

Nº 149
Z.E.J.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**PRESERVACION Y EVALUACION DE LOS
CAMBIOS HISTOPATOLOGICOS DE
MIEMBROS PELVIANOS DE GATOS
SOMETIDOS A UNA PERFUSION CON
FLUJOS BAJOS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
JOSE ANGEL MACIAS VELAZQUEZ

**Asesores: MVZ. Eliseo Portilla de Buen
MVZ. I. Eugenia Candanosa Aranda MVZ. Nuria de Buen Liado**

MEXICO, D. F.

MARZO 1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	5
RESULTADOS	9
DISCUSION	11
CUADROS	14
LITERATURA CITADA	20

R E S U M E N

MACIAS VELAZQUEZ JOSE ANGEL. Preservación y evaluación de los cambios histológicos de miembros pelvianos de gatos sometidos a una perfusión con flujos bajos. (Bajo la dirección de: MVZ Eliseo Portilla de Buen, MVZ Irma Eugenia Candanosa Aranda y MVZ Nuria de Buen Llado)

Se amputaron 6 miembros pelvianos de gatos, previa medición de flujos femorales, para mantenerlos con una perfusión continua por 10 horas con un flujo del 10% del promedio obtenido, en hipotermia con una temperatura media de $8.85^{\circ} \text{C} + 0.49 \text{ D.S.}$, con el objeto de valorar el grado de edema muscular intermiofibrilar. Se formaron dos grupos: un grupo con perfusión continua hipotérmica y otro con las mismas condiciones de temperatura pero sin perfusión. Como perfusato se utilizó una solución tipo St. Thomas modificada con Dextran 40. Se tomaron muestras de ambos grupos para estudio histopatológico, los cambios a este nivel se clasificaron como: (+) ligero, (++) moderado y (+++) severo. El grupo perfundido presentó menos cambios histológicos que el grupo control. Se pesaron los segmentos justo después de la amputación, y a las 10 horas de isquemia. Los segmentos perfundidos perdieron: $\bar{x}=27.75\text{gr} \pm 5.07 \text{ D.S.}$ de su peso inicial, mientras que los segmentos control perdieron: $\bar{x}=6.16\text{gr} \pm 2.62 \text{ D.S.}$ Se considera que los cambios más importantes se observaron en los segmentos perfundidos, en los que la pérdida de peso no se esperaba. La preservación de segmentos amputados con flujos bajos (10% del basal) y en hipotermia permite una mejor reducción de temperatura y preservación del tejido, sin producir edema.

INTRODUCCION

Los avances recientes en Cirugía Reconstructiva han llegado al grado de permitir el reimplante de segmentos amputados parcial o totalmente que, de no ser por este desarrollo, habrían sido perdidos por completo. Sin embargo, aún quedan situaciones importantes por resolver. Una de ellas surge de la limitante que presentan los tiempos de isquemia prolongada del segmento. La duración prolongada de la isquemia produce daños irreversibles en el tejido muscular de extremidades amputadas (8)

Muchos factores contribuyen a prolongar los períodos isquémicos, tales como la lejanía de los centros especializados en reimplantes, la disponibilidad del grupo quirúrgico en el momento y la necesidad primaria de tratar el estado general del paciente entre otros.

Se sabe que el tejido más lábil a la isquemia en un segmento amputado es el músculo esquelético. Este hecho explica por qué se han reimplantado con éxito dígitos después de hasta 39 horas de isquemia, mientras que en el caso de otros segmentos con contenido de tejido muscular esto no ha sido posible (6, 7)

Otro tejido sumamente lábil a la isquemia es el endotelio vascular. Algunos autores han llegado a observar alteraciones irreversibles después de dos minutos y medio de isquemia, aunque Smith et al, observaron pérdida endotelial to-

tal en un dígito que se regeneró por completo a los 30 días postreimplante (9, 12).

Además se ha descrito un fenómeno de "no reflujo" después de períodos prolongados de isquemia, en los que no hay restablecimiento de la microcirculación, a pesar de una adecuada anastomosis arterial (11).

A partir de estos conceptos los intentos por aumentar los tiempos de tolerancia deben dirigirse al mantenimiento de la competencia microvascular durante la isquemia.

Se ha informado y probado diversos sistemas de preseración, desde la hipotermia simple, hasta la perfusión. Esta última tiene ventajas teóricas interesantes: acelera el grado de enfriamiento de las porciones internas del tejido, provee sustratos esenciales que se han agotado y sirve para lavar los acúmulos de eritrocitos y plaquetas presentes.

Por esta capacidad de lavado podría pensarse que ayudaría a evitar la llamada toxemia postreimplante (1,6,11).

Una limitante observa con frecuencia con el uso de perfusión es la formación de edema tisular. Esta es directamente proporcional al tiempo y a la presión de perfusión e inversamente proporcional a la osmolaridad del perfusato (1, 8).

La osmolaridad elevada puede aumentar la permeabilidad microvascular en el músculo esquelético, cuando ésta había sido obstruida (6).

El grado de hipotermia también ha sido objeto de estudio, se ha mostrado que la temperatura ideal para preservación de músculo esqueletico es de 10°C (11).

En nuestro medio, la realización de reimplantes es una realidad. Sin embargo la disponibilidad de recursos inmediatos no existe siempre. Es necesario buscar la forma de prolongar la preservación durante los períodos isquémicos para el rescate de segmentos amputados que llegan al hospital en el momento crítico para ser reimplantados, cuando no es posible llevar a cabo la cirugía en forma rápida.

Este estudio fué realizado con el objeto de valorar la utilidad de un sistema de preservación que permita prolongar la viabilidad de los segmentos.

OBJETIVOS.

Valorar el grado de edema y las lesiones histológicas producidas por una perfusión a flujos bajos con una solución extracelular hipertónica, en miembros pelvianos de gatos.

HIPOTESIS.

La perfusión con flujos bajos, con una solución extracelular hipertónica, en un segmento amputado, produce un grado mínimo de edema.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 6 gatos adultos machos, mexicano-doméstico que fueron sometidos a anestesia con clorhidrato de Ketamina (Ketalar, Lab. Parke Davies) 30 mg/kg IM y Propiomazin (Combelen, Lab. Bayer de México) 1 mg/kg IM.

En cada gato se disecaron las arterias y venas femorales para medir los flujos correspondientes, utilizando un flujometro electromagnético (Nihon Kodhen), previa aplicación de Clorhidrato de Lidocaína (Lidocaína 2%, Lab. Astia Chemicals) al 2% en forma local. Se tomaron 3 lecturas en cada vaso para ambos miembros en forma intermitente para obtener flujos arteriales y venosos promedio.

Después se aplicó Heparina (Heparina 1000 Lab. Abbott) 500 U/kg IV, y se procedió a la amputación de ambos miembros pélvicos, a nivel de la articulación coxofemoral.

Los animales se sacrificaron con una aplicación rápida de 20 meq de Cloruro de Potasio IV.

En uno de los miembros se colocó un cateter en la arteria femoral, fijado con seda 00 para someterlo a perfusión. El segmento contrario se utilizó como control, sin perfusión.

Se tomaron muestras de tejido muscular para estudio histopatológico de 1.5 cm por 2 cm, fijados en Formalina amortiguada al 10% para ambos miembros.

Se pesó el segmento por perfundir para obtener

una relación peso-flujo y como un control basal, este segmento fue perfundido vía arteria femoral al 10% del flujo promedio.

La composición de la solución de perfusión fue la siguiente:

Dextran 40	100g
Dextrosa	50g
NaCl	6.3g
CaCl ₂	0.13g
KCl	1.18g
NaHCO ₃	0.84g
Lidocaína	0.28g
MgSO ₄	3.9g
Cefotaxina	1g
Agua destilada	cbp 1100ml

El segmento perfundido fue colocado sobre una charola de polipropileno, dentro de un refrigerador a una temperatura cercana a los 10°C.

Para la infusión se utilizó un equipo para administración de solución Cardioplégica (Shiley mod. CSD - 104), así la longitud de esta línea fue lo suficientemente larga para permitir el enfriamiento de la solución antes de llegar a la arteria femoral (Figura 1).

En la masa muscular posterior (músculo semimembranoso y semitendinoso) se insertó una aguja conectada a un

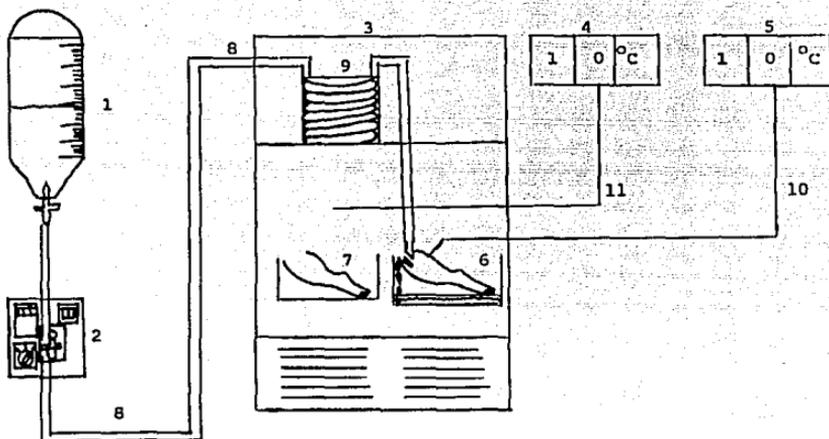
termometro (mod Shiley) para medir la temperatura en forma continua del tejido.

El tiempo total de la perfusión fue de 10 horas al termino de las cuales se pesó el segmento y se volvieron a obtener muestras para control histopatológico del tejido muscular y posteriormente se procesaron por el método de inclusión en parafina, se tñieron con Hematoxilina-Eosina, Tinción Tricrómica de Masson, en cortes transversales y longitudinales, se observaron al microscopio optico para identificar los cambios histológicos en el tejido muscular (2).

ANALISIS ESTADISTICO.

Para el análisis estadístico se utilizaron medidas paramétricas tales como: la media o promedio aritmético y desviación estandar (4).

FIGURA 1



- 1.- Solución de St. Thomas modificada con Dextran 40.
- 2.- Bomba de infusión.
- 3.- Refrigerador.
- 4.- Termómetro I.
- 5.- Termómetro II.
- 6.- Segmento perfundido.
- 7.- Segmento control.
- 8.- Línea de perfusión.
- 9.- Equipo de Cardioplegia.
- 10.- Línea de temperatura para el segmento perfundido.
- 11.- Línea de temperatura para el ambiente interno del refrigerador.

RESULTADOS

HISTOLOGIA.

Al examen microscópico se evaluaron los cambios en el tejido muscular de acuerdo con el grado de edema intermiofibrilar y se consideró la siguiente escala: (+) ligero, (++) moderado y (+++) severo; tanto para los segmentos control como lo perfundidos (pre y post isquémicos) (cuadro 1).

En el cuadro 2 se muestra los hallazgos histológicos de edema intermiofibrilar, pre y post isquémicos, con los pesos de los segmentos, en donde se observa que en 3 casos existe correlación en cuanto a la pérdida de peso con la disminución del edema (casos 1, 4 y 5), mientras que en los otros casos (casos 2, 3 y 6) sólo hay pérdida de peso sin disminución del edema.

En general, los segmentos control aumentaron la cantidad de edema en comparación con los segmentos perfundidos esto se observa en la pérdida de peso promedio de los segmentos, tanto control como perfundidos en donde los primeros perdieron un 2.622% mientras que los perfundidos un 11.942%.

FLUJOS SANGUINEOS.

En todos los segmentos perfundidos se tomó un flujo promedio medido en la arteria femoral para iniciar la perfusión, a 10% de dicho promedio. En dos casos no fué posible evaluar el flujo femoral por fallas técnicas del flujómetro (cuadro 3).

La media del flujo sanguíneo fue: $\bar{x}=3.60\text{ml/min/100gr} \pm 1.92$ D.S. con flujo máximo de 5.73ml/min/100gr , y el mínimo de 2.63ml/min/100gr .

TEMPERATURA.

En todos los segmentos perfundidos se llevó un registro permanente de la temperatura intramuscular. En este grupo la temperatura media fue: $\bar{x}=8.85^{\circ}\text{C} \pm 0.49$ D.S. con una máxima de 23.4°C y una mínima de 7°C (cuadro 4)

La temperatura máxima de los segmentos perfundidos se presentó al inicio de la isquemia, durante ésta la temperatura disminuyó gradualmente y se mantuvo cercano a los 10°C .

Los segmentos control se mantuvieron en el mismo refrigerador a una temperatura de entre 5 y 23°C (no se registró temperatura intramuscular en este grupo)

PESO DE LOS SEGMENTOS.

El peso de los segmentos perfundidos mostró una pérdida mayor, con una media de $27.75\text{gr} \pm 5.07$ D.S. teniendo una máxima de 21.2gr (cuadro 5).

En el grupo control, se tuvo una pérdida menor que el grupo perfundido y una media de $6.16\text{gr} \pm 2.62$ D.S. con una máxima de 11.5gr y una mínima de 3.7gr (cuadro 6).

DISCUSION

La perfusión continua de segmentos amputados, utilizando una solución extracelular hipertónica, produce cambios mínimos en relación al edema intermiofibrilar.

En diversos trabajos se han probado diferentes soluciones de perfusión como: Collins, Perfudex (Dextran-Dextrosa), Ringer-Lactato, Fluosol DA 20%, Salina con Heparina y otras; en donde se han visto cambios histológicos importantes como son: edema intra a intermiofibrilar, necrosis, pérdida de endotelio vascular, degeneración hialina y separación del endomisio (1, 3, 5, 14).

En el presente trabajo se evaluaron los grados de edema intermiofibrilar que se presentaron en el músculo esqueletico de gatos tras 10 horas de isquemia y con perfusión continúa a flujos bajos (10% del basal), con solución extracelular hipertónica, por lo que se mostró un edema mínimo en varios casos, esto pudo ser debido a que el uso de dicha solución tiende a retirar líquidos de los tejidos.

Hicks et al, han observado que con solución Ringer-Lactato se forma un edema más marcado en comparación con la solución de Collins y Perfudex, que tienen ligeramente mayor osmolaridad (5).

En un estudio con perfusión de dígitos, se uso Fluosol DA 20%, en donde los segmentos aumentaron en un 10% de su peso, observándose un edema gradual después de 8 horas

de perfusión (14)

Es importante tomar en cuenta que en un segmento el deterioro metabólico puede ser reducido por enfriamiento rápido, con lo cual se puede evitar la llamada "contractura muscular" observada en la industria cárnica. Además, con la hipotermia disminuye la incidencia postoperatoria de la llamada "toxemia de reimplante" (12)

El reimplante de miembros amputados sometidos a isquemia caliente ha sido exitoso hasta las 6 horas, mientras que con el uso de hipotermia se ha observado que el tiempo máximo para poder realizar un implante es de 8 horas, sin tener complicaciones aparentes. Por tal motivo se intentó prolongar este período mediante una perfusión con flujos por debajo de lo normal (10% del basal), y después de 10 horas en donde se encontraron cambios histológicos mínimos con relación al edema intermiofibrilar, en otros estudios se ha evaluado el peso de los segmentos trabajados después de la isquemia y con reperfusión en dígitos y con ratas. Con Fluosol DA 20%, el segmento aumentó de peso en un 10%, después de 8 horas de perfusión. Después de 20 horas con solución de Collins, los segmentos de ratas aumentaron de peso en 1.35gr (5.74%), y con Ringer-Lactato aumentaron 2.35gr (9.99%), aunque con Perfudex (Dextran-Dextrosa) se tuvo una pérdida de 2.35gr (9.99%) (5,14).

En este trabajo se utilizó solución de St. Thomas

modificada con Dextran 40 con la cual se observaron pérdidas de peso considerable en los segmentos perfundidos (11.92%).

Es importante hacer notar que la toma de muestras no fue la idónea, por lo que en la mayoría de los cortes se apreciaron muchos artificios que en alguna proporción fueron por problemas de aclaramiento, inclusión y fijación.

Esto hizo difícil la interpretación adecuada de los cortes. Se recomienda para trabajos posteriores utilizar la fijación de tejido adecuada (10) con el fin de poder visualizar con claridad cualquier tipo de cambio.

Se puede concluir que con el uso de perfusión a flujos bajos (10% del basal), con solución de St. Thomas modificada con Dextran 40, el edema que se produce en el músculo esquelético es mínimo o nulo, como se manifestó por la pérdida de peso e histológicamente en este trabajo.

En trabajos futuros será de utilidad la evaluación del efecto de la perfusión con flujos bajos sobre los cambios postreimplante.

CUADRO 1

Hallazgos microscópicos en musculo esqueletico de gatos.

GRUPO CONTROL

GATO	PRE-ISQUEMIA						POST-ISQUEMIA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
EDEMA	+++	++	+++	++			++	++	+++	+++	+	++

GRUPO PERFUNDIDO

GATO	PRE-ISQUEMIA						POST-ISQUEMIA					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
EDEMA	++	++	++	++	+++	+	++	++	+++	+	++	++

(+) LIGERO

(++) MODERADO

(+++) SEVERO

CUADRO 2

Correlación entre la evaluación histológica del edema intermio
fibrilar y los cambios de peso de los segmentos perfundidos.

GATO	GRADO DE EDEMA INTERMIOFIBRILAR PRE-PERFUSION	PESO gr	GRADO DE EDEMA INTERMIOFIBRILAR POST-PERFUSION	PESO gr	CORRE- LACION
1	++	235.3	+	200	si
2	++	245	++	215.3	no
3	++	274	+++	242	no
4	++	217	+	195.8	si
5	+++	321	++	298	si
6	+	226	++	201	no

(+) LIGERO

(++) MODERADO

(+++) SEVERO

CUADRO 3

Flujos femorales sanguíneos promedio en miembros
pélvicos de gatos

GATO	FLUJOS SANGUINEOS ml/min/100gr
1	5.73
2	3.38
3	2.73
4	----
5	2.80
6	----

$$\bar{x} = 3.60 \text{ ml/min/100gr}$$

$$\text{D.S.} = 1.92$$

CUADRO 4

Temperatura de los segmentos perfundidos

GATO	TEMP MAX	TEMP MIN	TEM PROM
1	23.4°C	8.2°C	9.6°C
2	22.4	6.5	9.0
3	21.2	7.1	9.3
4	18.2	7.0	8.3
5	15.5	7.1	8.6
6	14.3	7.1	8.3

$$\bar{x} = 8.85^{\circ}\text{C}$$

$$\text{D.S.} = 0.49$$

CUADRO 5

Peso de los segmentos control, sin perfusión

GATO	PESO CONTROL PRE- ISQUEMIA	PESO CONTROL POST-ISQUEMIA	PERDIDAS	PORCENTAJE DE CAMBIOS
1	238.5gr	232gr	6.5gr	2.72%
2	223.5	219	3.7	1.65
3	267	263	4.0	1.49
4	224	212.5	11.5	5.13
5	312	305.5	6.5	2.08
6	226	221	4.8	2.12

\bar{x} = 6.16 gr

D.S. 2.62

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO 6

Peso de los segmentos perfundidos

GATO	PESO PERFUNDIDO PRE-PERFUSION	PESO PERFUNDIDO POST-PERFUSION	PERDIDAS	PORCENTAJE DE CAMBIOS
1	235.3gr	200gr	35.3gr	15%
2	245	215.3	29.7	12.12
3	274.3	242	32.3	11.77
4	217	195.8	21.2	9.76
5	321	298	23	7.16
6	226	201	25	11.06

$\bar{x} = 27.75\text{gr}$

D.S. = 5.07

LITERATURA CITADA

- 1.- Alphen, W.A., Smith, A.R. and Tenkate, F.: Maximum hypotermic ischemia in replants containing muscular tissue. J. Hand Surg., 13: 415 - 422 (1988)
- 2.- Armed Forces Institute of Pathology: Manual of Histologic Staining Methods. 3rd ed. McGraw-Hill, New York, (1968).
- 3.- Bajec, J., Grossman, J., Gilbert, D., and Williams, M.: Upper extremity preservation before replantation. J. Hand Surg., 12: 321 - 322 (1987).
- 4.- Daniels, W.: Bioestadística. Bases para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa. México, (1977).
- 5.- Hicks, T., Boswick, J., Gilbert, D. and Williams, M.: The effects of perfusion on an amputated extremity. J. of Trauma., 20: 632 - 648 (1980).
- 6.- Hamilton, R., O'Brien, M., Morrison, A. and Macleod, A.: Survival factors in replantation and revascularization of the amputated thumb -10 years experience. Scand. J. Plastic Recons. Surg. 18: 163 - 173 (1984).
- 7.- May, J., Hergruter, C. and Hansen, R.: Seven digit replantation survival after 39 hours of cold ischemia. Plast Reconst Surg. 78: 522 - 525 (1986).
- 8.- Mazzoni, M., Borgstrom, P., Arfos, K. and Intagiletta, M.: Dynamic fluid redistribution in hyperosmotic resus-

- citation of hypovolemic hemorrhage. Am. J. Phys., 255:
626 - 639 (1968).
- 9.- Muramatsu, I., Takahata, N., Usmi, M. and Ishii, S.:
Metabolic and histologic changes in the ischemic muscles
of replanted dog legs. Clin. Orthp and Rel Res., 196:
292 - 299 (1985).
- 10.- Ojeda, C.A.: Evaluación Retrospectiva del método histo-
lógico de 84 casos de miopatías diagnosticada en el De-
partamento de Patología. Tesis de Licenciatura. Fac. de
Med Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México.
México, D.F., (1990).
- 11.- Razaboni, E. and Shaw, W.: Preservation of tissue for
transplantation. Clin in Plast Surg., 10: 211 - 214
(1985).
- 12.- Sapega, A., Heppenstall, B., Sokolw, D., Graham, T., Ma-
ris, J Chance, B. and Osterman, A.: The bioenergetic of
preservation of limbs before replantation. The rationa-
le for intermediate hypothermia. J. of Bone and Joint
Surg., 70: 1500 - 1513 (1988).
- 13.- Smith, A., Alphen van, B., Faithfull, N. and fennema,
M.: Limb preservation in replantation surgery. Plast and
Recons Surg., 75: 227 - 237 (1985).
- 14.- Usui, M., Sakata, H. and Ishii, S. Effect of Fluorocar-
bon perfusion upon the preservation of amputated limbs.
J of Bone and Joint Surg., 67B: 473 - 477 (1985).