÉ ÉTICO DE BIENESTAR ANIMAL del HULP

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN/ DOCENCIA

EFFECTO DEL SILDENAFILO EN LA PREVENCIÓN DE TROMBOSIS TRAS ANASTOMOSIS MICROQUIRÚRGICA: MODELO EXPERIMENTAL DE SUTURA TROMBOGÉNICA EN RATAS.

DATOS DEL INVESTIGADOR/A RESPONSABLE

Apellidos: PINGARRÓN MARTÍN	Nombre: LORENA F
Unidad: CIRUGÍA	
Departamento: CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL	
Categoría EA: Categoría C	
Centro: HULP	
Dirección: Castellana 261	
Código postal:28046	
Población: Madrid	
Teléfono: 696 58 04 94	
Correo:lorenapingarron@yahoo.es	

Código Solicitud: CEBA-10-2010

Fecha de solicitud: 5-04-2010

1. - OBJETIVOS DEL PROCEDIMIENTO DE EXPERIMENTACION.

Describir los principales objetivos que se pretenden alcanzar con la realización de este procedimiento de experimentación.

Establecer un modelo experimental de trombosis microvascular en la arteria femoral de la rata Sprague-Dawley.

Determinar la utilidad del láser doppler en la cuantificación del flujo alrededor de la anastomosis microvascular.

Determinar la utilidad de la fotografía estandarizada en la valoración de la supervivencia de los colgajos cutáneos en la rata.

Determinar el beneficio producido por la aplicación tópica de sildenafil en la anastomosis vascular en comparación con el método estándar de vasodilatación con papaverina tópica.

La eventual demostración de la eficacia del sildenafil para esta indicación se seguirá de un estudio clínico en pacientes. La mejora esperable en la supervivencia de los colgajos en la clínica puede suponer un impacto enormemente beneficioso en la supervivencia y la calidad de vida de estos pacientes.

2. - DISEÑO Y METODOLOGIA.

Anexo B: Informe del Comité Ético de Bienestar Animal

Indicar las diferentes metodologías que contempla el procedimiento de experimentación, detallando para cada una de las fases, la duración, el número de animales que se utilizarán y las manipulaciones a que serán sometidos.

Animales de experimentación: 40 ratas Sprague-Dawley de 250-300 g. Los animales proceden del animalario del S. Cirugía Experimental HULP. En todo momento se seguirá la normativa vigente sobre protección de los animales destinados a la investigación RD 1201/2005

Procedimiento quirúrgico: Anestesia general con ketamina 80mg/kg peso más diazepam 5mg/kg peso. Analgesia con buprenorfina 0,1m mg/Kg sc cada 12h. Elevación de colgajo inguinal de tamaño estandarizado pediculado en los vasos femorales derechos. Ligadura y sección de la arteria femoral distal a la salida de los vasos iliacos. Disección microvascular de la arteria femoral. Sección completa de la arteria. Anastomosis vascular trombogénica mediante inversión de uno de los puntos de sutura, introduciendo de ese modo la adventicia en la luz del vaso.

A partir de este punto se randomiza el animal en uno de los 4 grupos experimentales.

Grupos experimentales: 40 ratas divididas en 4 grupos de 10 ratas cada uno:

Grupo I: control.

Grupo II: adición de 0,5 ml de gel de fibrina (tissucol®) alrededor de la sutura vascular.

Grupo III: adición de 75 mg de papaverina al gel de fibrina.

Grupo IV: adición de 10 mg de citrato de sildenafil al gel de fibrina.

Durante el periodo de supervivencia del estudio (7 días) los animales serán sometidos a estudio con Láser Doppler para cuantificar el flujo alrededor de la anastomosis microvascular, así como también de un estudio macroscópico de la supervivencia de los colgajos cutáneos en la rata mediante fotografía estandarizada bajo anestesia con ketamina 40mg/kg peso más diazepam 5mg /kg peso.

VARIABLES DE ESTUDIO:

*.- ESTUDIO MACROSCOPICO MEDIANTE FOTOGRAFIAS: Seguimiento a los 7 días tras la intervención, para efectuar una fotografía estandarizada del colgajo cutáneo bajo anestesia general inhalatoria con isoflurano.

*.- ESTUDIO HISTOLÓGICO. Tras los estudios de los 7 días se efectúa una perfusión intravital de formaldehído a través de la arteria aorta, para el procesamiento histológico del segmento de anastomosis.

Para ello se anestesia al animal con isoflurano. Seguidamente se abre el torax, se introduce una cánula por el ventrículo izquierdo y se deja localizado en aorta, se corta la AD y se inicia la perfusión con bomba peristáltica.

Inmediatamente se disecciona la región de la anastomosis para el procesamiento histológico.

3. - ANALISIS PREVISTOS DE LOS RESULTADOS.

Describir las diferentes variables que está previsto controlar, así como los análisis estadísticos que se aplicarán. (Indicar si se ha consultado con alguna persona experta en estadística la idoneidad del diseño experimental, del nº de animales a utilizar y de los análisis estadísticos que se aplicarán.)

Se utilizarán 4 grupos de ratas de 10 ratas cada uno. Se realizará un análisis estadístico cualitativo de los datos fotográficos por medio de la Chi Cuadrado para comparar el porcentaje de anastomosis trombosadas de cada grupo con el resto de grupos.

4. - METODOS ALTERNATIVOS.

Por métodos alternativos se entienden aquellos que no impliquen la utilización de animales, permiten reducir el nº de animales a utilizar o comportan un menor grado de padecimiento del animal. Indicar los motivos por los que no se plantea aplicar un método alternativo al procedimiento propuesto: No existe un método alternativo al procedimiento propuesto, Existen métodos alternativos pero no están validados, Desconocemos si existen métodos alternativos, Otros motivos (especificar detalladamente).

No existe un método alternativo al procedimiento propuesto al necesitar una especie animal viva en la que aplicar la terapia antitrombótica en el colgajo vascular propuesto.

5. - IDONEIDAD DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS. REUTILIZACION DE ANIMALES.

Indicar la especie y raza (o línea?) que se propone utilizar. Indicar los motivos de esta elección. Indicar si los animales ya han estado previamente utilizados en otro procedimiento (Especificar en cual)

Ratas Sprague-Dawley de 250-300 mg peso. Los antecedentes de la literatura utilizan la rata en todos los estudios comparativos entre terapias antitrombóticas.

6. - REDUCCION DE SUFRIMIENTO INNECESARIO. ANALGESIA Y ANESTESIA.

Indicar en que fases o manipulaciones se prevé que el animal puede experimentar dolor, sufrimiento o angustia. Indicar el protocolo de supervisión que se ha previsto para detectar este posible dolor, sufrimiento o angustia, así como la persona o personas encargadas de aplicarlo. Describir las medidas correctoras que se han previsto. Describir la aplicación de analgésicos o anestésicos que se ha previsto, indicando en cada caso el producto o productos a suministrar, la vía de administración, la dosis, la frecuencia y duración del tratamiento, así como la persona o personas encargadas del tratamiento y de supervisar su eficacia. Especificar, si es el caso, que no está previsto aplicar el tratamiento porque se considera que la utilización de anestesia o analgesia es más traumática para el animal que el procedimiento en sí. Establecer en aquellos casos que sea necesario un Criterio de Punto Final.

Para la anestesia del animal se utilizará ketamina 80mg/kg peso más diazepam 5mg/kg peso. Durante los 7 días de monitorización del colgajo tras la realización del modelo anastomótico trombogénico, las ratas recibirán los 7 días analgesia con tramadol 20mg/kg

peso cada 12h. Encargado: Lorena Pingarrón Martín.

De acuerdo al anexo VII sobre la clasificación de la severidad de los procedimientos Directiva Europea 2019/63/UE, este se clasificaría como "Moderado" por ser un procedimiento quirúrgico realizado bajo anestesia general y con analgesia adecuada.

Protocolo de supervisión: se valora la movilidad del animal y el aspecto del colgajo (si está necrosado se aumentará la analgesia si el animal presenta poca movilidad o secreción purulenta del colgajo).

7. - FINALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE EXPERIMENTACION.

Al finalizar el procedimiento: Está previsto mantener a los animales con vida. Explique los motivos; Está previsto sacrificarlos. Explique los motivos; Indicar que método eutanásico se utilizaría, así como los motivos de la elección. Indicar la persona o personas encargadas de esta función.

Se mantendrán a los animales 7días con vida con el fin de monitorizar el colgajo microvascular diseñado. Al cabo de 7días se sacrificarán bajo anestesia inhalatoria con isoflurano. Encargado: Lorena F. Pingarrón Martín

8. – INVESTIGADOR RESPONSABLE DE LA DIRECCIÓN DE LOS EXPERIMENTOS CON ANIMALES.

Persona con titulación universitaria específica, encargada de la dirección y control de los procedimientos con animales vivos, así como del análisis de sus resultados (Nombre y apellidos, Titulación . Debe estar acreditado como categoría C)

Lorena F. Pingarrón Martín. Cirugía Oral y Maxilofacial. Realizado curso de Categoría C (HULP, 2007)

9. - PERSONAL EXPERIMENTADOR.

Persona o personas que participan en la realización de procedimientos en los cuales se utilizan animales de experimentación (Nombre y apellidos, Titulación, Categoría profesional en experimentación animal)

Lorena F. Pingarrón Martín, Licenciada en Medicina, Residente de Cirugía Oral y Maxilofacial Hospital Universitario La Paz. Categoría C de experimentación animal.

10. - PERSONAL PARA ATENDER A LOS ANIMALES.

Anexo B: Informe del Comité Ético de Bienestar Animal

Persona o personas encargadas de cuidar a los animales y de los aspectos prácticos de su cría y bienestar. (Nombre y apellidos, Titulación, **CATEGORÍA PROFESIONAL EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**)

Personal del Servicio de Cirugía Experimental del HULP

11. - INSTALACIONES.

Indicar el lugar donde se mantendrán los animales durante el procedimiento. Indicar el número de Registro del Centro.

Animalario del Servicio de Cirugía Experimental del HULP (Nº 280790001941)