

## Trabajo experimental

# Técnica para evaluar neovascularización o angiogénesis experimental en la extremidad isquémica de la rata

Dr. Luis Padilla\*,\*\* Dr. Juan Miguel Rodríguez-Trejo,\*\*\* Dr. Óscar O. Gasca,\*\*  
M.C. Pilar Carranza,\* Dra. Laura A. Martínez,\*\* Dra. Elizabeth Mota,\*\*  
Dra. Ximena Díaz,\*\* Dr. Takeshi Landero,\* Dr. Jaime Polaco,\*\* Dr. Paul Mondragón-Terán\*\*\*\*

### RESUMEN

**Introducción.** La evidencia de neovascularización experimental en la extremidad de las ratas se puede demostrar por medio de angiografía; sin embargo, la evaluación de densidad angiográfica es más precisa utilizando un sistema de inyección de resina roja que provee un modelo anatómico permanente.

**Material y métodos.** Utilizando 20 ratas Wistar se simuló el modelo de isquemia crónica de miembros inferiores, valorando la neovascularización a los tres, seis y 12 meses con resina epóxica intraarterial. Valoración. Se tomaron fotografías y se hizo un análisis comparativo entre la extremidad derecha (experimental) y la extremidad izquierda (control); utilizando el programa ImageJ que procesa imágenes en tres dimensiones.

**Palabras clave:** Valoración, angiogénesis, resina para evaluar neo-vascularización.

### ABSTRACT

**Introduction.** The evidence of experimental neovascularization in the limb of the rats can be shown by angiography; however thought density angiographic evaluation is more accurate using an injection system which provides us red resin permanent anatomical model.

**Material and methods.** Using 20 Wistar rats simulate the model of chronic limb ischemia, assessing neovascularization in 3, 6 and 12 months with intraarterial epoxy resin. Evaluation. Pictures are taken and a comparative analysis between the right limb (experimental) and left limb (control) blocks; using the ImageJ program that processes images in three dimensions.

**Key words:** Angiography, resin, arterialization.

### INTRODUCCIÓN

Existe suficiente evidencia científica que demuestra que el trasplante de células mononucleares derivadas de la médula ósea (CMN) (angioblastos CD34<sup>+</sup> y CD133<sup>+</sup> y células mesenquimales CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> y CD105<sup>+</sup>) inducen neovasculariza-

ción o angiogénesis en pacientes con isquemia crítica de miembros inferiores.<sup>1-4</sup>

Utilizando un modelo de isquemia muscular en ratas en dos tiempos, con ligadura inicial por vía abdominal de la arteria iliaca externa y a los ocho días practicando la extirpación total de la arteria femoral se logró estandarizar un modelo que simula

\* Servicio de Cirugía Experimental, Unidad de Microcirugía y Laboratorio de Cultivo y Trasplante Celular (ISSSTE-UNAM), Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

\*\* Departamento de Cirugía, Unidad de Microcirugía, Facultad de Medicina, UNAM.

\*\*\* Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

\*\*\*\* Unidad de Medicina Regenerativa y Terapia Celular, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

la isquemia crónica (*Figura 1*). A estos sujetos experimentales se les colocó un tubo de silastic durante quince días para lograr un túnel fibrocolágeno que sirvió como andamiaje para recibir CMN, demostrando mayor neovascularización o angiogénesis comparado con el grupo control de solución salina.<sup>1</sup>

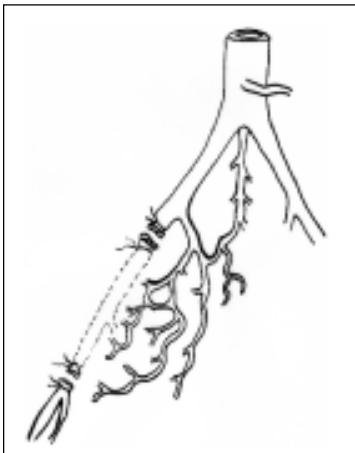
Existen diversas formas de demostrar el incremento de los vasos sanguíneos en una extremidad isquémica de una rata: angiografía convencional, angiografía por sustracción digital, angiotomografía, tomografía por emisión de positrones (PET), inmunohistoquímica, gammagrafía y microscopia de luz con tinciones histológicas a base de fosfatasa alcalina.

Para la demostración del sistema arterial se han inyectado diversas sustancias para mantener el volumen y forma de los vasos, y evidenciar su patrón de ramificación, esto generalmente en cadáver, utilizando silicón o gelatinas.<sup>5,6</sup>

En la vasculatura de médula espinal porcina Etz inyectó resina acrílica de baja viscosidad, posteriormente sumergió el espécimen en una solución de hidróxido de potasio al 10N, obteniendo un molde del sistema arterial.<sup>7</sup>

Gasca estudió la anatomía microquirúrgica del segmento extracerebral de la arteria recurrente de Heubner, al fijar el cerebro humano en formol al 10% durante un mes e inyección de polímero rojo al sistema arterial a través de las arterias carótidas internas.<sup>8</sup>

Con base en estos antecedentes y después de varios ensayos, el grupo logró establecer una técnica sencilla de inyección de resina epóxica teñida con rojo vegetal a través de la aorta de la rata obteniendo una arborización de las arterias ilíacas, femorales y sus ramas con gran detalle y precisión.



**Figura 1.** Modelo quirúrgico para crear experimentalmente isquemia subaguda en rata.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para montar la técnica de inyección de resina intraarterial y evaluar la neovascularización o angiogénesis experimental en la extremidad isquémica de la rata, se utilizaron 20 ratas Wistar macho de 300 g de peso.

### Modelo de isquemia

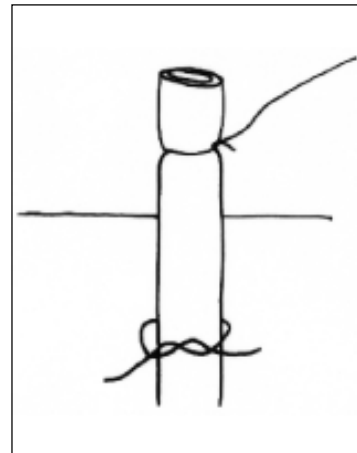
El objetivo del modelo quirúrgico es crear experimentalmente isquemia subaguda de la extremidad inferior derecha en dos tiempos operatorios, con lo que se simuló la isquemia crónica de miembros inferiores en seres humanos. En el primer tiempo, posterior a laparotomía media, se liga la arteria iliaca externa derecha con nylon 8-0, preservando la arteria iliaca interna. Siete días después se lleva a cabo el segundo tiempo, ligando la arteria femoral profunda y excisión completa de la arteria femoral superficial (*Figura 1*).

La valoración de neovascularización se llevó cabo en los tres, seis y 12 meses con resina epóxica intraarterial.

### Preparación de la resina

Video en You Tube.

- Se toma 1 mL de resina epóxica (Epoly-09) del frasco A (resina) y se coloca en un recipiente de cristal de 5 mL de capacidad.
- Se toman 1.2 mL de resina epóxica (Epoly-09) del frasco B (endurecedor), se coloca en un recipiente de 5 mL de capacidad y se mezcla con 30 mg de colorante vegetal rojo.



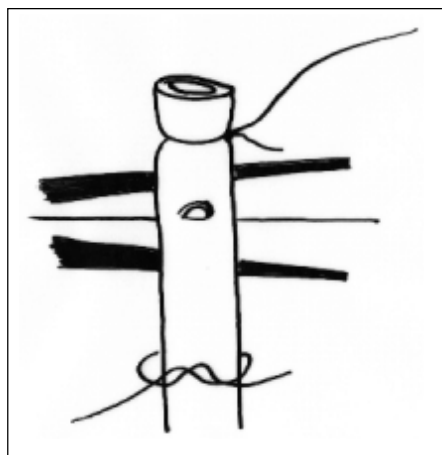
**Figura 2.** Disección de la orla y colocación de riendas.

- Mientras se aplican los últimos 20 mL de lavado de la aorta, se colocan ambos recipientes a baño María con agua a 100 °C durante aproximadamente 2 min.
- El contenido de ambos frascos se mezcla y se coloca en una jeringa de 5 cc para su aplicación.

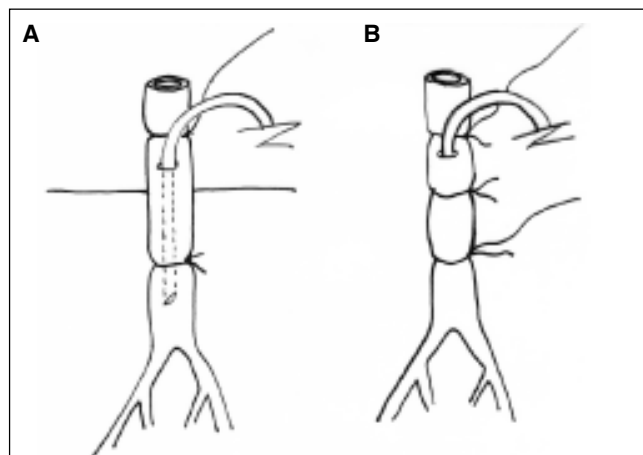
### Técnica de aplicación de la resina

Una vez terminado el estudio angiográfico, y manteniendo a la rata en plano anestésico:

- Posterior a laparotomía media se disecciona la aorta y se colocan riendas (*Figura 2*).
- Se ligan la arteria mesentérica y la sacra media.
- Se colocan pinzas de relojero bajo la aorta y se anuda la rienda superior.
- Se realiza arteriotomía (*Figura 3*) y se introduce catéter de polietileno calibre 0.060 previamente



**Figura 3.** Arteriotomía.

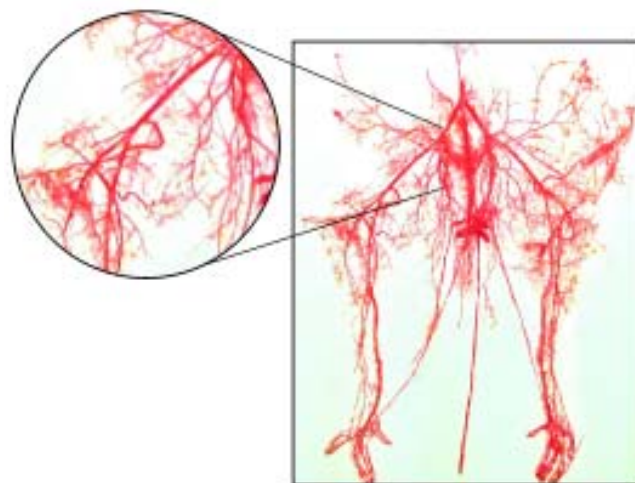


**Figura 4.** Introducción de catéter de polietileno en aorta.

- adelgazado con calor, se anuda la rienda inferior para evitar que el catéter se mueva (*Figura 4*). Asimismo, se unen las ligaduras superior e inferior.
- Por medio de una jeringa con aguja 21G y a través del catéter se lava con 20 mL de solución salina y 0.2 mL de heparina 1:100.
- Se continúa el lavado con tres jeringas más de 20 mL con solución salina.
- Durante la segunda jeringa se secciona la cava de la rata para que la sangre fugue hasta que salga sólo solución salina.
- Se inyecta intraarterialmente a través del catéter 1 mL de resina preparada a una presión constante.
- Se realiza corporectomía y se corta la cola de la rata.
- Se fija a la rata desde el abdomen hasta las patas traseras a una rejilla de metal con sutura en patas y en la piel por la cara lateral del abdomen.
- Seis horas después el biológico se coloca en recipiente de cristal y se vacía hidróxido de potasio 10N hasta cubrirla por completo.
- Cuando se degrada todo el tejido, la resina endurecida muestra la arterialización, observando el proceso de neovascularización (*Figura 5*).

### Valoración

Se toman fotografías en cuatro proyecciones y se hace un análisis comparativo entre la extremidad derecha (experimental) y la extremidad izquierda (control); se utilizó el programa ImageJ, que procesa imágenes en tres dimensiones. Con las fotografías se miden superficies blancas y rojas en un arreglo rectangular de puntos (píxeles), a cada uno se le



**Figura 5.** Circulación arterial normal de la rata con técnica de resina.

asigna un número entre 0 y 255. El valor 0 representa el rojo y el valor 255 representa el blanco. Así, las zonas oscuras de una imagen estarán representadas por píxeles con valores cercanos a 0, mientras que las zonas muy claras con píxeles cercanos a 255 forman una matriz. Cada elemento de la matriz representa un punto de la imagen y dependiendo de su intensidad se le asigna un valor. Los valores se calculan comparativamente, lo que permite tener valores cuantificables y así aplicar análisis estadístico (*Figura 5*) (circulación sin modelo de isquemia).

#### REFERENCIAS

1. Padilla SL, Kröttsch E, Schalch P, Figueroa BS, Miranda A, Rojas E, Esperantes S, et al. Administration of bone marrow cells into surgically induced fibrocollagenous tunnels induces angiogenesis in ischemic rat hindlimb model. *Microsurgery* 2003; 23: 568-74.
2. Padilla SL, Krozsch E, De La Garza A, Figueroa S, Rodríguez J, Ávila G, Schalch P, et al. Bone marrow mononuclear cells stimulate angiogenesis when transplanted into surgically induced fibrocollagenous tunnels: results from a canine ischemic hindlimb model. *Microsurgery* 2007; 27: 91-7.
3. Padilla L, Rodríguez J, Escotto I, De Diego J, Rodríguez N, Tapia J, Landero T, et al. Long-term effect of autologous progenitor cell therapy to induce neo angiogenesis in patients with critical limb ischemia transplanted via intramuscular vs combined intramuscular and distal retrograde intra venous. *Stem Cell Disc* 2012; 2: 155-62.
4. Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant* 2013; 22: 545-62.
5. Sobin SS. The vascular injection method and the functional geometry of the microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1965; 4(6): 1105-10.
6. Heymans OY, Néllissen XP, Peters S, Lemaire V, Carlier A. New approach to vascular injection in fresh cadaver dissection. *J. Reconstr Microsurg* 2004; 20(4): 311-5.
7. Etz CH, Kari FA, Mueller CS, Silovitz D, Brenner RM, Lin HM, Griep RB. The collateral network concept: A reassessment of the anatomy of spinal cord perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 141: 1020-8.
8. Gasca GO, Delgado RL, Pérez CJC. Anatomía microquirúrgica del segmento extracerebral de la arteria recurrente de Heubner en población mexicana. *Cir Cir* 2011; 79: 219-24.

#### Correspondencia:

Dr. Juan Miguel Rodríguez-Trejo  
San Lorenzo, Núm. 502  
Col. Del Valle  
C.P. 03229, México, D.F.  
Tel. 5200-3531