

45.
24



SEMBRADO ENDOTELIAL PARA MEJORAR LA PERMEABILIDAD DE LOS INJERTOS ARTERIALES DE POLITETRAFLUORETILENO EN EL PERRO.

Tesis presentada para la obtención del título de

Médico Veterinario Zootecnista

ante la División de Estudios Profesionales de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

por:

Coabtlémoc Campos García Rojas

Asesores: MC. Rafael Acuña Prats
MVZ. Laura S. de Yta Martínez
MVZ. Javier Rojero Vallejo

México, D. F. 1991



FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA.

Deseo dedicar esta tesis a quienes ofrecen todo lo que poseen en bien de la humanidad, su VIDA. A todos los animales de laboratorio, pero especialmente a los perros: Daisy, Pinto, Rastra, Basurita, Bernardo, Wanda, Pantera, Niples y Negra.

A mis padres, Cuauhtémoc y Andrea, y mis hermanos Axayacatl y Erendira.

A Perla, con amor y por su amor a todo lo vivo.

A mi querida facultad.

Sinceramente.

Cuauhtémoc Campos García Rojas.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco profundamente a mis padres Cuauhtemoc y Andrea la oportunidad que me dieron con su cariño y comprensión de lograr esta meta, también a mis hermanos Axayacatl y Erendira por su apoyo y cariño.

Respetuosamente agradezco la desinteresada ayuda de mis asesores, MC. Rafael Acuña Prats, MVZ. Laura S. de Yta Martínez y MVZ. Javier Rojero Vallejo, pues sus sabios consejos lograron llevar a cabo y con éxito esta tesis.

Agradezco a todo el personal del servicio de Cirugía Experimental del Hospital General de México S.S. sin cuya disposición no hubiera sido posible llevar a cabo el trabajo experimental de esta tesis.

CONTENIDO.

	<u>Página.</u>
RESUMEN.....	1.
INTRODUCCION.....	3.
Historia.....	4.
Definición y clasificación de los injertos vasculares.....	5.
Características del injerto vascular ideal.....	7.
Injerto vascular de politetrafluoretileno.....	8.
Injertos en el sistema vascular.....	9.
Sembrado de células endoteliales.....	10.
HIPOTESIS.....	13.
OBJETIVOS.....	14.
MATERIAL Y METODOS.....	15.
RESULTADOS.....	21.
DISCUSION.....	26.
CONCLUSIONES.....	29.
LITERATURA CITADA.....	31.
CUADROS.....	36.
FIGURAS.....	38.

RESUMEN.

CAMPOS GARCIA ROJAS CUAUHTEMOC. Sembrado endotelial para mejorar la permeabilidad de los injertos arteriales de politetrafluoretileno en el perro. (Bajo la dirección del MC. Rafael Acuña Frats, MVZ. Laura S. de Yta Martínez y MVZ. Javier Rojero Vallejo).

Con este trabajo se pretendió mejorar la permeabilidad de los injertos de teflón (politetrafluoretileno) en el sistema arterial del perro mediante el sembrado de células endoteliales obtenidas por derivación enzimática de vena yugular autóloga. Se compararon tres grupos, Grupo I: injerto de teflón sin sembrado de células endoteliales, Grupo II: injerto de teflón con sembrado de células endoteliales y Grupo III: injerto de vena yugular autóloga invertida (grupo control). Los injertos fueron colocados en todos los grupos quirúrgicamente substituyendo un segmento de la arteria iliaca externa derecha. Las variables estudiadas fueron el grado de endotelización del injerto de teflón y su permeabilidad. Para el análisis estadístico se empleó el método de Chi cuadrada (χ^2) con dos grados de libertad y $\alpha=0.05$. De los tres grupos se esperaba que el grupo II fuese superior en su permeabilidad y endotelización al grupo I, pero los resultados no indicaron ninguna diferencia estadísticamente significativa (endotelio $\chi^2=7.33$, permeabilidad $\chi^2=7.847$), rechazando la hipótesis (la creación de un endotelio en la superficie interna de todo el injerto mediante la derivación y sembrado de células

endoteliales a partir de vena autóloga mejora la permeabilidad de los injertos de teflon en el sistema arterial del perro, por lo tanto el injerto de vena yugular autóloga invertida es el de primera elección con respecto a su permeabilidad.

INTRODUCCION.

La cirugía experimental es una rama de la medicina moderna que tiene un caracter multidisciplinario, en ella intervienen profesionales de la salud, como son médicos cirujanos, enfermeras, técnicos laboratoristas y desde luego médicos veterinarios zootecnistas entre otros, todos ellos en una estrecha colaboración para mejorar la salud humana.

De entre las múltiples áreas de la cirugía experimental, se encuentra la cirugía cardiovascular, donde el papel de modelos vivos es fundamental para lograr avances significativos sin poner en riesgo la vida humana.

En el caso de las prótesis vasculares, los modelos caninos han sido de inestimable utilidad, pues gracias a ellos son los avances que hoy día experimenta la cirugía vascular en bien de la salud humana y animal (28).

Las técnicas quirúrgicas para la reparación vascular no se han empleado con mucha frecuencia en la medicina veterinaria, esto se debe probablemente al hecho de que los vasos sanguíneos del perro y el gato generalmente son demasiado pequeños para las técnicas quirúrgicas normales, y la circulación colateral es lo suficientemente grande para mantener una irrigación sanguínea adecuada en la mayoría de las regiones, sin embargo pueden presentarse lesiones en los miembros, que involucren la sección de vasos mayores que pueden ser reparados para reducir la dependencia en el desarrollo de la circulación colateral (6).

Los injertos vasculares en perros son empleados en el reemplazo de arterias cuando estas no permiten anastomosis termino-terminal, al provocar una tension inadecuada sobre la arteria o en aquellas enfermedades, como la fistula arterio-venosa, que requieren la técnica de "bypass" (5,9).

Una de las razones por las que existe un alto grado de resultados desfavorables en la cirugía vascular veterinaria es que se ha utilizado una técnica inadecuada (5,6) o no se conoce el desarrollo de métodos inovadores como las prótesis e injertos vasculares. Estas técnicas podrían ser de utilidad terapéutica quirúrgica veterinaria en enfermedades tales como los aneurismas disecantes o ruptura de la aorta causados por Spirocerca lupi, si se diagnostican a tiempo (5,35).

Con demasiada frecuencia estos animales se tratan conservadoramente debido a que el cirujano veterinario no tiene la suficiente confianza en este campo de la cirugía, por lo que la investigación en cirugía vascular experimental, además de sus aportaciones en bien de la humanidad, podría tener gran aplicación en la cirugía veterinaria (5,6).

HISTORIA.

Hallowel (1759) empleó la sutura de la arteria humeral lesionada durante una flebotomía, este fué el primer intento conocido para controlar la hemorragia arterial conservando la luz del vaso (6,30).

Carrel (1902) fué el primero en substituir segmentos arteriales mediante la interposición de injertos de vena autóloga (6,16,30), una de las principales aportaciones de Carrel es el método de triangulación de los vasos para su anastomosis (1,5,6,10,12).

DEFINICION Y CLASIFICACION DE LOS INJERTOS VASCULARES.

Los autoinjertos (arteriales o venosos) provienen del mismo sujeto, estos son de hecho los únicos injertos en el plano biológico. Los homoinjertos provienen de un sujeto de la misma especie. Son los trasplantes, así como los heteroinjertos los que provienen de un sujeto de especie diferente. Las prótesis son cuerpos extraños bien tolerados, pero que inducen en cualquiera de sus superficies, interna y externa, reacciones en el huesped (10).

Los injertos venosos autólogos son teóricamente el material ideal para la reconstrucción arterial. Clínicamente el injerto de vena autóloga ha demostrado ser el injerto preferido en puentes femoropoplíteos-tibial y coronarios-carotida-renal o reconstrucción arterial en otros lugares en humanos. El autoinjerto venoso sufre pocas modificaciones porque es un injerto en el cual la vida celular persiste (3,9,10,15,22,25).

Los injertos utilizados en la cirugía angiológica se estudian desde el punto de vista de su grosor, permeabilidad (permite el flujo sanguíneo), suturabilidad, elasticidad y tipo de reactividad celular (15).

Clasificación de los injertos:**1.- Tejidos.****A.- Autólogos frescos o vitalmente preservados.**

- a) Arteria.
- b) Vena.
- c) Fascia.
- d) Otros (peritoneo).

B.- Homólogos.

- a) Arteria.
 - Fresca o vitalmente preservada.
 - Preservados variablemente y no disponibles.

- b) Vena.

- Tratada.

- Vena umbilical preservada en glutaraldehido.

C.- Heterólogos.

- a) Arteria (carotida de bovino).
 - Tratada o preservada variablemente.
 - Conservada.

2.- Prótesis sintéticas.**A.- De pared sólida o no porosa.**

- a) Superficie no trombogénica.

- b) Intima artificial.

- c) Línea porosa.

B.- Compuesta de poros.

- a) Baja porosidad.

- b) Mediana porosidad.

- c) Alta porosidad.

3.- Sintéticas.

A.- Dacron-velour.

B.- Gorotex (politetrafluoretileno) (10,15).

CARACTERISTICAS DEL INJERTO VASCULAR IDEAL.

El injerto ideal debe llenar los siguientes requisitos:

- 1.- Ser químicamente inerte.
- 2.- No producir reacción inflamatoria.
- 3.- No ser cancerígeno.
- 4.- Tener resistencia tensional adecuada.
- 5.- Soportar la esterilización mediante el calor.
- 6.- Adaptarse fácilmente a los trayectos arteriales sin presentar angulación, no ocluirse su luz al ser doblados.
- 7.- Presentar características físicas aceptables en relación a su suturabilidad, grosor, dureza, flexibilidad y elasticidad (ser de fácil manejo durante la cirugía).
- 8.- No ser trombogénico (superficie intraluminal no trombogénica).
- 9.- Estar disponible por un costo razonable y poder ser esterilizado repetidamente sin alteración.
- 10.- Ser durable, que no experimente cambios degenerativos durante la vida del paciente.
- 11.- Resista a la infección.
- 12.- Diferentes medidas.
- 13.- Índice de permeabilidad alto y a largo plazo.
- 14.- No dañar los elementos sanguíneos (1,10,15,34).

Las prótesis o injertos artificiales presentan el inconveniente de tener un calibre uniforme, que no reproduce la reducción de calibre del vaso, lo cual origina condiciones hemodinámicas imperfectas y por último las prótesis son cuerpos extraños que no resisten la infección (10,23,34,36).

INJERTO VASCULAR DE POLITETRAFLUORETILENO.

El politetrafluoretileno (PTFE) fue introducido por vez primera en 1975. Es blanco, de superficie lisa, flexible, de paredes delgadas, puede producirse cierto grado de estiramiento si se somete a tracción sin que la prótesis se distorciona o se doble. Es inerte, mantiene su fuerza durante largos periodos de tiempo, es manejable y se sutura fácilmente, además de ser un material rígido. El tamaño de los poros es de 30 micras, su diámetro interno es de 5 mm. y su pared ultradelgada. Es expandido y reforzado (1,8,16,20).

Estas prótesis comprenden tubos que presentan características intermedias entre las prótesis micro y macroporosas. La constitución íntima del PTFE consiste en filas de nudos fijados paralelamente por bandas de plástico, resultando así una porosidad similar a las del vaso sanguíneo, dando origen al crecimiento intracelular (15).

El PTFE, resiste y previene la formación de dilataciones además de haber sido utilizado en vasos por debajo de los 6 mm. de diámetro (15).

Cuando se produce trombosis tardia en el PTFE esta suele deberse a uno de los tres siguientes factores etilógicos de importancia:

- 1.- Degeneración distal y en algunos casos proximal.
- 2.- Progresión de la hiperplasia intimal anastomótica.
- 3.- Trombosis ideopatica del injerto (15).

INJERTOS EN EL SISTEMA VASCULAR.

La organización básica de la pared de todos los vasos (arterias y venas) es parecida. La mayoría de los autores distinguen tres capas: túnica íntima (capa interna o luminal), túnica media (capa intermedia) y túnica adventicia (capa externa). En las arterias el límite entre la túnica íntima y la media está marcado por la lamina elástica interna, la túnica íntima está constituida por un tubo endotelial, cuyas células por lo general tienen su eje mayor orientado longitudinalmente. En las venas el tejido muscular y elástico no están tan bien desarrollados como en las arterias, mientras que el componente de tejido conjuntivo es mucho más preponderante (11,21).

En la túnica íntima de las venas de calibre mediano (vena yugular), las células endoteliales en vista superficial son polígonos de perfiles muy irregulares (11,21,23).

El endotelio de los vasos sanguíneos, es una capa de células que previene la coagulación intravascular y reestablecen las soluciones de continuidad (15).

La trombosis temprana y tardía es una de las complicaciones más serias en cualquier procedimiento de reconstrucción vascular (4,10,15,23,24,32).

Uno de los factores en la prevención de las trombosis es la suficiente velocidad de flujo a través del injerto para que así se disminuya la acumulación de fibrina (7,9,10,15,22,23).

Para disminuir la frecuencia de trombos en los injertos artificiales se recomienda irrigar estos con sangre del mismo paciente unos minutos antes de su implantación (5), pero esto no implica una técnica de derivación y sembrado de células endoteliales en el lumen del injerto.

La endotelización de la superficie intraluminal del injerto, disminuye la trombogenicidad del mismo (9,15,23). Existen pruebas experimentales en el modelo canino de que la siembra de células endoteliales en injertos sintéticos, acelera la endotelización completa de la superficie interna, reduciendo la trombogenicidad de la prótesis (6,24).

SEMBRADO DE CELULAS ENDOTELIALES.

El concepto de derivación de células endoteliales para su sembrado en injertos vasculares fué descrito por vez primera en 1978 por el Dr. Malcom Herring en Indianapolis. En su inicio se obtenían las células endoteliales mecánicamente por raspado del endotelio con rastrillo de acero (1).

La Dra. Graham ideó el método de derivación de células endoteliales por medios enzimáticos, utilizando tripsina y colagenasa, obteniendo así una población prácticamente pura de estas células (13,37). La principal ventaja del sembrado de células endoteliales en el injerto sintético es la creación de una superficie no trombogénica (13,18,23,26,27,29,31). En otras investigaciones se muestra un grado de endotelización de 60 y 90% (6,17,24,29).

Según las observaciones a microscopía óptica se ha determinado que un segmento de vena de 4 mm. de diámetro y de 6 a 8 cm. de longitud son suficientes para sembrar injertos de 6 mm. de diámetro y de 30 a 40 cm. de longitud (1).

La agregación plaquetaria es uno de los principales factores para la formación de trombos en la superficie interna de los injertos artificiales, por lo que el contacto de las plaquetas con la superficie intraluminal del injerto y la agregación de las mismas es un efecto irreversible (13,23,24).

En estudios experimentales la adherencia plaquetaria en la superficie intraluminal del injerto puede ser prevenida con la administración de antiagregantes plaquetarios (9,12,15). La administración de componentes tales como el ácido acetilsalicílico (Aspirina) en microdosis, tiende a mejorar la tasa de permeabilidad en las prótesis de PTFE colocadas en extremidades posteriores (4,15).

El ácido acetilsalicílico compete selectivamente con la tromboxano-sintetasa, permitiendo la dominación de la prostaglandina antiagregante de las plaquetas, mientras la prostaciclina, que se produce normalmente en la superficie luminal de las arterias, induce una hipotrombinemia después de una administración prolongada del ácido acetilsalicílico (4,12,14,33).

Existe evidencia experimental de que la prostaciclina también se produce en prótesis vasculares endotelizadas (12,14).

Se piensa que mediante algunas modificaciones en la técnica de sembrado de células endoteliales y derivación enzimática, se puede lograr un mejor sembrado de células y también mejores resultados postquirúrgicos (2,27).

La creación de un injerto híbrido (de material sintético y recubierto en la superficie luminal con sembrado de células endoteliales), ofrece una ventaja muy importante en este tipo de substitutos vasculares, porque el grado de endotelización sin esta técnica es nulo (2,27).

Con base en lo anterior, considero que esta línea de investigación está justificada, constituyendo un área importante de estudio en el desarrollo de la cirugía vascular tanto en medicina humana como veterinaria.

HIPOTESIS.

La creación de un endotelio en la superficie interna de todo el injerto mediante la derivación y sembrado de células endoteliales a partir de vena autóloga mejora la permeabilidad de los injertos de PTFE en el sistema arterial del perro.

OBJETIVOS.

1.- Mejorar la permeabilidad de los injertos de PTFE en el sistema arterial del perro mediante el sembrado de células endoteliales a partir de vena autóloga.

2.- Crear un endotelio mediante la técnica de derivación y sembrado de células endoteliales en injertos de PTFE.

MATERIAL Y METODO.

1.- Se utilizaron las instalaciones de cirugía experimental y el bioterio del Hospital General de Mexico S.S.

2.- Equipo. Instrumental de cirugía general e instrumental de cirugía vascular (pinzas de Bulldog, de Satinsky y portaagujas vascular) (fig. 1).

3.- Biologicos. Se emplearon 15 perros mestizos de talla mediana (15 a 20 Kg. de peso vivo) machos y hembras, saludables, vacunados (vacuna antirrabica, vacuna contra leptospirosis canina, hepatitis canina y distemper canino), y desparasitados externa (Coumafos "Asuntol") e internamente (Nitroscanate "Lopatol").

4.- Población y muestra. Se formaron tres grupos, con 5 perros cada uno.

Grupo I: injerto de PTFE sin sembrado de células endoteliales.

Grupo II: injerto de PTFE con sembrado de células endoteliales.

Grupo III: control, injerto de vena yugular autóloga invertida.

Substituyendo en los tres grupos la arteria iliaca externa derecha (fig. 3, 4, 11 y 12).

5.- Criterios.

a) Inclusión. Perros mestizos de talla mediana (15 a 20 Kg. de Peso vivo) machos y hembras que completaron su premedicación con ácido acetilsalicílico (375 mg. dosis única vía oral) 24 horas antes de la cirugía (1,2,4,8,15,16,17,24,27,33).

b) Eliminación. Se eliminaron los perros que murieron en el posoperatorio inmediato (3 a 24 hrs.) por choque hipovolémico, por causa intrínsecas a la cirugía, por un problema séptico o por que el injerto se encontró ocluido. También se eliminaron del estudio aquellos animales que presentaron oclusión del injerto durante las siguientes 24 horas posoperatorio, porque se considera que la causa de esta oclusión es por defectos en la técnica quirúrgica. Además se eliminaron del estudio aquellas hembras que al momento de la cirugía se detectaron gestantes. Los perros que se eliminaron fueron substituidos por otros en igual número y que reunían los requisitos de inclusión.

6.- Definición de variables.

a) Permeabilidad del injerto. Cualitativa: permeable u ocluido.

b) Grado de endotelización. Cualitativa: cortes histológicos cada 5 mm. (transversales) teñidos con hematoxilina-eosina y observados al microscopio óptico (100X).

7.- Procedimiento.

a) Grupo I: injerto de PTFE sin sembrado de células endoteliales.

- Técnica quirúrgica.

La anestesia se llevó a cabo vía endovenosa con pentobarbital sódico (Anestésal) a una dosis de 30 mg./Kg. de peso vivo, vigilando respuestas a estímulos externos hasta obtener plano anestésico.

Tiempo abdominal. Se incidió en línea media (fig. 2) para disecar por planos hasta el peritoneo, se abrió la cavidad abdominal para retraer las vísceras cranealmente y hacia la izquierda, se disecaron los vasos ilíacos incidiendo el peritoneo dorsal, se refirió la arteria ilíaca desde su origen en la arteria aorta abdominal hasta la arteria ilíaca externa a nivel del ligamento inguinal (fig. 4), se colocaron pinzas vasculares de Bulldog y de Satinsky en el extremo proximal y distal. Previamente a colocar las pinzas de Bulldog y Satinsky se heparinizó al perro con una dosis de 0.5 a 1 mg./Kg. I.V., acto seguido se seccionó la arteria retirando con ella las pinzas de Satinsky y se realizó anastomosis término-terminal entre los dos extremos de la arteria ilíaca externa y el injerto de PTFE (Gorotex) con longitud aproximada de 5 cm., haciendo sutura continua con prolene vascular calibre 6-0 empleando la técnica de triangulación del vaso (fig. 5 y 11) (1,5,6,10,12). Al finalizar las anastomosis se liberó el Bulldog proximal para permitir el llenado con sangre del injerto y de esta manera

saliera el aire por los orificios entre punto y punto de la anastomosis distal, posteriormente se libero el Bulldog distal para permitir el paso de sangre por el injerto.

El cierre de la cavidad se efectuó por planos en forma convencional con catgut crómico calibre 0 y piel con seda calibre 0 (19).

b) Grupo II: injerto de PTFE con sembrado de células endoteliales.

- Técnica de derivación y sembrado de células endoteliales.

Las células endoteliales fueron obtenidas por derivación enzimática de las venas yugulares externas conforme al protocolo de la Universidad de Michigan (8).

Dos segmentos de 10 cm. de longitud se removieron de las yugulares y fueron evertidos sobre rodillos de acero inoxidable de 5 mm. de diámetro. Estos se suspendieron y agitaron durante 3 minutos en una solución salina tipo Hanks libre de calcio y magnesio, posteriormente se incubaron por 10 minutos en solución salina tipo Hanks libre de calcio y magnesio con tripsina-EDTA a una concentración de 0.1%, pH=8 y a 37°C de temperatura. Después fueron sumergidas 10 minutos en solución tipo Hanks con calcio, magnesio y colagenasa tipo I-S a un pH=7.3 y una temperatura de 37°C. Las venas fueron agitadas 40 segundos en solución de colagenasa al 0.1% y posteriormente colocadas en 0.5 ml. de medio de cultivo 199. Las dos últimas soluciones fueron centrifugadas por 5 minutos, para obtener así un concentrado

de células endoteliales y mezclarlas con 10 ml. de sangre (10 ml./500 UI de heparina). Se irrigaron los injertos con esta solución 10 veces para hacer el sembrado de células endoteliales en el injerto de PTFE.

- Técnica quirúrgica.

Tiempo cervical. Se realizó una incisión a lo largo del trayecto de la vena yugular externa de 10 cm. de longitud (fig. 2) y se disecó por planos hasta localizar la vena yugular externa. Se ligaron sus afluentes con algodón calibre 5-0 y sus extremos con seda calibre 3-0 para retirar este segmento. Se cerró la herida por planos con catgut simple calibre 2-0 y piel con seda calibre 0, se repitió el procedimiento en la vena contralateral. Los segmentos de vena se mantuvieron en solución salina isotónica helada (4°C).

Tiempo abdominal. El procedimiento fue el mismo que con el grupo I (injerto de PTFE sin sembrado de células endoteliales) (fig. 11), pero previo a este paso se realizó la derivación y sembrado de células endoteliales según la técnica anteriormente descrita. El cierre de la cavidad se efectuó por planos en forma convencional con catgut crómico calibre 0 y piel con seda calibre 0 (19).

c) Grupo III: control, injerto de vena yugular autóloga invertida.

Se le realizó el mismo procedimiento, pero substituyendo el injerto de PTFE por injerto de vena yugular autóloga invertida (fig. 11).

d) Posoperatorio. Cada grupo de 5 perros fue observado diariamente, administrando 800'000 UI de penicilina G sodica (Pemprocilina) I.M. por 5 días y 500 mg. de acido acetilsalicilico (Aspirina) V.O. al día por todo el tiempo que duró el experimento (1,2,4,8,15,16,17,24,27,33).

Diariamente se realizó curación de las heridas quirúrgicas y se suspendió en el momento que se observó granulación de la herida (8 días aproximadamente). Se les ejercito haciéndolos caminar las primeras 48 horas posoperatorio y posteriormente haciéndolos correr diariamente.

8.- Aretriografía. Se realizó a los 3 meses posoperatorio.

9.- Se recuperaron los injertos de los tres grupos para evaluar el grado de endotelización y formación de trombos murales a los 3 meses posoperatorio mediante cortes histológicos cada 5 mm. (transversales) teñidos con hematoxilina-eosina y observados al microscopio óptico (100X).

10.- Análisis estadístico. Para evaluar y verificar diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos se realizaron:

a) Permeabilidad: Chi cuadrada (χ^2).

b) Grado de endotelización: Chi cuadrada (χ^2).

RESULTADOS.

Grupo I: injerto de PTFE sin sembrado de células endoteliales.

Para el grupo I, se obtuvo permeabilidad en cuatro de los perros a los tres meses de colocado el injerto (cuadro 1), en la extremidad injertada (miembro posterior derecho) no se presentaron signos de oclusión en ninguno de los animales (cuadro 1 y 2). El medio de contraste en la arteriografía paso a través del injerto en los perros con permeabilidad positiva (fig. 6), en el injerto que se ocluyó se aprecia circulación arterial colateral (fig. 7).

Al microscopio óptico se observo hiperplasia en la zona de anastomosis, infiltrado de fibroblastos y ausencia total de endotelio (fig. 13), excepto en uno de los perros. En la observación macroscópica no se detecto la presencia de trombos en la pared del injerto (cuadro 1).

Grupo II: injerto de PTFE con sembrado de células endoteliales.

En este grupo se presentó permeabilidad en uno de los perros a los tres meses de colocado el injerto (cuadro 1), los demás se encontraron ocluidos, la extremidad donde se colocó el injerto (miembro posterior derecho), no presentaron signos de oclusión en ninguno de los perros, como serían claudicación o hipotermia de la extremidad.

En el perro que presentó una permeabilidad positiva, se observó en la arteriografía el paso del medio de contraste a través del injerto (fig. 8), en los cuatro restantes el material de contraste no pasó a través del injerto (fig. 9), observándose así la oclusión del mismo por trombos murales (cuadro 2).

En dos de los perros de este grupo se presentó circulación arterial colateral (fig. 9).

Al recuperar los injertos a los tres meses, se observaron trombos murales en cuatro de ellos, solo uno estuvo permeable (fig. 15 y 16). La superficie intraluminal, en tres de los injertos recuperados, presentó una fina película color amarillo, además de hiperplasia en los sitios de anastomosis (cuadro 2, fig. 15).

La derivación enzimática de células endoteliales fue corroborada al microscopio óptico en cada ocasión, observándose grupos de células endoteliales en el frotis realizado al medio de cultivo 199 y solución de colagenasa centrifugada. Por razones técnicas no fue posible estimar el número de células derivadas mediante este procedimiento.

A microscopia óptica se detectó la presencia de endotelio en tres de los injertos recuperados (cuadro 2, fig. 14), hiperplasia de la íntima en los cinco, coágulos e infiltrado de fibroblastos en cuatro (cuadro 2).

Grupo III: control, injerto de vena yugular autóloga invertida.

Estos perros presentaron permeabilidad en todo el grupo (5 perros) a los tres meses de colocar el injerto (cuadro 1). En la extremidad donde se colocó el injerto (extremidad posterior derecha), no se detectaron signos de oclusión, como serian claudicación o hipotermia de la extremidad.

En la arteriografía a los tres meses se observó el paso del material de contraste a través del injerto, sin trombos murales en su interior (fig. 10). En algunos casos se observó una ligera disparidad de calibre entre la arteria iliaca externa y el injerto de vena yugular autóloga. Lo anterior confirma que la técnica quirúrgica empleada fué la correcta.

Al recuperar los injertos de vena yugular autóloga a los tres meses, no presentaron trombos murales ni hiperplasia de la intima en los sitios de anastomosis (cuadro 2, fig. 17).

Al estudio microscópico no se observaron cambios en la intima ni coágulos adheridos a las paredes (cuadro 2). Se observó infiltrado inflamatorio crónico tipo granulomatoso en los sitios de anastomosis alrededor del material de sutura.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El estudio estadístico realizado para el análisis de los resultados fue por el método Chi cuadrada (χ^2) debido a que este tipo de prueba permitió ver la diferencia entre 3 o más muestras, o para comparar 2 o más muestras con respecto a una variable de más de 2 categorías. Además permite establecer relaciones entre escalas nominales con cualquier número de categorías, estableciendo una comparación de frecuencias y no de porcentajes, se utiliza para cualquier cuadro $k \times r$.

Este método rechaza o acepta la hipótesis conocida (la creación de un endotelio en la superficie interna de todo el injerto mediante la derivación y sembrado de células endoteliales a partir de vena autóloga mejora la permeabilidad de los injertos de PTFE en el sistema arterial del perro) como hipótesis nula y es rechazada de acuerdo con el nivel de significancia.

Con base en los resultados obtenidos en los tres grupos experimentales:

- ENDOTELIO. El valor calculado de $\chi^2=7.33$ comparada con el valor de χ^2 tabulada=0.103 con dos grados de libertad y con un nivel de $\alpha=0.05$ denota que la χ^2 es significativa a la hipótesis nula.

- PERMEABILIDAD. El valor calculado de $\chi^2=7.847$ comparado con el valor de χ^2 tabulada=0.103 con dos grados de libertad y con un nivel $\alpha=0.05$ denota que la χ^2 calculada es significativa a la hipótesis nula.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación con el grupo control por lo que se rechaza la hipótesis conocida ("la creación de un endotelio en la superficie interna de todo el injerto mediante la derivación y sembrado de células endoteliales a partir de vena autóloga mejora la permeabilidad de los injertos de PIFE en el sistema arterial del perro") como hipótesis nula en ambos parámetros, permeabilidad y endotelización fué mejor en el grupo control.

DISCUSION.

La creación de un injerto híbrido, esto es, un injerto que combine materiales sintéticos y biológicos, como el injerto de PTFE con sembrado de células endoteliales es factible, pero dista mucho de ser el injerto ideal, sin embargo la técnica de derivación y sembrado de células endoteliales presenta la ventaja de crear una superficie no trombogénica, esto apoyado en investigaciones anteriores (1,2,6,9,12,14,15,17,23), pero quizá necesite mejorarse aplicando al injerto la técnica de endotelización tiempo antes de la cirugía y mantenerlo en un medio de cultivo celular, para que de este modo se recubra el injerto en su totalidad (7,8,13,14,18,23).

Trabajos realizados en el sistema venoso han reportado, que a pesar de la endotelización total del injerto, esto no evita que se ocluyan y se culpa al bajo flujo sanguíneo como el factor principal en la oclusión (1,2,27). Con respecto a la baja velocidad de flujo sanguíneo es improbable que haya sido causa de oclusión, pues los perros eran ejercitados diariamente durante todo el tiempo que duró el experimento. Al ser un injerto en sistema arterial no presentaba la característica que reporta Acuña (1,2) en el sistema venoso, consistente en un flujo sanguíneo lento, por lo que se evita la acumulación de fibrina en la superficie intraluminal (7,9,10,15,22,23,36), tampoco se puede dudar totalmente de la efectividad de la derivación enzimática, conforme se corroboró al microscopio óptico a partir de un frotis del

medio de cultivo 199 y colagenasa, pues la longitud y diámetro de la vena yugular fueron suficientes para sembrar el injerto (1,2). Podría ser que al realizar el sembrado en el injerto de PTFE y ser colocado inmediatamente en la arteria, el mismo flujo sanguíneo arrastre consigo parte de las células endoteliales previamente derivadas y sembradas en la superficie intraluminal.

La trombosis en los injertos de PTFE, por lo tanto su oclusión no tuvo diferencia entre el grupo que se sembró con células endoteliales y el que no, seguramente causada por la progresión hiperplásica intimal de la anastomosis pues se detectó tardía su oclusión (más de 24 hrs. posoperatorio), lo que indica una técnica quirúrgica adecuada (15).

Probablemente durante el desarrollo de este trabajo existió una variable fuera de control y aún no determinada. El que no estuviera recubierto en su totalidad el injerto pudo deberse a una infección subclínica, a las condiciones hemodinámicas imperfectas de toda prótesis, a factores ideopáticos, o a un defecto de los reactivos utilizados en el procedimiento de derivación (1,2,10,15,23,34,36), sin embargo uno de los objetivos, de crear endotelio en la superficie intraluminal del injerto, pudo llevarse a cabo ya que a microscopía óptica se observa la presencia de células endoteliales en tres de los injertos sembrados con células endoteliales (fig. 14).

El éxito de la técnica quirúrgica indica que autores como Borjab (6), tienen razón al señalar como una de las

causas más frecuentes en el fracaso de la reconstrucción vascular veterinaria es el no utilizar una técnica adecuada, además de que ciertamente la circulación colateral tiene un papel muy importante en la irrigación del miembro afectado, quizá esto sea la causa en la diversidad de los resultados obtenidos (1,2).

CONCLUSIONES.

1.- Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) con respecto a la hipótesis nula de permeabilidad del injerto, en relación a si tiene sembrado o no de células endoteliales, lo que significa el rechazo a la hipótesis de que la creación de un endotelio en la superficie intraluminal del injerto mediante la derivación y sembrado de células endoteliales a partir de vena autóloga mejora la permeabilidad en los injertos de PTFE en el sistema arterial del perro.

2.- Es posible, con esta técnica, la creación de un endotelio a partir de la derivación enzimática de células endoteliales provenientes de vena yugular autóloga, sin embargo este endotelio no alcanza a recubrir la totalidad de la superficie interna del injerto de PTFE y por esto no se mejora la permeabilidad del mismo.

3.- Es necesario mejorar la técnica de sembrado de células endoteliales en el injerto de PTFE para mejorar la formación del endotelio y su permeabilidad.

4.- El injerto de primera elección con respecto a su permeabilidad es el de vena yugular autóloga invertida.

5.- Se presenta circulación arterial colateral, lo que permite la irrigación del miembro ipsilateral en donde el injerto se encuentra ocluido.

6.- Es factible emplear la técnica quirúrgica de injertos arteriales artificiales y de vena autóloga para la reparación vascular en el perro.

LITERATURA CITADA.

1) Acuña Prats R.: Sembrado de células endoteliales en injerto de politetrafluoretileno como sustituto vascular en el sistema venoso de perro. Tesis de Cirujano General. Hospital General de México. Secretaria de Salud. México D.F., 1989.

2) Acuña Prats R.: Sembrado de células endoteliales en injerto de PTFE como sustituto vascular en el sistema venoso, modelo canino. Cir. Gen. 12: 47-51 (1990).

3) Aguirre Koux L.: Disección aguda de la aorta. Cardi. 5: 72-76 (1987).

4) Ala-Kulju K., Ketonen P.: Effect of antiplatelet and anticoagulant therapy on patency of femorotibial bypass grafts. J. Cardiovasc. Surg. 31: 651-655 (1990).

5) Archibald J.: Canine Surgery. American Veterinary Publications Inc. Santa Barbara Ca., 1974.

6) Borjab M. J.: Medicina y Cirugía en Especies Pequeñas. CECSA. México, 1986.

7) Calligaro Keith D., Ascer E.: The effect of adjunctive arteriovenous fistula on prosthetic graft patency: a controlled study in canine model. J. Cardiovasc. Surg. 32: 646-650 (1990).

8) Campbell C. D.: A small arterial substitute expanded microphorus polytetrafluorethylene: patency versus porosity. Ann. Surg. 188: 139 (1975).

9) Chisato Nojiri, Yasuharu: Aorta-coronary bypass grafting with heparinized vascular grafts in dogs (a preliminary study). J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 93: 867-877 (1987).

10) Cormier J. M., Frielux C. L., Sautot: Tratado de Técnica Quirúrgica, tomo V. Toraq-Masson. Barcelona 1973.

11) Fawcett D. W.: Tratado de Histología, 11a ed. Editorial Interamericana-Mc. Graw Hill. Mexico, 1989.

12) Gourley Ira M., Vasseur P.: General Small Animal Surgery. J. B. Lippicott Company. Philadelphia Pen., 1985.

13) Graham L. M.: Immediate seeding of enzymatically derived endothelium in dacron vascular grafts. Arch. Surg. 115: 1289-1294 (1990).

14) Greisler Howard F., Klosak J.: Prostacyclin production by blood-contacting surfaces of endothelialized vascular prothesis. J. Cardiovasc. Surg. 31: 640-645 (1990).

15) Guacaname Gonzalez A.: Estudio retrospectivo y prospectivo de la prótesis en cirugía vascular. Tesis de Posgrado, Especialista en Angiología y Cirugía Vascular. UNAM. México D. F., 1987.

16) Haimovici H.: An experimental and clinical evaluation of grafts in the venous sistem. Surg. Gynec. Obstet. 10: 1173-1186 (1970).

17) Hasegawa T.: Prosthetic replacement of the superior vena cava. Anti-plathelet-adesive drug influence. Arch. Surg. 106: 848-850 (1973).

18) Herring B., Malcom: Seeding arterial prothesis with vascular endothelium. Ann. Surg. 84: 727 (1985).

19) Hickman J. y Walker R.: Atlas de Cirugia Veterinaria. CECSA. Mexico, 1984.

20) Jenings R. S.: Use of microporus expanded polytetrafluorethylene grafts for aorta-pulmonary shunts in infants with complex cyanotic heart disease. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 76: 484-494 (1976).

21) Junqueira L. C. y Carneiro: Histologia Basica, 3a ed. Salvat. Mexico, 1987.

22) Killewich Lois A., Fisher C., Bartlett: Surveillance of in situ infrainguinal bypass grafts: conventional versus color flow duplex ultrasonography. J. Cardiovasc. Surg. 31: 634-639 (1990).

23) Letsou George V., Rosales O., Maitz: Stimulation of adenylate cyclase activity in cultured endothelial cells subjected to cyclic stretch. J. Cardiovasc. Surg. 31: 634-639 (1990).

24) Patrick Clagett G., Russo M., Hufangal: Platelet changes after placement of aortic prothesis in dogs. J. Lab. Clin. Med. 97: 345-359 (1981).

25) Perler Bruce A., Osterman Floyd, Mitchel S.: Ballom dilatation versus surgical revision of infra-inguinal autogenous vein graft stenoses: long-term follow-up. J. Cardiovasc. Surg. 31: 656-661 (1990).

26) Plate G.: Endotelial seeding of venus prothesis. Surgery. 49: 929-936 (1984).

27) Rojas G.: Sembrado endotelial en bioprotesis de colagenasa ovina. Rev. Mex. Angio. 15: 70-75 (1987).

28) Servelle Marceu: Collaboration du chirurgien des hommes et du chirurgien des animaux dans l' experimentation. Bull. Acad. Vet. Fran. 63: 161-165 (1990).

29) Sharefkin J. B.: Early normalization of platelet survival by endothelization seeding of dacron arterial prothesis in dogs. Surgery. 92: 385 (1982).

30) Shumaker Harris B., Muhm Y.: Arterial suture techniques and grafts: past, present and future. Surgery. 66: 419-433 (1969).

31) Sottiaray V. S.: Intimal hiperplasia and noeintimal ultraestructural analysis of trombosed grifts in humans. Surgery. 93: 809-817 (1983).

32) Stept Larry L., Flinn W.: Technical defects as a cause of early graft failure after femorodistal bypass. Arch. Surg. 122: 599-604 (1987).

33) Sumano H. y Ocampo L.: Farmacologia Veterinaria. Mac. Garw-Hill. México, 1988.

34) Tollefson David F., Bandyk B., Kaebnick: Surface biofilm distription (enahced recovery of microorganisms from vascular protheses). Arch. Surg. 22: 38-43 (1987).

35) Trigo Tavera F., de Buen de A., Candanos: Patologia Sistemica Veterinaria, vol I. UNAM, FMVZ. México, 1987.

36) Vega Gómez Maria E.: Conceptos generales de hemodinámica. Cardi. 6: 53-59 (1988).

37) Zilla P.: Endothelial cell seeding of P.T.F.E. vascular grafts in humans, a preliminary report. J. Vasc. Surg. 6: 535-541 (1987).

CUADROS.

CUADRO 1.

CONCENTRACION DE DATOS, ARTERIOGRAFIAS REALIZADAS.

GRUPO	FECHA	PERMEABILIDAD
SS	3 MESES	4
CS	3 MESES	1
VYA	3 MESES	5

SS: injerto de PTFE sin sembrado de células endoteliales.

CS: injerto de PTFE con sembrado de células endoteliales.

VYA: injerto de vena yugular autóloga.

CUADRO 2.

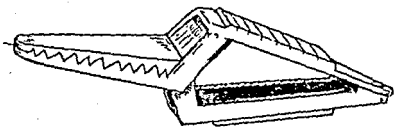
CONCENTRACION DE DATOS, ESTUDIO MICROSCOPICO.

GRUPO	ENDOTELIO	HIPERPLASIA		INFILTRADO DE	
		FIBROSA DE LA INTIMA	COAGULOS	FIBROBLASTOS	
SS	1	5	1	5	
CS	3	5	4	4	
VYA	5	0	0	0	

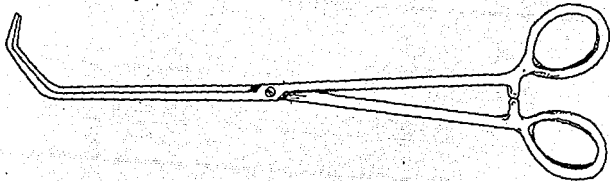
SS: injerto de PTFE sin sembrado de células endoteliales.

CS: injerto de PTFE con sembrado de células endoteliales.

VYA: injerto de vena yugular autóloga.



PINZAS DE BULLDOG



PINZAS DE SATINSKY

FIGURA 1. PINZAS DE BULLDOG Y DE SATINSKY.

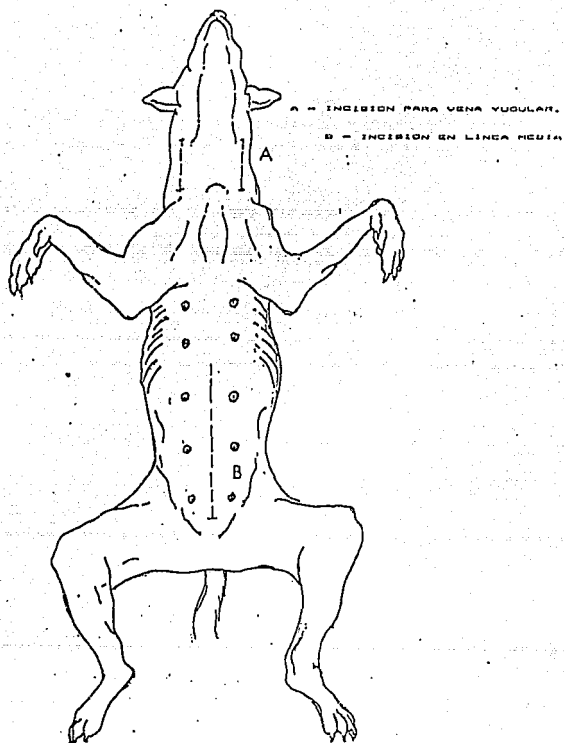


FIGURA 2. SITIOS DE INCISION (POSICION DE CUBITO DORSAL)

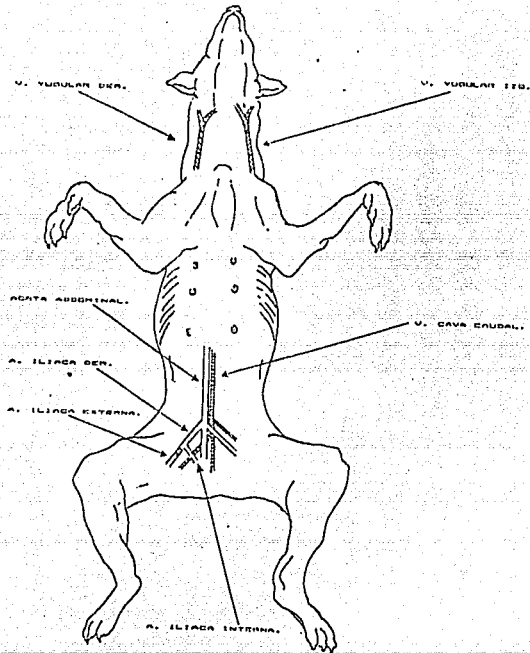


FIGURA 3. SITUACION ANATOMICA.

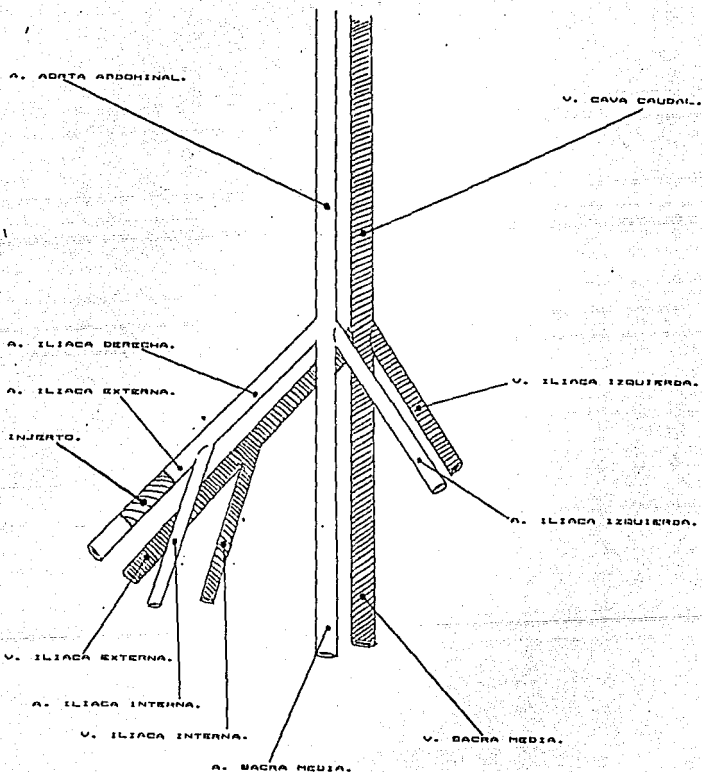


FIGURA 4. SITUACION ANATOMICA DEL INJERTO.

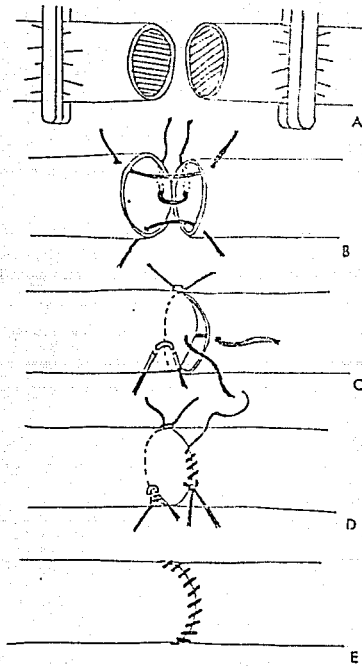


FIGURA 5. ANASTOMOSIS DE UN VASO SANGUINEO POR EL METODO DE TRIANGULACION.



FIGURA 6. ARTERIOGRAFIA. INJERTO DE PIPE SIN SEMBRADO DE CELULAS ENDOTELIALES. PERMEABLE.



FIGURA 7. ARTERIOGRAFIA. INJERTO DE PTFE SIN SEMBRADO DE CELULAS ENDOTELIALES. OCLUIDO.



FIGURA 8. ARTERIOGRAFIA. INJERTO DE PTFE CON SEMBRADO DE CELULAS ENDOTELIALES. FERMEABLE.

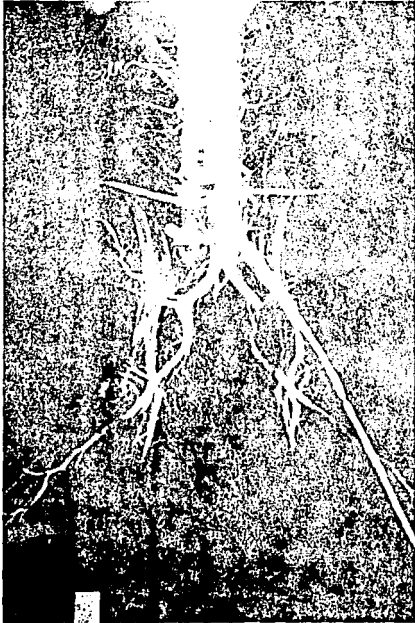


FIGURA 9. ARTERIOGRAFIA. INJERTO DE PTFE CON SEMBRADO DE
CELULAS ENDOTELIALES. OCLUIDO.



FIGURA 10. ARTERIOGRAFIA. INJERTO DE VENA YUGULAR
AUTOLOGA. PERMEABLE.

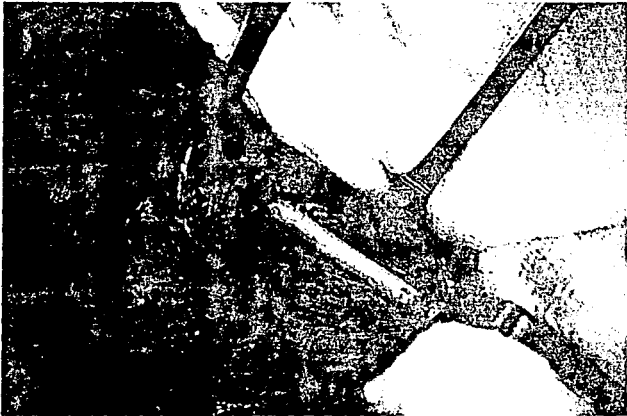


FIGURA 11. INJERTO DE PTFE COLOCADO EN SU SITIO.

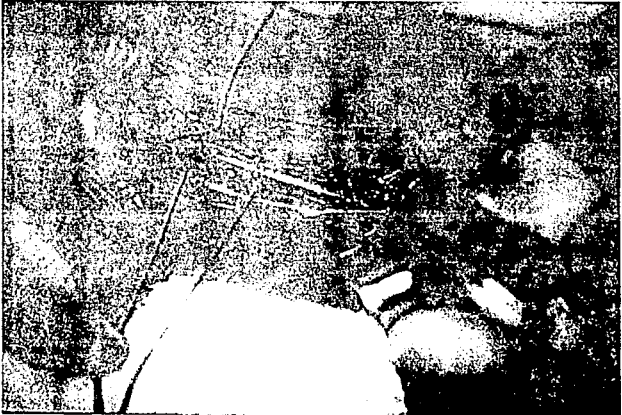


FIGURA 12. INJERTO DE VENA YUGULAR AUTOLOGA COLOCADO EN
SU SITIO.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



FIGURA 13. INJERTO DE PTFE SIN SEMBRADO DE CELULAS ENDOTELIALES. CORTE HISTOLOGICO TRANSVERSAL A LA MITAD DEL INJERTO (HEMATOXILINA-EOSINA 100X). NOTESE LA AUSENCIA DE CELULAS ENDOTELIALES. SE OBSERVA INFILTRADO DE FIBROBLASTOS EN LA PARED DEL INJERTO.



FIGURA 14. INJERTO DE PTFE CON SEMBRADO DE CELULAS ENDOTELIALES. CORTE HISTOLOGICO TRANSVERSAL A LA MITAD DEL INJERTO (HEMATOXILINA-EOSINA 100X). NOTESE LA PRESENCIA DE CELULAS ENDOTELIALES.

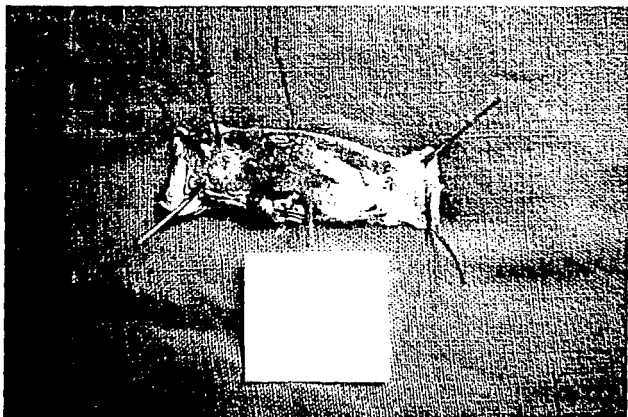


FIGURA 15. INJERTO DE PTFE CON SEMBRADO DE CELULAS ENDOTELIALES PERMEABLE. RECUPERADO A LOS TRES MESES DE SER COLOCADO EN ARTERIA ILIACA EXTERNA. NOTESE LA AUSENCIA DE TROMBOS MURALES.

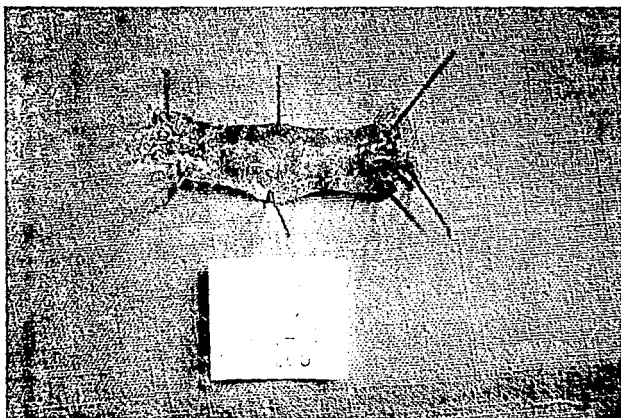


FIGURA 16. INJERTO DE PTFE CON SEMBRADO DE CELULAS
ENDOTELIALES OCLUIDO. RECUPERADO A LOS TRES MESES DE SER
COLOCADO EN ARTERIA ILIACA EXTERNA. NOTESE LA PRESENCIA DE
TROMBOS MURALES.

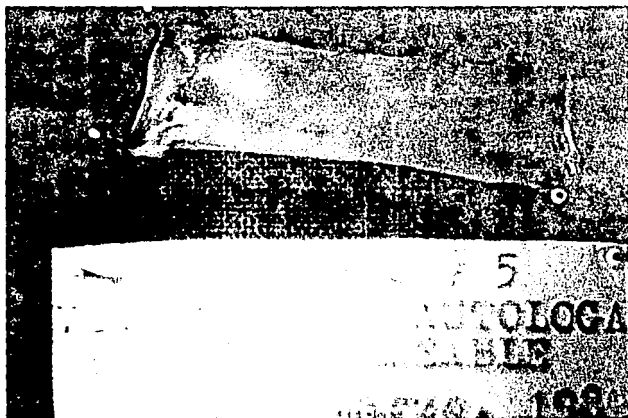


FIGURA 17. INJERTO DE VENA YUGULAR AUTOLOGA PERMEABLE.
RECUPERADO A LOS TRES MESES DE SER COLOCADO EN ARTERIA
ILIACA EXTERNA.