

01674  
26



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y  
DE LA SALUD ANIMAL

**“PREPARACION Y COMPROBACION DE LA EFECTIVIDAD  
DEL PARCHÉ DE COLAGENA DE ORIGEN BOVINO  
LIOFILIZADO, IMPREGNADO CON GENTAMICINA  
PARA SU USO EN CIRUGIA”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
P R E S E N T A

**VICTOR PEREZ VALENCIA**

TUTOR: PATRICIO SANTILLAN DOHERTY

COMITE TUTORAL: BEATRIZ VANDA CANTON

ROGELIO JASSO VICTORIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO D.F.

2003

I

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## DEDICATORIAS.

A Dios, quien me recuerda constantemente que hay que vivir con humildad.

A mis padres y hermanos.

A Beatriz, María Eugenia, Víctor Naif, Lizbeth Leticia, Belén Beatriz, Ericka, Diana Thalia.

Al Dr. Tonatiuth Cruz Sánchez.

A mis profesores de maestría: Dr. Gustavo Adolfo García Sánchez, M en Ciencias Luis Núñez Ochoa, MCV. Beatriz Banda Cantón, M en C Nuria de Buen Argüero, Dr. Andrés Romero Rojas, Dr. Miguel Angel Carmona Medero.

A mis compañeros de generación de oftalmología: Sergio Rodriguez, Arlet Castillo, Alejandro Rivera, Héctor Aguila, fue un privilegio pertenecer a su élite intelectual, en particular a Fred Pineda por no rendirse ante la adversidad.

Al MVZ Alejandro Canales Díaz por seguir mis pasos y pisarme los talones.

A mis alumnos y exalumnos.

A mi primo Agustín García Pérez. Siempre admiré tu gusto por vivir a pesar de tus limitantes físicas, vivirás en mi mente hasta que volvamos a estar juntos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, en especial a la M en C Avelina Sotres Vega, por su asesoría y elaboración de los parches de colágena.

A la Unidad de Cirugía del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en especial al Dr. Patricio Santillán Doherty, por compartirme sus experiencias previas en relación a mi trabajo de experimentación.

A la Sección de Microbiología de la FES-Cuautitlán, en especial al Dr. Tonatiuth Cruz Sánchez, al MVZ Marco Antonio Mendoza Saavedra, a la pMVZ Maria del Consuelo Alvarez Rodríguez y MVZ Susana García Vázquez, por su asesoría y apoyo institucional para la realización de la parte microbiológica de este trabajo.

A la Sección de Ciencias Morfológicas de la FES-Cuautitlán UNAM, en particular al MVZ Germán Garriño Fariña, por la elaboración de las laminillas para el estudio histopatológico.

A la Sección de Patología y Análisis clínicos de la FES-Cuautitlán, en particular al M en C. Juan Carlos del Río García, quien realizó el estudio histopatológico.

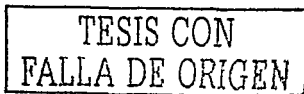
A la Unidad de Posgrado de la UNAM, muy especialmente al M en C Flores Covarrubias, por su amabilidad, profesionalismo y actitud constante de apoyo.

Al CONACYT.

Al Centro de investigación de estudios avanzados del IPN: en particular al Dr. Carlos Gerardo García Tovar y al M en C. Misael Rubén Oliver González, quienes me proporcionaron cepas de E. coli pertenecientes a dicha Institución.

Al Dr. Miguel Angel Carmona Medero por su amistad y asesoría en el estudio bioestadístico.

Al M.V.Z. Ernesto Fausto Rios quien elaboró las fotografías de mi tesis.



## RESUMEN.

Corregir defectos quirúrgicos extensos representa un reto para el cirujano. Se utilizan materiales protésicos sintéticos y materiales biológicos bien tolerados inmunológicamente. El pericardio bovino tratado con glutaraldehído es poco inmunogenico, resistente a la tensión y degradación lenta, promoviendo cicatrización eficaz, pero es irritante, para evitarlo, se lava y liofiliza. Las infecciones postquirúrgicas representan la principal complicación, añadirles gentamicina podría disminuirlas. El objetivo principal es describir metodología accesible para impregnar gentamicina al parche de pericardio bovino tratado con glutaraldehído liofilizado (PBTL+G), demostrando reducir infecciones posquirúrgicas. Se elaboraron parches sumergiéndolos en solución con gentamicina 2 mg/ml., se empaquetaron individualmente y liofilizaron. Se efectuaron pruebas in vitro contra diferentes bacterias; pruebas in vivo con lotes de ratas aplicando parches de pericardio bovino liofilizados para reparar hernias de pared abdominal: Lote1.- Parche sin gentamicina sin inóculo bacteriano. Lote2.- Parche sin gentamicina con inóculo de *Escherichia coli*. Lote3.- Parche con gentamicina sin inóculo. Lote4.- Parche con gentamicina con inóculo de *E. coli*. Ocho días después se eutanasiaron y necropsiaron, efectuando valoraciones: macroscópicas, microscópicas y microbiológicas. Los PBTL+G in vitro demostraron inhibición significativa contra: *Escherichia coli*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Klebsiella oxitoca*, *Salmonella thiphymurium* y *Bacillus spp.*, sin inhibición contra *Pseudomonas spp.* y *Streptococcus pyogenes*. In vivo: el lote1 presentó infección en 4 /10 casos, (3 *Streptococcus spp.*, 1 *Staphylococcus spp.*); lote2 :0/10; lote3; 10/10 con *E. coli* y 1/10 *Proteus spp* con 3/10 muertos; lote 4: 1/10 infecciones con *E.coli*. Hubo diferencias significativas (p 0.05%). Los PBTL+G disminuyeron los porcentajes de infección supurativa, disminuyeron el grado de miositis sin alterar tejido de granulación. No existen reportes del uso de gentamicina en parches de pericardio bovino y desafiados con bacterias. No se observaron efectos tóxicos o hipersensibilidad. Es recomendable utilizar PBTL+G para disminuir las infecciones postquirúrgicas.

Palabras clave: pericardio bovino, gentamicina, infecciones protésicas, glutaraldehído, colágena bovina.

## Abstract

To repair extensive wounds represent a courage for the surgeon. The use of synthetic protesic and biological material that are well tolerated by the immune system as. glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium which has a low immunological response, higher tension resistance, lower degradation, and promote efficient cicatrization. . It need to be washed and freeze-dried to avoid the irritant effects. In order to diminish after surgical infection, gentamicin has being used. The principal objeive of these investigation is to describe the right use of gentamicin in the freeze-dried-cross-linked bovine-pericardium (FCBP) to reduce them. The patch was dived in gentamicin solution 2mg/ml, each one, were packed and freeze-dried. There were two kinds of test maked: the in vitro one, were efected against different types of bacteria, and in vitro test were made with rats repairing abdominal wall hernias with FCBP patch. Group1: patch with gentamicin without bacteria inoculum. Group2 patch with gentamicine and *Escherichia coli* inocule. Group3 Gentamicin patch without inoculum Group4 Gentamicin patch with *E.coli* inoculum . Eight days later the rats were euthanasiated and necropsia was maked; microbiological, macroscopic, and histopathological evaluation was realized. The gentamicin patch in vitro evaluation demostrated significantive inhibition against *E.coli*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* *Staphylococcus intermedius*, *Klebsiella oxitoca*, *Salmonella thiphymurium* and *Bacillus spp.* ,without inhibition versus *Pseudomonas spp.* and *Streptococcus pyogenes*. In vivo:Group1present infection in 4/10 cases, (isolation reported 3 *Streptococcus spp.*, 1*Staphylococcus spp.*); Group2 :0/10; Group3; 10/10 with *E.coli* and 1/10 *Proteus spp* with 3/10 rats died before 8 days; Group4:1/10 infection with *E.coli* . Stadistic differences was observed. ( $p<0.05\%$ ). gentamicin patch diminish supurative infection and mioisitis, without alteration of granulation tissue

There are no reports to confirm the use of gentamicin in FCBP with *E.coli* challenge. No toxic effects or hipersensibility reaction were observed. Is recommendable to use this patch to diminish after surgery infection.

key words: bovine pericardium, gentamicin, protesic infection, glutaraldehyde, colagen patch, cross-lynked treatment.

**INDICE:**

Dedicatorias	II
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abstract	V
Introducción	1
Justificación	9
Hipótesis	10
Objetivos	11
Material y métodos	12
a. Preparación de parches de pericardio bovino	12
b. Estudio <i>in vitro</i>	13
c. Modelo de infección	15
d. Estudio <i>in vivo</i>	16
* Evaluación macroscópica	19
* Evaluación microscópica	19
* Evaluación microbiológica	20
Resultados	21
* <i>In vitro</i>	21
* <i>In vivo</i>	24
* Histopatológicos	32
Discusión	36
Conclusiones	40
Apéndice # 1	41
Apéndice # 2	43
Apéndice # 3	46
Referencias bibliográficas	49

✓

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN:

Los grandes defectos en la pared abdominal, torácica o de diafragma han existido siempre y han significado un problema para el cirujano por la dificultad que representa reparar dichos defectos. En la mayoría de los casos son problemas provocados por traumatismos, quemaduras, infecciones o procedimientos quirúrgicos radicales, pero existen también los casos hereditarios y congénitos que provocan defectos en la embriogénesis, como son hernias umbilicales y defectos en el diafragma con hernia hiatal. Existen asimismo situaciones adquiridas en que puede requerirse tejido protésico como en la atrofia del diafragma pélvico en los cánidos. (Crawford *et al.* , 1986; Olmos *et al.*, 1990; Wantz GE.,1994; Olmos *et al.*, 1997)

El método ideal para efectuar el cierre de este tipo de defectos es la aproximación de los tejidos propios del paciente. Sin embargo, existen situaciones clínicas en las que esta reconstrucción se puede ver afectada por la falta de tejido sano o por que el defecto es muy grande y los bordes quedan muy alejados. En estos casos se requieren técnicas reconstructivas complejas y en ocasiones surge la necesidad de sustituir el tejido normal por tejido protésico. (Ishihara *et al.*, 1981; Araujo *et al.*, 1987; Chvapil *et al.*, 1987; Deporter *et al.*, 1988; Olmos *et al.*,1990; Collins *et al.*, 1991; Santillán *et al.* , 1995; Doillion *et al.* , 1997; Olmos *et al.*, 1997; Pires *et al.*, 1999)

Desde hace tiempo se corrigen quirúrgicamente estos defectos con materiales protésicos, entre ellos mallas de nylon y poliéster (Mersilene), polipropileno (Marlex) y politetrafluoroetileno. (Goretex) Cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas, si bien los más recientes cuentan con mayor popularidad, ninguno ha demostrado ser superior a los otros. (Olmos *et al.*, 1996)



Se han utilizado materiales de origen biológico que sean bien tolerados inmunológicamente, con alta resistencia y de fácil manejo quirúrgico, entre estos tenemos tejidos de origen porcino y bovino. Los parches de pericardio y colágena de origen porcino son bien tolerados por el sistema inmune, pero el porcentaje de reacciones de rechazo es mayor comparado con los parches de pericardio y la colágena tipo 1 de origen bovino. ( Burke *et al* , 1985; Liao *et al*, 1992)

El pericardio bovino comenzó a utilizarse desde finales de la década de los setentas en la reconstrucción de válvulas cardiacas con muy buenos resultados y adecuada tolerancia por los pacientes. A raíz de esto, se utilizó en otro tipo de cirugías, como la corrección de defectos congénitos y más recientemente se utiliza en cirugía reconstructiva de mano, cirugía angiológica, así como en cierres pericárdicos, diafragmáticos y para corregir defectos en la duramadre. La colágena purificada de origen bovino se comercializa en forma inyectable y se ha utilizado ampliamente en cirugía cosmética para corregir defectos estéticos faciales y para el tratamiento de reflujo gástrico en lactantes, aplicándolo a nivel submucoso en el esfínter cardial. Se ha utilizado también para tratar la incontinencia urinaria. Como material guía para la cicatrización en cirugía ortopédica, odontológica, de ligamentos, tendones y endovascular. (Gallo *et al.*, 1982; Abdulali *et al.*, 1985; Crawford *et al.*, 1986; Araujo *et al.*, 1987; Deporter *et al.*, 1988; Wang *et al.* , 1994; Santillán *et al.*, 1995; Hernández *et al.* , 1996; Olmos *et al.*, 1996 ; Bortolotti *et al.*, 1998; Vrandecic *et al.*, 1998; Vrandecic *et al.*, 1998; Herrero *et al.* , 1999; Cloft *et al.* , 2000; Grimsley *et al.* , 2001; Biasi *et al.*, 2002 )

El pericardio bovino, al ser utilizado como tejido protésico, lamentablemente, en pocos días post cirugía, pierde resistencia a la tensión y se degrada relativamente rápido evitando una adecuada cicatrización al sustituirse por tejido fibroso inmaduro y poco organizado por parte del receptor.

Adicionalmente no puede almacenarse por periodos prolongados.

Para evitar dichos inconvenientes, se ha tratado el pericardio bovino con glutaraldehído, el cual se ha comprobado que actúa específicamente en los residuos de lisina e hidroxilisina modificando los epitopes responsables del rechazo inmunológico, además retarda el tiempo de reabsorción del implante, promueve mayor resistencia del material a la tensión y adicionalmente posee propiedades antimicrobianas. Todo esto favorece una mejor reparación con fibroblastos y fibras de colágena bien organizados que sustituyen paulatinamente el tejido protésico. ( Mack *et al.*, 1989; Hyder *et al.*, 1992; Liao *et al.*, 1992; Santibáñez, 1994; Olmos *et al.*, 1996; Santillan *et al.*, 1996; Olmos *et al.*, 1997; Herrero *et al.*, 1999 )

El pericardio bovino tratado con glutaraldehído presenta como principal desventaja que debe mantenerse sumergido en una solución con este compuesto y debido a que es muy irritante para los tejidos, debe lavarse profusamente con solución salina isotónica poco antes de su uso, lo cual no resulta práctico, además de suprimir las propiedades antimicrobianas del glutaraldehído. (Olmos *et al.*, 1990)

Para evitar estas desventajas, se ideó someter los pericardios a liofilización y esterilización con gas. Después de ser tratados los pericardios con glutaraldehído, se lavan profusamente para retirar el exceso y se empaquetan individualmente para posteriormente ser liofilizados y esterilizados, esto permite su conservación por periodos prolongados, listos para su uso inmediato previa rehidratación con solución salina fisiológica. Se ha demostrado que este procedimiento es exitoso y no modifica las cualidades del pericardio bovino o de la colágena de origen bovino liofilizada. ( Hyder, *et al* 1992; Olmos, *et al* 1996)

Por otro lado, aunque la incidencia de infección en este tipo de cirugías no es muy alta, representa la principal complicación y causa de problemas terapéuticos con un alto índice de mortalidad. ( Slatter, 1989 ; Hernández,1996).

Las infecciones protésicas se asocian invariablemente con hospitalización prolongada, mayores gastos y sufrimiento del paciente. Una expresión frecuente tanto en situaciones clínicas como de investigación es la de "implantación infectada"; el término no es correcto, ya que no se infecta el implante sino los tejidos circundantes; Así pues hay tres tipos de infección relacionadas con los implantes de prótesis; el primer tipo es la infección superficial inmediata debido al crecimiento de microorganismos en la piel afectada por el implante o cercana a él; ejemplo de ella, la infección de sutura y el crecimiento de microorganismos por debajo de las vendas; el segundo tipo es la infección inmediata profunda, que por lo general sigue a la operación, la bacteria responsable suele ser llevada al lugar de la implantación por microorganismos de la piel, material contaminado o del medio ambiente durante el acto quirúrgico; el tercer tipo es la infección profunda tardía que puede surgir después de años de haber sido efectuada la intervención en zonas sin antecedentes de infección. ( Slatter, 1989)

Los principales agentes relacionados con las infecciones quirúrgicas son:

<u>Género y especie</u>	<u>Fuentes primarias</u>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Piel y membranas mucosas
<i>Staphylococcus spp</i>	Piel y membranas mucosas
<i>Streptococcus spp</i>	Membranas mucosas
<i>Escherichia coli</i>	Flora intestinal
<i>Proteus spp</i>	Flora intestinal
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Suelo
<i>Clostridium perfringens</i>	Flora intestinal
<i>Bacteroides spp</i>	Membranas mucosas y

flora intestinal

*Fusobacterium spp*

Flora intestinal

(Bennett, Brachman, 1979; Burke, 1965)

Santillán (1999) efectuó un experimento previo con implantes de pericardio bovino tratados con glutaraldehído liofilizados aplicándolos para corregir hernias abdominales en ratas y desafiando con un cultivo de *E. coli* reportando 100 % de infecciones postquirúrgicas, comparado con 0% de infecciones al añadir gentamicina a los implantes.

*E. coli*, pertenece al grupo 1 *Escherichiae* de la familia *Enterobacteriaceae*, bacilos gram negativos y anaerobios facultativos. Existen cepas saprofitas que actúan como patógenos oportunistas y cepas enteropatógenas que actúan como patógenos primarios. Se han descrito tanto endotoxinas como exotoxinas de *E. coli* que interviene en su patogenia provocando enterotoxemia o toxemia.

Es una bacteria relativamente fácil de aislar, cultivar e identificar en el laboratorio y es una de las más frecuentes en infecciones quirúrgicas piógenas, peritonitis séptica, infecciones urinarias y aislada de abscesos en piel, músculo y tejido subcutáneo en diversas especies de mamíferos incluyendo a las ratas. La mayoría de sus cepas son sensibles a la gentamicina, por lo que se decidió utilizarla para desafiar los parches con y sin gentamicina de este experimento.

Las pruebas bioquímicas para identificar *E. coli* y que se utilizaron en esta investigación son: Agar hierro de Kligler ácido/ácido gas; H<sub>2</sub>S negativo; indol negativo; rojo de metilo positivo; Voges-Proskauer positivo; citrato de Simmons negativo; motilidad positivo; ureasa negativo; KCN negativo; lisina descarboxilasa variable; ornitina descarboxilasa variable; gas de glucosa

positivo; lactosa positivo; salicina variable; sorbitol positivo; rafinosa variable; ramnosa variable y licuefacción de gelatina a 22° C negativo.

En medicina humana, los porcentajes de infección en cirugías con implantes son bajos debido a los cuidados intra hospitalarios intensivos y la cooperación del paciente, sin embargo, en medicina veterinaria, el post operatorio suele ser más complicado por las condiciones de hospitalización y los hábitos de los animales, además, comúnmente las causas que determinan que utilicemos tejidos protésicos son heridas contaminadas (heridas por atropellamiento, arrastramiento, mordidas de otros animales) aumentando el riesgo de infección. Permitir el cierre de estos defectos por segunda intención prolonga mucho el tiempo de recuperación y por lo tanto eleva los costos.

Los reportes en la literatura sobre la impregnación de antibióticos en parches de pericardio bovino son muy escasos, más bien se refiere al uso sistémico de antibióticos como apoyo en estos pacientes, pero no al uso directo en los mismos. Es claro que, si se siguen los principios básicos de cirugía y en pacientes donde no hay tiempos sépticos, no debería justificarse el uso de antibióticos, sin embargo, se pueden presentar casos donde exista riesgo de contaminación de los defectos quirúrgicos o de contaminación en el postoperatorio por diferentes causas, lo cual justificaría el utilizar parches impregnados con antibióticos para tratar de evitar complicaciones, siempre y cuando bajo investigación previa, se demuestren las ventajas de su utilización y valorar los posibles efectos secundarios o indeseables de los mismos.

Añadir gentamicina a la colágena de origen bovino utilizada en cirugía ortopédica y vascular ha dado buenos resultados, al igual que en implantes ortopédicos biodegradables como el cemento de Paris y fosfato tricálcico. La gentamicina se libera lentamente del lecho en el que se encuentra y se absorbe

por difusión. Esto provoca que existan altas concentraciones del fármaco en el sitio quirúrgico hasta 500 a 1000 veces superior a la concentración sérica lo que permite que el índice de infección disminuya drásticamente. Adicionalmente es útil en pacientes con trastornos renales en quienes está contraindicado el uso de antibióticos sistémicos que produzcan nefrotoxicidad como los aminoglucósidos. (Jorgensen *et al.*, 1991; Hettfleisch, 1991; Guzmán y Soto, 1997; Ocampo y Lazcano, 2000)

En base a estos experimentos previos se eligió a la gentamicina para impregnar los parches de colágena de esta investigación, ya que tiene un amplio espectro de acción, sobre todo contra los principales gérmenes relacionados con las infecciones protésicas, baja incidencia de resistencia, estable en amplios rangos de pH (6 a 9) y baja toxicidad para el paciente.

La gentamicina es producida por *Micromonospora purpurea*. Este antibiótico aminoglucósido es producto de la mezcla de tres fracciones. La más común es el sulfato, es hidrosoluble y relativamente termoestable, resiste variaciones de pH, aunque su pH óptimo es de 8. La gentamicina es un medicamento incompatible con muchas sustancias y no se debe mezclar en una jeringa ya que puede precipitarse.

La gentamicina es útil contra una gran variedad de bacterias, entre las cuales destacan *E. coli*, especies de *Proteus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Pseudomonas spp* (en especial, junto con carbenicilina para esta última), de *Klebsiella*, y de *Pasteurella*. A pesar de su eficacia *in vitro*, no tiene acción importante *in vivo* contra especies de *Mycoplasma*. Combinada con ampicilina o amoxicilina es de especial utilidad contra *Haemophilus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y especies de *Pasteurella*.

A pesar de que la gentamicina tiene una distribución moderada o baja, su gran potencia la ha constituido como opción para una amplia gama de infecciones desde las gastroenteritis bacterianas, hasta las neumonías y aun para las infecciones oculares. Se absorbe bien en los sitios de aplicación y brinda biodisponibilidades superiores al 90%; Es importante permitir que las concentraciones disminuyan a menos de 1 mcg /ml para favorecer la liberación de la gentamicina de las células tubulares y evitar así toxicidad renal. Se reconoce, en forma práctica, que una bacteria con una concentración mínima inhibitoria de 8 mcg /ml o más, es resistente al tratamiento con gentamicina. Esta última tiene una notable distribución hacia vías urinarias y por tanto, se le usa contra infecciones a este nivel, se elimina principalmente por filtración glomerular (85%).

En diversos estudios se ha demostrado que una concentración de gentamicina entre 1 y 4 mg por mililitro de solución para impregnar diferentes materiales es efectiva para combatir gérmenes causantes de infección local. (Sumano y Ocampo)

El principal objetivo de este trabajo es el describir la metodología para impregnar con gentamicina el pericardio bovino, demostrando que reduce los índices de infecciones posquirúrgicas, con posibilidades de liofilizarlo, esterilizarlo y empaquetarlo, tomando en cuenta que resulta un material con alta resistencia y bien tolerado inmunológicamente.

## JUSTIFICACIÓN:

Olmos *et al* (1996), demostraron las ventajas del uso del parche de pericardio bovino tratado con glutaraldehído y liofilizado. Sin embargo, una de las principales complicaciones y causa de rechazo al utilizar implantes protésicos lo constituyen las infecciones postquirúrgicas, Al lavar los pericardios para retirar el glutaraldehído remanente por sus cualidades irritantes, se anula su actividad antimicrobiana, la cual es de utilidad cuando existe riesgo de infección. Por esta razón, buscar la metodología para impregnar con gentamicina los parches de pericardio bovino liofilizados y demostrar su efectividad antibacteriana *in vitro* contra los principales gérmenes implicados en la infección de heridas, e *in vivo* contra *E. coli*, sin que esto altere sus cualidades, permitiría obtener un material protésico con tecnología propia y accesible que disminuya los porcentajes de infección y aumente el porcentaje de cirugías exitosas al utilizar estas prótesis en beneficio de nuestros pacientes.



### **HIPÓTESIS:**

**La gentamicina impregnada en los parches de colágena de pericardio bovino liofilizado y tratado con glutaraldehído disminuirá el porcentaje de infecciones posquirúrgicas en ratas, al desafiarlas con *E. coli*. Asimismo, la gentamicina impregnada en los parches inhibirá *in vitro* el crecimiento de bacterias susceptibles a dicho antibiótico.**

#### **OBJETIVO GENERAL:**

1) Probar que el parche impregnado con gentamicina tiene el efecto de prevención en contra de infecciones protésicas y evita las complicaciones por las mismas.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1) Demostrar que impregnar con gentamicina el parche de pericardio bovino tratado con glutaraldehído liofilizado disminuye la presentación de infecciones en la región del parche después de un reto con un cultivo de *E. coli in vivo* en ratas y contra diferentes especies de bacterias *in vitro*.

2) Efectuar análisis macroscópicos, histopatológicos y microbiológicos para evaluar la eficacia de los parches impregnados con gentamicina.

## MATERIAL Y MÉTODOS:

### a) Preparación de los parches de pericardio bovino.

Los pericardios se obtuvieron de bóvidos sanos entre 6 y 18 meses de edad, recién sacrificados en un rastro del Distrito Federal. Se efectuó limpieza manual de los pericardios en el rastro y se sumergieron en solución salina isotónica a 4 °C para transportarse a la unidad de cirugía experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Se terminaron de limpiar con pinzas y tijeras, posteriormente, cada pericardio se lavó en solución de Hanks a 4° C durante aproximadamente 8 horas, manteniéndolos en agitación constante. Una vez concluido este proceso se almacenaron durante 15 días en una solución buffer de fosfatos con glutaraldehído al 0.5%. Antes de proceder a la impregnación con antibiótico y liofilización se eliminó el exceso de glutaraldehído mediante tres lavados de 30 minutos cada uno con 1.5 litros de solución salina fisiológica por pericardio, manteniéndolos en agitación constante, utilizando aquí en particular, un agitador marca NUOVA II thermolyne. Finalizado este proceso se procedió al corte de los pericardios del ancho de un abatelenguas de 1.5 cm, utilizando un bisturí en condiciones estériles, obteniendo tiras lo más largo posible y se sumergieron en solución salina fisiológica con 2 mg / ml de sulfato de gentamicina, utilizando aproximadamente 200 ml en cada matraz, los cuales se sellaron para mantener las condiciones estériles, manteniéndolos posteriormente en refrigeración de 2-4° C por lo menos durante 48 horas.

Pasado este tiempo, se extrajeron del frasco con solución de gentamicina y se colocaron en matraces Erlenmeyer de tamaño adecuado, poniéndolos a lo largo de las paredes laterales con la cara lisa del pericardio hacia el cristal, sin dobleces, sin encimarse y opuestos a la válvula de salida. Se colocaron entonces 35 ml de la solución de gentamicina a cada frasco y se colocaron

taponos a cada matraz, sellándolos con papel parafilm, aplicándolo también en la válvula de salida, lo suficiente para que ajuste perfectamente en la liofilizadora. En todo este procedimiento se utilizaron guantes estériles. Previa congelación de los matraces a  $-55^{\circ}\text{C}$ , se conectaron a la liofilizadora (LABCONCO), durante por lo menos 6 horas con un vacío de 10 mm de Hg y una temperatura de  $-55^{\circ}\text{C}$ . Durante este tiempo se vigiló que el pericardio mantuviera su forma original, ya que con el proceso de deshidratación, tienden a deformarse en el centro y doblarse en los bordes.

Completado el proceso de liofilización, se procedió a cortar las tiras de pericardios, efectuando cortes a intervalos de 1.5 cm cada uno y como las tiras miden en promedio 1.5 cm de ancho, cada parche a utilizar en la experimentación mide 1.5 X 1.5 cm. Posteriormente se introdujeron en empaques especiales, para proceder a su esterilización con gas y se identificaron adecuadamente. No se deben esterilizar con vapor ya que es posible que los parches se rehidraten y reconstituyan, perdiendo de esta manera algunas de sus propiedades antimicrobianas y de resistencia.

Los pericardios que se utilizaron en este experimento, se elaboraron en el departamento de cirugía experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias ( INER),

#### **b) Estudio *in vitro*:**

Una vez que los parches estuvieron listos, se procedió a probar su capacidad antibiótica en contra de cultivos *in vitro* de *Escherichia coli*, *Streptococcus canis* y *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* humano y *Staphylococcus intermedius*, *Klebsiella oxitoca*, *Salmonella thipymurium*, *Bacillus spp* y *Pseudomonas spp* en cajas de Petri donde se colocaron tres parches de pericardio con gentamicina (PCG1,

PCG2, PCG3) y dos sin gentamicina como testigos (PSG1 y PSG2), de un centímetro cuadrado cada uno y se incubaron durante 24 horas , se observaron y se anotaron los resultados, midiendo el halo de inhibición, para lo cual se efectuaron 4 mediciones a cada parche como si fuera una carátula de reloj a las 12 = A , a las 3 = B, a las 6 = C y a las 9 = D y se obtuvo un promedio de estas 4 mediciones. (Ver foto1) También se probaron parches de pericardio con gentamicina y sin gentamicina en tubos de ensaye con medios de cultivo sembrados con *E. coli*, se pusieron a incubar durante 24 horas a 36° C y se evaluó posteriormente el crecimiento bacteriano por espectrofotometría. Esta prueba tiene la ventaja de evaluar *in vitro* la capacidad de la gentamicina del parche para liberarse en un medio líquido.

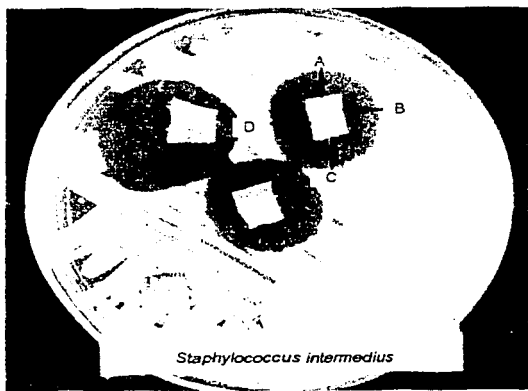
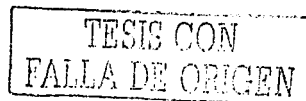


FOTO 1. Los tres parches superiores tienen gentamicina y los dos inferiores no.

### c) Modelo de infección.

Con el objetivo de tratar de garantizar 100 % de infección en el estudio *in vivo* y evitar utilizar una cepa resistente a gentamicina, primero se realizó un modelo de infección en ratas, aplicando varias cepas de *E. coli* en medio de cultivo líquido en concentraciones ascendentes, determinadas con nefelómetro de Mc Farland y espectrofotometría ( $1 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$  y  $6 \times 10^8$ ), hasta lograr 100% de infección. Se utilizaron ratas Wistar machos y hembras entre 250 y 350 gr de peso a las que previa anestesia y asepsia se practicó una incisión en piel de 2 cm infraumbilical, transversal, aproximadamente a 4 cm de la cicatriz umbilical y disecando aproximadamente un centímetro cuadrado de piel. Se aplicó un ml de cada inóculo de *E. coli* a nivel intramuscular y subcutáneo. ( 3 ratas por preparado) Se observaron resultados a los ocho días. En caso de encontrar exudado, se tomaron muestras para tinción de gram y cultivo para aislar *E. coli*. Se logró que el 100% de las ratas fueran positivas a infección con una cepa enteropatógena aislada de conejo proporcionada por el CINVESTAV a una concentración de  $6 \times 10^8$  /ml. Además, se comprobó la sensibilidad *in vitro* de esta cepa de *E. coli* a los parches con gentamicina, colocando 5 parches de pericardio bovino de  $1 \text{ cm}^2$  ( 3 con gentamicina y 2 sin gentamicina) en una caja de Petri con medio de cultivo Müller Hilton, sembrados con la cepa de *E. coli* enteropatógena de conejo y se puso a incubar a  $36^\circ$  durante 24 horas . El halo de inhibición promedio en los parches con gentamicina fue de 6 mm y de 0 mm en los parches sin gentamicina, estos resultados indican que la cepa es sensible a la gentamicina presente en los parches.

La parte microbiológica se realizó en el laboratorio de microbiología veterinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) UNAM. Las cirugías se realizaron en condiciones asépticas en quirófano, al igual que el



postoperatorio en las instalaciones del Hospital Veterinario Belén ubicado en Tultitlán Estado de México.

**d) Estudio in vivo:**

Una vez logrado el modelo de infección, se formaron cuatro lotes experimentales de 10 animales cada uno. Los animales que se emplearon, fueron ratas machos y hembras Wistar de edad y peso similares.

La distribución se efectuó de la siguiente manera:

Lote 1. - Formado por 10 ratas a las cuales se les aplicó un parche de pericardio bovino tratado con glutaraldehído, liofilizado, sin gentamicina y sin inóculo bacteriano. (PSGSI)

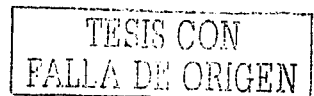
Lote 2. - Formado por 10 ratas a las cuales se les aplicó un parche de pericardio bovino tratado con glutaraldehído, liofilizado, impregnado con gentamicina y sin inóculo bacteriano. (PCGSI)

Lote 3. - Formado por 10 ratas a las cuales se les aplicó un parche de pericardio bovino tratado con glutaraldehído, liofilizado sin gentamicina más inóculo de *E. coli* (PSGCI) 1 ml con  $6 \times 10^8$  UFC.

Lote 4. - Formado por 10 ratas a las cuales se les aplicó un parche de pericardio bovino tratado con glutaraldehído, liofilizado, impregnado con gentamicina más inóculo de *E. coli* (PCGCI) 1 ml con  $6 \times 10^8$  UFC.

Procedimiento quirúrgico:

Se anestesió a las ratas con tjetamina zolazepam, a una dosis promedio



de 25 mg /kg de peso IM una vez logrado el plano quirúrgico se procedió al rasurado y antisepsia con solución yodada en la región abdominal. A todas las ratas se les practicó una incisión en piel de 2 cm transversal infraumbilical aproximadamente 4 cm caudal a la cicatriz umbilical de procediendo a efectuar disección roma de la piel en dirección craneal para efectuar una bolsa marsupial invertida hasta exponer el área periumbilical. Posteriormente se efectuó una hernia de 1 x 1 cm que abarcó todas las capas de la pared abdominal, exceptuando la piel, hasta llegar a cavidad peritoneal. Dicha marsupia se efectuó para evitar que la rata se eventre si se quita los puntos de piel, lo cual es muy frecuente cuando se efectúan incisiones longitudinales sobre la línea media en piel que recubre la hernia artificial. Se cubrió la hernia artificial con un parche de colágena de pericardio bovino de 1 x 1 cm que tuvo o no gentamicina dependiendo del grupo, se aplicaron puntos de sutura de grosor total con vyacril de 4-0, cuantos puntos de sutura fueron necesarios.



Foto 2: Rata anestesiada y preparada para cirugía.

Posteriormente, dependiendo del grupo, se aplicó o no, un inóculo significativo de *E. coli*, el cual se preparó diluyendo una muestra de esta bacteria en solución fisiológica hasta obtener concentraciones de  $6 \times 10^8$  UFC / ml. Se



procedió a cerrar la piel con puntos separados de nylon 4/0, además se aplicó cianoacrilato a lo largo de la sutura como refuerzo para evitar la abertura de la piel en caso de que las ratas se quitaran los puntos y se dejaron los animales encerrados en contenedores adecuados por grupos. Se aplicó meglumina de flunixin IM a dosis de 2 mg/ kg de PV durante 2 días como analgésico. ( Flunidin, laboratorios Lapisa)



Foto 3.- Rata al final del procedimiento quirúrgico.

Se efectuaron evaluaciones de los animales a los 7 días de sometidos al procedimiento, Estos procedimientos se efectuaron en las instalaciones del Hospital Veterinario Belén.

Transcurrido este tiempo se realizó la eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico IP y se realizaron las necropsias en condiciones estériles en una campana de flujo laminar en el laboratorio de microbiología veterinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán tomando en cuenta las siguientes variables para establecer una escala objetiva:

### **Evaluación macroscópica:**

- ❖ Presencia de puntos de sutura y aspecto de la herida en piel.
- ❖ Presencia de bacterias tinción de gram.
- ❖ Aislamiento en medios de cultivo
- ❖ Presencia de exudado subcutáneo.
- ❖ Presencia de exudado peritoneal.
- ❖ Adherencias en la cara lisa del parche
- ❖ Supervivencia 8 días postcirugía

### **Evaluación microscópica:**

Se tomaron durante la necropsia porciones de parches en su unión con la pared abdominal para fijación en formaldehído amortiguado al 4%, Posteriormente se incluyeron en parafina, se efectuaron cortes de 6 micras de grosor y se elaboraron laminillas para efectuar estudio histopatológico, utilizando tinciones de H & E y tricrómica de Masson. Al analizar las laminillas se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: inflamación; miositis; respuesta de reparación con tejido de granulación (rico en capilares de neoformación y fibroblastos) y cantidad de colágena. Se asignaron los siguientes valores según su intensidad: nula = 0, leve = 1, moderado = 2 y severo = 3. Para el análisis histopatológico, se realizó un estudio ciego, es decir, se revisaron las laminillas sin saber a que grupo pertenecía cada una de ellas, para promover un análisis mas objetivo de las mismas. En caso de inflamación si esta tenia

características histopatológicas de aguda, crónica, focal o difusa.

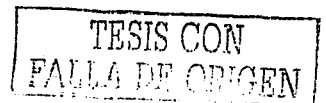
Las laminillas histológicas se elaboraron en el laboratorio de Histología de la Sección de Ciencias Morfológicas de la FES- C UNAM.

#### **Evaluación microbiológica:**

Cultivo del parche y de la masa muscular circundante, efectuando tinción de gram, además de cultivo en cajas de Petri con diferentes medios de cultivo incluyendo agar sangre, Mac Conkey y Müller Hilton y en caso de positividad identificar los microorganismos aislados con pruebas bioquímicas.

Se tabularon los resultados y se realizó análisis estadístico binario no paramétrico utilizando tablas de contingencia, considerando una  $p < 0.05$  como resultado significativo.

El estudio se realizó en el laboratorio de microbiología veterinaria de la FES-C UNAM.

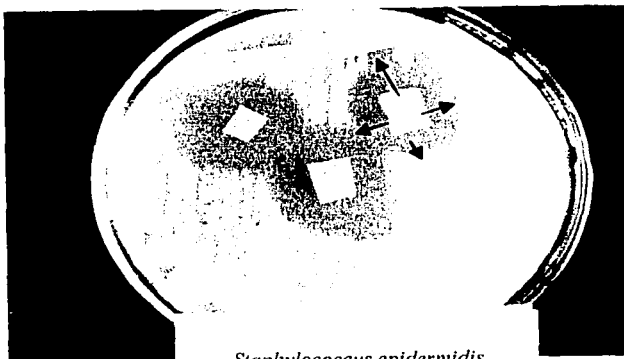


## RESULTADOS

### Resultados in vitro:

En los estudios *in vitro* se observó que los parches con gentamicina mostraron inhibición de crecimiento bacteriano contra: *Escherichia coli*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxitoca*, *Salmonella thiphymurium* y *Bacillus spp*, sin mostrar inhibición de crecimiento contra *Pseudomonas spp* y *Streptococcus pyogenes*. Respecto a los parches sin gentamicina, no se presentó inhibición de crecimiento significativo en ninguno de los casos. (Ver tabla 1 y 2)

En cuanto a las pruebas en tubo de ensaye con medio de cultivo líquido con inóculo de *E. coli*, se apreció turbidez en los casos de parches sin gentamicina y ausencia de esta cuando se introdujeron parches con gentamicina.



*Staphylococcus epidermidis*

FOTO 2. Nótese los halos de inhibición en los parches con gentamicina, lo que indica que la bacteria es sensible a este antibiótico.



"PREPARACION Y COMPROBACION DE LA EFECTIVIDAD DEL PARCHES DE COLAGENA LIOFILIZADO IMPREGNADO CON ANTIBIOTICO PARA SU USO EN CIRUGIA"

TABLA 2. RESULTADOS EN PRUEBAS EN VITRO DE GRAM NEGATIVAS																									
GENERO Y ESPECIE	PCG1				PCG2				PCG3				PSG1				PSG2								
	A	B	C	D	X	A	B	C	D	X	A	B	C	D	X	A	B	C	D	X					
<i>Escherichia coli</i>	2	2	1.5	3	2	3	4	4	3	3.3	7	7	8	8	7.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Klebsiella oxitoca</i>	5	5	4	4	4.3	9	9	8	8	7.8	2	3	3	2	2.5	1	1	1	1	0.9	1	1	0.5	1	0.5
<i>Pseudomonas spp</i> R.G.	0	1	0.5	1	0.62	1	1	2	1	2	2	2	2	1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>Salmonella thiphymurium</i>	9	9	9.5	9	9.1	8	9	8	8	8.1	8	9	9	8	8.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PCG=PARCHE CON GENTAMICINA      R.G.=RESISTENTE A LA GENTAMICINA																									
PSG=PARCHE SIN GENTAMICINA																									
VALORES EXPRESADOS EN MILIMETROS DE INHIBICION																									

23

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

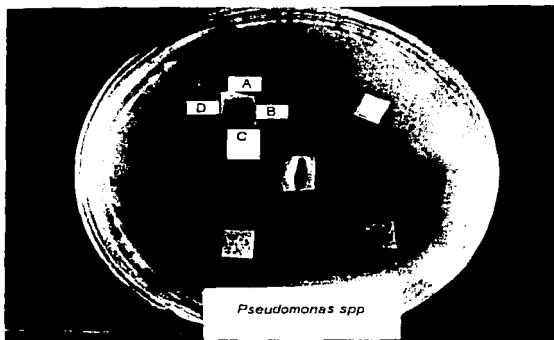


FOTO 3. Nótese la ausencia del halo de inhibición, lo que indica que esta bacteria es resistente a gentamicina.

### Resultados *in vivo*:

En las pruebas *in vivo* se encontraron los siguientes resultados (ver tablas anexas):

\*En el lote 1 ( PSGSI) presentó crecimiento bacteriano en medios de cultivo en 4 de 10 casos, en 3 casos *Streptococcus spp* y en 1 caso *Staphylococcus spp*, lo que representa un 40 %, aunque no se encontró presencia de exudado subcutáneo séptico y los casos positivos corresponden a individuos que se retiraron los puntos de sutura, por lo que se asume que se contaminó la herida con dichos gérmenes.

• En el lote 2 (PCGSI), ninguno de los individuos presentó crecimiento bacteriano en medios de cultivo lo que representa un 0 % de infección e igualmente no se presentó exudado subcutáneo séptico.

- En el lote 3 (PSGCI) se presentó crecimiento bacteriano en medios de cultivo, en 10 de 10 casos, lo que representa un 100%. Se encontró presencia de exudado subcutáneo séptico en 9 casos y en todos los casos se aisló *E. coli* y en un caso se aisló además *Proteus spp*, 3 de 10 ratas fallecieron antes de 8 días. A la necropsia se encontró evidencia de muerte por toxemia y una por peritonitis.

- En el lote 4 (PCGCI) presentó crecimiento bacteriano en medios de cultivo, en 1 de 10 casos, lo que representa un 10 % y se encontró exudado subcutáneo en 7 de 10 casos sin embargo solo uno fue séptico, el cual se retiró los puntos de sutura y se aisló *E.coli*, aunque hay que señalar que la rata tenía hernia de intestino que se incidió accidentalmente a la necropsia.



TABLA 3. RESULTADOS *IN VIVO* DEL LOTE 1: PARCHE SIN GENTAMICINA Y SIN INÓCULO DE *Escherichia coli*. OCHO DIAS POST CIRUGIA

Identificación H=Hembra M=Macho	Puntos de sutura en Piel	Presencia de bacterias tinción de Gram	Aislamiento en medios de cultivo	Presencia de exudado subcutáneo	Presencia de exudado peritoneal	Adherencias cara lisa del parche	Observaciones
1-H-SG-SI	Ausentes herida cerrada	Negativo	Negativo	Amarillo escaso	Ausente	Omento	
2-H-SG-SI	Ausentes mayoría herida cerrada	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ausentes	Granulación abundante roja cara lisa del parche
3-H-SG-SI	Ausentes pequeña herida abierta en piel	Cocos positivo	Positivo <i>Streptococcus spp</i>	Ausente	Ausente	Severa del omento	Granulación muy severa y vascularizada cara lisa del parche
4-H-SG-SI	Ausentes herida abierta	Cocos positivo	Positivo <i>Staphylococcus spp</i>	Ausente	Ausente	Omento	
5-H-SG-SI	Ausentes mayoría herida cerrada	Cocos positivo	Positivo <i>Streptococcus spp</i>	Ausente	Ausente	Ausentes	
6-M-SG-SI	Ausentes herida cerrada	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Omento	Granulación severa cara lisa del parche
7-M-SG-SI	Ausentes mayoría herida cerrada	Cocos positivo	Positivo <i>Streptococcus spp</i>	Ausente	Ausente	Ausentes	
8-M-SG-SI	Ausentes herida cerrada	Negativo	Negativo	Sero - sanguinolento aséptico 3 ml.	Ausente	Cordón espermático izquierdo	Peritonización abundante en ambas caras del parche
9-M-SG-SI	Presentes	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Cordón espermático Derecho	
10-M-SG-SI	Presentes	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Omento y cordón espermático derecho	Peritonización superficie rugosa. Granulación cara lisa severa.
TOTALES	Ausentes 8/10 Herida abierta 5/10	Positivos 4 / 10 Cocos Gram + 4/10	Positivo 4/10 <i>Streptococcus spp</i> 3/10 <i>Staphylococcus spp</i> 1/10	Exudado 2 /10	Exudado 0/10	Adherencias 7/10 Omento 4/10 C.E.I. 1/10 C.E.D.	Vivos a los 8 días post-cirugía 10/10

**TABLA 4. RESULTADOS DEL LOTE 2: PARCHES CON GENTAMICINA Y SIN INÓCULO DE *Escherichia coli*. OCHO DÍAS POST-CIRUGÍA**

Identificación H=Hembra M=Macho	Puntos de sutura en Piel	Presencia de bacterias tinción de Gram	Aislamiento o en medios de cultivo	Presencia de exudado subcutáneo	Presencia de exudado peritoneal	Adherencias cara lisa del parche	Observaciones
1-M-CG-SI	Presentes	Negativo	Negativo	Escaso sero- sanguinolento	Ausente	Omento	Parche no bien adherido al músculo peritonizado superficie rugosa
2-M-CG-SI	Presentes	Negativo	Negativo	Escaso sero- sanguinolento	Ausente	Omento y cordón espermático Izquierdo	Parche bien adherido al músculo
3-M-CG-SI	Presentes	Negativo	Negativo	Escasa secreción serosa	Escaso sero- sanguinolento	Omento	Parche bien adherido al músculo
4-M-CG-SI	Presentes	Negativo	Positivo <i>Staphylococcus spp</i>	Sero - sanguinolento 0.5 ml.	Ausente	Cordón espermático Izquierdo	Parche adherido al músculo aspecto hemorrágico superficie lisa
5-M-CG-SI	Ausentes la mitad herida abierta	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Omento e intestino delgado	Intestino muy adherido, parche no bien adherido a músculo peritonización superficie rugosa
6-M-CG-SI	Mitad herida abierta	Negativo	Negativo	Sero - sanguinolento 1 ml.	Ausente	Cordón espermático derecho y omento	Aspecto hemorrágico cara peritoneal
7-M-CG-SI	Presentes	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Cordón espermático Derecho	
8-M-CG-SI	Presentes	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Cordón espermático Izquierdo	Peritonización superficie rugosa
1-M-CG-SI9	Ausentes mitad herida abierta	Negativo	Negativo	Sero - sanguinolenta escasa	Ausente	Los dos cordones espermáticos	Se inició vejiga accidentalmente
10-M-CG-SI	Presentes	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Cordón espermático Izquierdo	
TOTALES	Ausentes 3/10 Herida abierta 3/10	Positivo 1/10 cocos gram positivos	Positivo 0/10	Positivo 6 / 10	Positivo 1/10	Adherencias 10/10 Omento 2/10 C.E.I. 3/10 C.E.D. 1/10 Ambos CE 1/10 CED y Om 1/10 CEI	Vivos a los 8 días post- cirugía 10/10

27

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 5 . RESULTADOS DEL GRUPO DE RATAS : PARCHES SIN GENTAMICINA, CON INÓCULO DE *Escherichia coli*. OCHO DIAS POST-CIRUGIA.

Identificación H= hembra M= macho	Puntos de sutura en piel	Presencia de bacterias función de Gram	Aislamiento en medios de cultivo	Presencia de exudado subcutáneo	Presencia de exudado peritoneal	Adherencias cara lisa del parche	Observaciones
1-M-SG-CI	Presentes	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	Escaso alrededor del parche	Escaso caseoso alrededor del parche	Ausentes	Falleció al quinto día de toxemia
2-M-SG-CI	Se quitaron dos puntos	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	Caseoso verde amarillento	Ausente	Peritoneo e intestino	Herida parcialmente abierta.
3- M-SG-CI	Presentes	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	Amarillo purulento	Presente en la cara interna del parche	Ausentes	Falleció a los cuatro días , evidencia de peritonitis.
4 -M-SG-CI	Presentes	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i> y a <i>Proteus sp.</i>	Caseoso amarillento, olor fétido	Ausente	Omento	
5-M-SG-CI	La mitad ausentes,	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	Verde amarillento	Ausente	Omento	Herida ligeramente abierta
6-M-SG-CI	Ausentes, la mitad	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	Escaso color verde	Verde en cara interna del parche	Cordón espermático derecho y omento	Herida abierta con dehiscencia
7-M-SG-CI	Presentes	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	Purulento amarillo verdoso	Ausente	Cordón espermático derecho	
8-M-SG-CI	Presentes	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	Caseoso amarillento alrededor del parche	Ausente	Omento y cordón espermático izquierdo	
9-M-SG-CI	Ausentes	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	En los bordes del parche verde amarillento	Ausente	Alrededor del omento	
10-M-SG-CI	Presentes	Positivo a bacilos a gram -	Positivo a <i>E.coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Falleció a las 36 horas de toxemia
Totales	Ausentes 4 / 10 Herida abierta 3 / 10	Positivo 10 / 10	10 / 10	Positivo 9 / 10	Positivo 3 / 10	Positivo 7 / 10	Muertes antes de 8 días 3 / 10

TABLA 6 . RESULTADOS *In vivo* DEL GRUPO 4: PARCHE CON GENTAMICINA, CON INÓCULO DE *Escherichia coli*. OCHO DIAS POST-CIRUGIA.

Identificación H= hembra M= macho	Puntos de sutura en piel	Presencia de bacterias, tinción de Gram	Aislamiento en medios de cultivo.	Presencia de exudado subcutáneo	Presencia de exudado peritoneal	Adherencias cara lisa del parche	Observaciones
1-M-CG-CI	La mitad ausentes	Negativo	Negativo	Amarillento sobre el parche	Ausente	Ambos cordones espermáticos y omento	Herida ligeramente abierta
2-M-CG-CI	Presentes	Negativo	Negativo	Seroso sanguinolento	Seroso sanguinolento bajo el parche	Cordón espermático derecho	
3- M-CG-CI	Presentes	Negativo	Negativo	Líquido sanguinolento con fibrina	Líquido sanguinolento con fibrina, cara interna del parche.	Ambos cordones espermáticos.	abundante granulación.
4 -M-CG-CI	Presentes	Bacilos Gram (-)	Positivo a <i>E. coli</i>	Ausente	Ausente	Intestino	Hernia de intestino se incidió accidentalmente a la necropsia.
5-M-CG-CI	Presentes	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Ambos cordones espermáticos e intestino.	
6-M-CG-CI	Presentes	Negativo	Negativo	Ausente	Ausente	Cordón espermático derecho.	Abundante granulación
7-M-CG-CI	Presentes	Negativo	Negativo	Hemorrágico color rojo púrpura.	Ausente	Cordón espermático derecho	Abundante granulación.
8-M-CG-CI	Presentes	Negativo	Negativo	Sero-sanguinolento	Ausente	Cordón espermático izquierdo	Hernia de intestino.
9-M-CG-CI	Presentes	Negativo	Negativo	Sanguinolento color rojo púrpura.	Ausente	Omento	
10-M-CG-CI	Presentes	Negativo	Negativo	Seroso amarillento opaco.	Ausente	Omento y ambos cordones espermáticos.	
Totales	Herida abierta 1 / 10 Ausentes 1 / 10	Negativo 9 / 10	Negativo 9/10 <i>E. coli</i> 1/10	Exudado 7 / 10	Exudado 2 / 10	Adherencias 10 / 10	Vivos a los 8 días 10/10

29

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TABLA 7. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS IN VIVO ENTRE LOS CUATRO LOTES EXPERIMENTALES.

Número de lote experimental	Puntos de sutura en piel.	Presencia de bacterias tinción de Gram.	Aislamiento en medias de cultivo.	Presencia de exudado subcutáneo.	Presencia de exudado peritoneal.	Adherencias con lisa del parche	Vivos 8 días post cirugía.
1.- PSGSI	Ausentes 8/10 Herida abierta 5/10.	Positivos 4/10. Cocos gram positivos 4/10	Positivos 4/10 <i>Streptococcus spp</i> 3/10 <i>Staphylococcus spp</i> 1/10	2/10	0/10	7/10	10/10
2.- PCGSI	Ausentes 3/10 Herida abierta 3/10	Positivo 1/10 Cocos positivos	Positivo 0/10	6/10	1/10	10/10	10/10
3.- PSGCI	Ausentes 4/10 Herida abierta 3/10	Positivo 10/10	Positivo 0/10	6/10	1/10	10/10	10/10
4.- PCGCI	Ausentes 4/10 Herida abierta 3/10	Positivo 10/10 bacilos gram negativos	Positivo 10/10 a <i>E.coli</i> y 1/ 10 a <i>Proteus spp.</i>	9/10	3/10	7/10	Vivos 7/10. Muertos antes de 8 días 3/10

30

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### Análisis estadístico resultados in vivo:

Se realizó un análisis estadístico binario no paramétrico con tablas de contingencia para probar la independencia entre las variables. (Ver apéndice # 3)

Tabla de contingencia 2x2

	Positivo	Negativo	
Positivo	A	B	R0
Negativo	C	D	R1
	C0	C1	N

Fórmula.

$$X^2 = \frac{N(AD - BC)^2}{(R0)(R1)(C0)(C1)}$$

El valor estadístico de prueba utilizado fue de:  $\alpha = (0.05)$  y el valor de  $X^2$  calculado con un grado de libertad es de 3.84.

Hipótesis nula (Ho) : las variables son independientes.

Hipótesis alterna (Ha): las variables no son independientes.

Se rechaza la Ho si el valor calculado de  $X^2$  es mayor o igual que 3.841.

Ejemplo: Se analizó el efecto de la gentamicina en ausencia de inóculo de *E.coli* . Por lo tanto se comparó el lote1 contra el lote 2 .

Valores obtenidos :

	Positivo	Negativo	
Lote SG - SI	4	6	10
Lote CG - SI	1	9	10
	5	15	20

$$X^2 = \frac{20(36 - 6)^2}{(10)(10)(5)(15)} = 2.4$$

Por lo tanto, dado que el valor obtenido de 2.4 es menor que 3.84, no se rechaza la  $H_0$ ; lo que indica que las variables son independientes. Esto significa que la gentamicina no influye en el valor de las variables, es decir que la gentamicina no modifica los resultados en ausencia de inóculo bacteriano.

Al comparar por el mismo método estadístico el lote 3 ( PSGCI ) contra el lote 4 ( PCGCI ) se rechaza la  $H_0$  y se acepta la hipótesis alterna, por lo que la gentamicina influyó en los resultados disminuyendo los porcentajes de infección en presencia de inóculo de *E. coli*.

Al comparar el lote 2 (PCGSI ) contra el lote 4 (PCGCI) no se rechaza la  $H_0$ , por lo que la presencia o no de inóculo no influye en los resultados en presencia de gentamicina.

Al comparar el lote 1 (PSGSI ) contra el 3 (PSGCI) se rechaza la hipótesis nula, por lo que la presencia de inóculo influyó en los resultados en ausencia de gentamicina.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos que usaron antibiótico y aquellos que no lo usaron.

#### **Resultados de histopatología:**

Los resultados se encuentran tabulados en la tabla 8.

#### **Análisis estadísticos de la histopatología.**

##### Respuesta inflamatoria.

Al comparar el lote1 (PSGSI) contra el 2 ( PCGSI) no se rechaza hipótesis nula.

Al comparar el lote 3 contra el 4 no se rechaza hipótesis nula.

"PREPARACION Y COMPROBACION DE LA EFECTIVIDAD DEL PARCHO DE COLAGENA LIOFILIZADO, IMPREGNADO CON ANTIBIOTICO PARA SU USO EN CIRUGIA".

TABLA 8. RESULTADOS DE HISTOPATOLOGIA

GPOS	NO. LAMINILLA	TINCION	INFLAMACION				CANTIDAD DE COLAGENA				TIEMPO DE GRANULACION				MIOSITIS			OBSERVACIONES		
			HE	0	1	2	3	A <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	0	1	2	3	0	1	2	3			
PSGSI	1	X		X			+F					X				X	X		PURULENTO FOCAL	
	2	X		X			X +D				X	X				X	X		INF. SUPURATIVA	
	3	X		X							X					X	X		INF. SUPURATIVA	
	4	X				X	+F				X	X				X	X		INF. SUPURATIVA	
	5	X				X	X +D			X	X					X	X		INF. SUPURATIVA	
	6	X				X					X					X	X		INF. SUPURATIVA	
	7	X					X +D				X					X		X	INF. SUPURATIVA	
	8	X				X	+D				X					X	X		INF. SUPURATIVA	
	9	X	X								X					X	X			
	10	X					X +D				X			X				X	INF. SUPURATIVA	
Totales	10		1	3	2	4				1	6	3		1	5	4	5	3	2	INF. SUP. 8/10 PUR. FOC 1/10
PCGSI	1	X	X							X				X		X				
	2	X	X							X	X				X	X				
	3	X	X	X				X	X	X				X		X				
	4	X	X	X					X	X						X	X			
	5	X	X	X				X	X							X	X			
	6	X	X		X		+D			X	X				X	X				
	7	X	X	X				X	X	X					X	X				
	8	X	X	X				X	X					X	X	X				
	9	X	X	X				X	X	X					X	X			HEM. SEVERA	
	10	X	X		X		X +D			X	X				X	X		X	INF. SUP. INF. SUP. 1/10 - HS 1/10	
Totales	10		4	4	1	1		4	5	5			3	6	1	9	1			
PSGCI	1	X		X			+D			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	2	X				X	+F			X				X	X	X			INF. SUPURATIVA	
	3	X				X	+D			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	4	X				X	+D			X			X		X		X		INF. SUPURATIVA	
	5	X				X	+D			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	6	X				X	+D			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	7	X		X			+D			X				X			X		INF. SUPURATIVA	
	8	X			X		+D			X				X		X		X	INF. SUPURATIVA	
	9	X		X			+D			X				X		X		X	INF. SUPURATIVA	
	10	X				X	+D			X				X		X		X	INF. SUPURATIVA	
Totales	10		3	3	4			4	6				3	7	3	1	2	4	INF. SUP. 9/10	
PCGCI	1	X			X		+M			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	2	X			X		+D			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	3	X		X			+D			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	4	X			X		+D			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	5	X		X			+M			X	X			X		X			INF. SUPURATIVA	
	6	X		X			+M			X	X			X		X			INF. SUPURATIVA	
	7	X		X			+D			X				X			X		INF. SUPURATIVA	
	8	X		X			+M			X				X		X			INF. SUPURATIVA	
	9	X		X			+M			X	X			X		X			INF. SUPURATIVA	
	10	X				X	+D			X				X		X			INF. SUP. 8/10	
Totales	10		6	3	1			3	5	2			4	5	1	9	1			

0 = nulo, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = severo.  
D = difusa, F = focal, M = multifocal.

33

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Al comparar el lote 2 contra el 4 no se rechaza hipótesis nula.

Al comparar el lote1 contra el 3 no se rechaza hipótesis nula.

Estos resultados indican que no hubo variación entre los grupos y que la intensidad de la respuesta inflamatoria no manifestó diferencias estadísticas significativas en presencia o no de gentamicina y en presencia o no de inóculo de *E.coli*.

#### Inflamación supurativa.

Al analizar el porcentaje de inflamación supurativa entre los grupos encontramos que al comparar el lote 1 contra 2 se rechaza hipótesis nula.

Al comparar el lote 2 contra el 4 no se rechaza hipótesis nula.

Al comparar el lote1 contra el 3 no se rechaza hipótesis nula.

Y al comparar el lote 3 contra el 4 no se rechaza hipótesis nula.

Estos resultados indican que la utilización de gentamicina en ausencia de inóculo disminuyó la incidencia de inflamación de tipo supurativo.

#### Tejido de granulación.

Al analizar el efecto en el tejido de granulación encontramos lo siguiente:

En todas las comparaciones entre lotes no se rechaza  $H_0$ .

Estos resultados indican que la cantidad de tejido de granulación no se afectó por la presencia o no de gentamicina o por la presencia o no de inóculo.

#### Miositis.

Al analizar la incidencia y porcentaje de miositis encontramos:

No se rechaza la  $H_0$  al comparar el lote 1 contra el 2 ; el 2 contra el 4 y el 1 contra el 3.

No se rechaza la  $H_0$  al comparar el lote 3 contra el 4.

Estos resultados indican que la presencia de gentamicina disminuyó la intensidad de miositis en presencia de inóculo de *E. coli*.

Al analizar la cantidad de colágena en las laminillas coloreadas con técnica de Masson encontramos:

Se rechaza la  $H_0$  al comparar el lote1 contra el 2; el 3 contra el 4 y el 1 contra el 3.

No se rechaza la  $H_0$  al comparar el lote 2 contra el 4.

Estos resultados indican que la cantidad de colágena a los siete días post-cirugía disminuye con la presencia de gentamicina en ausencia de inóculo, que disminuye con gentamicina en presencia de inóculo y que disminuye con inóculo en ausencia de gentamicina.

## DISCUSIÓN.

Los defectos de la pared abdominal torácica o del diafragma han significado un problema para el cirujano por la dificultad que representa reparar dichos defectos, en los cuales siempre está presente la posibilidad de infección después del procedimiento reconstructivo, por lo que se han añadido antibióticos a los materiales protésicos, además de su uso parenteral para tratar de evitarla. Es evidente que dicha práctica no debe ser sustitutivo de apearse a los principios básicos de la cirugía, sin embargo, existen muchas circunstancias que pueden contribuir a que se presente infección y justifique la práctica de añadir antibióticos a los bioimplantes.

No existen reportes del uso de antibióticos en parches de pericardio bovino y tampoco frente a un desafío específico con bacterias en ratas. En medicina humana, Ocampo y Lazcano (2000) reportan el uso de gentamicina en esponjas de cemento para su uso en artroplastias y hemiarthroplastias de cadera, encontrando 0% de infecciones profundas y 0.9% en infecciones superficiales, sin embargo no presentan comparaciones con pacientes en las mismas condiciones al utilizar esponjas sin gentamicina. Guzmán y Soto (1997) reportan 44 % de infecciones en heridas quirúrgicas contaminadas y una reducción al 10% al utilizar esponjas con gentamicina en dichas heridas.

En esta investigación se encontró 0% de infecciones en las ratas que se aplicaron parches con gentamicina sin inóculo y un 40% de infecciones al utilizar parches sin gentamicina sin inóculo bacteriano. Encontramos 10 % de infecciones en heridas contaminadas con inóculo de *E. coli* aplicando parches de pericardio bovino con gentamicina, aunque hay que señalar que en el único animal positivo se incidió accidentalmente el intestino delgado, ya que estaba herniado, por lo que tal vez se aisló *E. coli* de la microflora intestinal de la rata, aún así los resultados mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Se presentó

100% de infecciones al aplicar parches sin gentamicina con inóculo de *E. coli*.

Estos resultados demuestran la eficacia de la gentamicina presente en los parches de pericardio bovino, para evitar las infecciones en ratas frente a un reto con la cepa de *E. coli* utilizada en este experimento (1 ml con  $6 \times 10^8$  UFC). Esto no indica necesariamente que resultará igual en todas las especies, ya que tendrían que hacerse pruebas específicas y con diferentes géneros de bacterias.

No se determinaron parámetros como: concentración de gentamicina que conservan los parches con el procedimiento descrito, niveles séricos alcanzados del antibiótico, ni pruebas de funcionamiento hepático y renal, lo cual puede ser de utilidad en futuras investigaciones sobre el tema para valorar los posibles efectos tóxicos de la gentamicina, sin embargo, no se observaron signos de toxicidad o hipersensibilidad en las ratas de este experimento atribuibles a la gentamicina.

Los procesos de liofilización y esterilización no alteraron las propiedades antibacterianas de la gentamicina, aún así es recomendable mantener almacenados los parches en lugares frescos, libres de humedad y protegidos del sol.

Los estudios *in vitro* demostraron la eficacia de la gentamicina para provocaron inhibición significativa contra: *Escherichia coli*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Klebsiella oxitoca*, *Salmonella thiphymurium* y *Bacillus spp* ya que comparativamente los parches sin gentamicina no inhibieron a dichas bacterias. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sumano y Ocampo ( 1997) respecto al espectro de acción de la gentamicina. La gentamicina no provocó inhibición de crecimiento contra *Pseudomonas spp* y *Streptococcus pyogenes* lo que indica que estas bacterias son resistentes a este antibiótico, la resistencia a

la gentamicina por diversos géneros y especies de bacterias se encuentra reportado en la literatura. (Goodman, 1996).

Estos resultados ponen de manifiesto que los parches con gentamicina no inhibirán cualquier bacteria presente en las heridas, por lo que no deben descuidarse las medidas asépticas durante todos los procedimientos quirúrgicos aunque se utilicen antibióticos.

Hay que aclarar que estos resultados in vitro no aseguran la eficacia de los parches con gentamicina in vivo frente a estas bacterias, ya que influyen para estos muchos factores como especie, estado fisiológico y sistema inmune de cada animal.

La inhibición no significativa de los parches sin gentamicina frente a algunas bacterias puede indicar que tal vez quedaron remanentes de glutaraldehído en los parches.

En las ratas que se retiraron los puntos o que se presentó dehiscencia de la piel, se contaminaron con microorganismos presentes en los contenedores, pero aún estos fueron inhibidos en un alto porcentaje cuando los parches tenían gentamicina. Esto comprueba el efecto benéfico de la presencia del antibiótico en los parches. Adicionalmente la presencia de gentamicina redujo las reacciones postquirúrgicas en los animales, probablemente al disminuir la incidencia de infección, lo que pudo contribuir a que se respetaran más las heridas quirúrgicas.

Los estudios histopatológicos demuestran que al disminuir los porcentajes de infección, se reduce la inflamación de tipo supurativo, inhibiendo tal vez de alguna manera los factores estimulantes de síntesis y migración de neutrófilos como las interleucinas, al reducir la respuesta inflamatoria. No se vió afectada la cantidad de tejido de granulación a los ocho días, por lo que añadir gentamicina a los parches no altera los procesos de respuesta cicatrizal del animal en este

sentido, queda por aclarar en un estudio a largo plazo, si el añadir gentamicina a los parches inhibe la cantidad de colágena presente en la reparación de heridas quirúrgicas.

La metodología descrita en esta investigación para la elaboración de los parches de colágena de origen bovino tratada con glutaraldehído, liofilizado e impregnado con gentamicina es accesible para su elaboración y utilización en nuestro país, por lo que es recomendable que estos parches sean aplicados en los animales que lo requieran y comprobar sus beneficios en diferentes especies, contribuyendo de esta manera a la salud animal.

## CONCLUSIONES:

El parche de pericardio bovino con glutaraldehído liofilizado e impregnado con gentamicina inhibe diversas especies de bacterias in vitro, pero existen bacterias resistentes a este antibiótico.

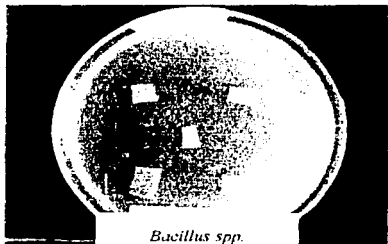
El parche de pericardio bovino con glutaraldehído, liofilizado e impregnado con gentamicina inhibe el desarrollo de infección frente a un reto con *E. coli* de un ml en concentración de  $6 \times 10^8$  UFC .

El parche de pericardio bovino con glutaraldehído, liofilizado e impregnado con gentamicina después de ocho días no disminuye el tejido de granulación, disminuye la inflamación de tipo supurativo, disminuye la miositis y reduce la cantidad de colágena de reparación a los ocho días.

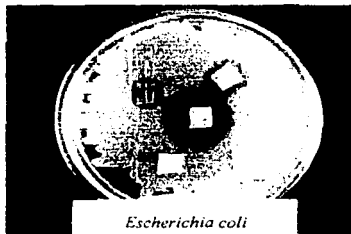
Vale la pena impregnar con gentamicina a los parches de pericardio bovino para disminuir las infecciones de gérmenes susceptibles a dicho antibiótico.

APÉNDICE # 1.

CULTIVOS MICROBIOLÓGICOS.



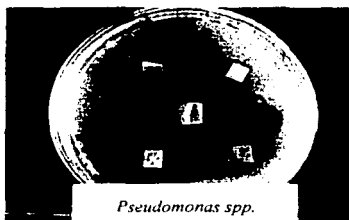
*Bacillus* spp.



*Escherichia coli*



*Klebsiella oxitoca*

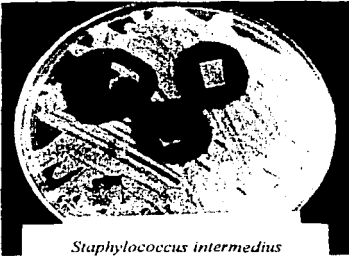


*Pseudomonas* spp.



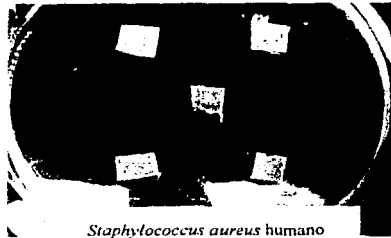


*Salmonella thyphimurium*

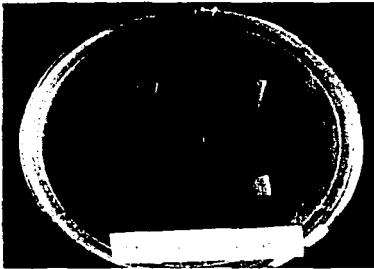


*Staphylococcus intermedius*

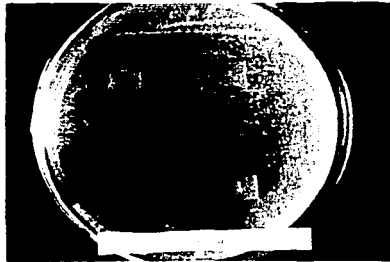
*Staphylococcus epidermidis*



*Staphylococcus aureus humano*



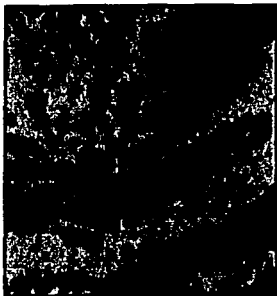
*Streptococcus canis*



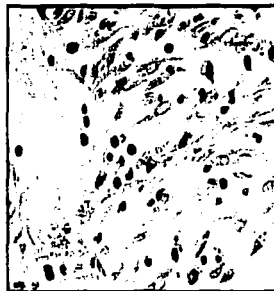
*Streptococcus pyogenes*

## APÉNDICE # 2.

Imágenes de las laminillas de histopatológica donde se evidencian los principales parámetros evaluados.



HE infiltración de neutrófilos en el margen del parche de colágena. Nótese el aspecto acelular del parche.



Masson. Colágena y fibroblastos de reparación.



HE colonias bacterianas e inflamación crónica .



HE inflamación supurativa.



H&E miositis e inflamación supurativa.



H&E colonias bacterianas



Necropsia de una rata con parche sin gentamicina con inóculo de *E. coli*.  
Obsérvese el exudado purulento sobre el parche, el cultivo resultó positivo a *E. coli*.



Necropsia de una rata con parche con gentamicina con inóculo de *E. coli*.  
Obsérvese ausencia del exudado purulento y adherencias de epiplón y conducto  
espermático .

### APÉNDICE # 3.

#### TABLA DE CONTINGENCIA.

La clasificación de un conjunto de entidades de acuerdo con dos criterios, por ejemplo: personas, se representa mediante una tabla en la que los renglones ( $r$ ) representan los diversos niveles de uno de los criterios de clasificación, y las columnas ( $c$ ) representan los diversos niveles del segundo criterio. Dicha tabla se conoce generalmente como tabla de contingencia, la cual utiliza prueba de Ji cuadrada. ( $X^2$ )

La prueba  $X^2$  es una prueba de significación de hipótesis apropiada a estudios relacionados con datos discretos, clasificados en categorías y presentados en forma de frecuencias. La  $X^2$  se define como una suma de cuadrados de variables independientes, distribuidas con media cero y varianza uno. (Steel y Torrie, 1988)

La distribución  $X^2$  es una distribución continua basada en la distribución normal. Quizá el uso mas frecuente de la distribución de  $X^2$  es el de probar la hipótesis nula que indica que dos criterios de clasificación son independientes, si la distribución de un criterio es la misma sin importar cual sea la distribución del otro. Si la hipótesis es rechazada, se podrá concluir que los dos criterios de clasificación no son independientes. Se extrae una muestra de tamaño  $n$  de la población de entidades y la frecuencia de ocurrencia de las entidades en la muestra, que corresponden a las casillas formadas por la intersección de los renglones y columnas, junto con los totales marginales.

Algunas suposiciones que deben cumplirse para hacer una prueba de  $X^2$  válida, es que las observaciones individuales que forman la frecuencia de una celda del cuadro deben ser independientes unas de otras. La prueba puede efectuarse hacia uno o a los dos extremos de la distribución, si es que se emplea la distribución binomial. Como en toda prueba de hipótesis, pueden ocurrir los errores 1 y 2. Los que se presentarán cuando siendo cierta la hipótesis nula ésta se rechaza (error1) o cuando siendo falsa, mediante la prueba, se acepta (error2).

Para aplicar la prueba, no se necesita suponer la existencia de normalidad de las poblaciones, sólo se requiere que la muestra haya sido extraída al azar. Esta prueba permite probar si las frecuencias obtenidas en un estudio, corresponden a las frecuencias establecidas con una hipótesis planteada o nula. Para tomar la decisión se emplea la fórmula:

$$\chi^2 = \sum [(o_i - e_i)^2 \div e_i]$$

Si  $\chi^2 \geq$  que el valor crítico ( $\chi^2_{0.05}$  ó  $\chi^2_{0.001}$ ) que se registra en la tabla, la decisión es que las frecuencias observadas difieren significativamente de las frecuencias esperadas de acuerdo a la hipótesis  $H_0$ , por lo que se rechaza esta hipótesis. El valor de  $\chi^2$  tabulado se busca con sus respectivos grados de libertad.

En caso de que el número de categorías sea pequeño, es recomendable efectuar la corrección de Yates. Esta corrección consiste en agregar 0.5 a los valores observados si es que estos son más pequeños que los valores esperados en cada celda y restar 0.5 a los valores esperados si es que estos son más grandes que los valores esperados.

La fórmula cuando se aplica esta corrección es:

$$\chi^2 = \sum [(|o_i - e_i| - 0.5)^2 \div e_i]$$

Proporciones de acuerdo a dos criterios de clasificación.

Cuando los datos son ordenados de acuerdo a más de un criterio de clasificación, resulta la tabla de contingencia. Para facilitar los cálculos, los resultados pueden representarse en un formato como el que se presenta:

	Criterio A (Ausente)	Criterio A (Presente)	Totales marginal de B
Criterio B (Sin)	Observado / esperado	Observado / esperado	
Criterio B Con)	Observado / esperado	Observado / esperado	
Totales marginal de A			Gran total.

La proporción de los valores esperados se obtiene multiplicando los totales marginales que corresponden a cada celda y dividiendo el producto entre el gran total.

Ahora es posible aplicar la prueba  $\chi^2$

$$\chi^2 = \sum [(o_i - e_i)^2 \div e_i]$$

El valor de  $\chi^2$  tabulada se determina con los grados de libertad  $(f-1)(c-1)$ , siendo  $f$  el número de filas y  $c$  el número de columnas de la tabla de contingencia. Si  $\chi^2$  calculado es igual ó mayor que el valor tabulado se rechaza la hipótesis nula, dado que se está demostrando falta de concordancia entre las proporciones observadas de la muestra con las proporciones establecidas en la hipótesis de independencia. (Carmona et al, 2002; Daniel, 2002)

## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Abdulali SA, Silverton NP, Yakirevich VS, Ionescu MI Right ventricular outflow tract reconstruction with a bovine pericardial monocusp patch. Long-term clinical and hemodynamic evaluation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985 May; 89:764-771.
- 2.-Aragona F [Is bovine collagen safe?]*J Urol (Paris)* 1991; 97:279-281.
- 3.-Araújo JD, Braile DM, Azenha Filho JO, Barros ET, Marconi A. The use of bovine pericardium as an arterial graft. A 5 year follow up. *J Cardiovascular Surg ( Torino)* 1987 Jul-Aug 28:434-439.
- 4.- Bennett, J.V., Brachman, P.S. (eds) : Hospital Infections. Little, Brown, Boston, 1979.
- 5.-Biasi GM, Mingazzini P, Baronio L, Sampaolo A Processed bovine pericardium as patch angioplasty for carotid endarterectomy: a preliminary report. *Cardiovasc Surg* 1996 Dec;4:848-852.
- 6.-Biasi GM, Sternjakob S, Mingazzini PM, Ferrari SA Nine-year experience of bovine pericardium patch angioplasty during carotid endarterectomy. *J Vasc Surg* 2002 Aug;36:271-277.
- 7.-Bortolotti U, Sciotti G, Milano A, Nardi C, Tartarini G Enlargement of the aortic annulus with glutaraldehyde-fixed bovine pericardium during aortic valve replacement. *J Heart Valve Dis* 1998 May;7:299-304.
- 8.-Burke, J. F. : Factors predisposing to infections in the surgical patient. In Maiback, H.I., and Hildick-Smith, G. ( eds.): Skin bacteria and his role in infection. Mc. Graw- Hill Book Co., New York, 1965;143-155.
- 9.-Burke KE, Naughton G, Cassai N A histological, immunological, and electron microscopic study of bovine collagen implants in the human. *Ann Plast Surg* 1985 Jun;14:515-522.
- 10.-Burke KE, Naughton G, Wakdo E, Cassai N Bovine collagen implant: histologic chronology in pig demis. *J Dermatol Surg Oncol* 1983 Nov;9:889-895.
- 11.- Carmona M, Rubio T, Lemus F Curso taller de estadística aplicada a la investigación. Facultad de agricultura Universidad Autónoma de Nayarit. 2002;75-83.
- 12.-Chvapil M, Gibeault D, Wang TF Use of chemically purified and cross-linked bovine pericardium as a ligament substitute. *J Biomed Mater Res* 1987 Dec;21:1383-1393.
- 13.-Cloft HJ, Kallmes DF, Lin HB, Li ST, Marx WF, Hudson SB, Helm GA, Lopes MB, McGraw JK, Dion JE, Jensen ME Bovine type I collagen as an endovascular stent-graft material: biocompatibility study in rabbits. *Radiology* 2000 Feb;214:557-562.
- 14.-Collins RL, Christiansen D, Zazanis GA, Silver FH Use of collagen film as a dural substitute: preliminary animal studies. *J Biomed Mater Res* 1991 Feb; 25:267-276.
- 15.-Cooperman LS, Garovoy MR, Sondel PM Association of the HLA-DR2/DR4 phenotype with skin test responses to bovine dermal collagen: a potential interaction of two MHC alleles in regulating an immune response. *Hum Immunol* 1986 Dec;17:471-9.
- 16.-Crawford FA, Sade RM, Spinale F Bovine pericardium for correction of congenital heart defects. *Ann Thorac Surg* 1986 Jun; 41:602-605.
- 17.-Cukier J, Beauchamp RA, Spindler JS, Spindler S, Lorenzo C, Trentham DE Association between bovine collagen dermal implants and a dermatomyositis or a polymyositis-like syndrome. *Ann Intern Med* 1993 Jun;118:920-928.



- 18.-Charriere G, Bejot M, Schnitzler L, Ville G, Hartmann DJ...-Reactions to a bovine collagen implant. Clinical and immunologic study in 705 patients. J Am Acad Dermatol 1989 Dec;21:1203-1208.
- 19.- Daniel W Base para el análisis de las ciencias de la salud. Bioestadística.2002 Ed. Limusa Wiley: 588-600.
- 20.-DeLustro F, Condell RA, Nguyen MA, McPherson JM A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen.J Biomed Mater Res 1986 Jan;20:109-120.
- 21.-DeLustro F, Smith ST, Sundsmo J, Salem G, Kincaid S, Ellingsworth L Reaction to injectable collagen: results in animal models and clinical use.Plast Reconstr Surg 1987 Apr;79:581-594.
- 22.-Deporter DA, Komori N, Howley TP, Shiga A, Ghent A, Hansel P, Parisien K Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria. Calcif Tissue Int 1988 May;42:321-325.
- 23.-Doillon CJ, Drouin R, Côte MF, Dallaire N, Pageau JF, Laroche G Chemical inactivators as sterilization agents for bovine collagen materials.J Biomed Mater Res 1997 Nov;37:212-221.
- 24.-Ellingsworth LR, DeLustro F, Brennan JE, Sawamura S, McPherson J The human immune response to reconstituted bovine collagen.J Immunol 1986 Feb;136:877-882.
- 25.-Elson ML Clinical assessment of Zypast Implant: a year of experience for soft tissue contour correction.J Am Acad Dermatol 1988 Apr;18:707-713.
- 26.-Eng J, Ravichandran PS, Abbott CR, Kay PH, Murday AJ, Shreiti I Reoperation after pericardial closure with bovine pericardium. Ann Thorac Surg 1989 Dec;48:813-815.
- 27.-Eybi E, Griesmacher A, Grimm M, Wolner E Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells. J Biomed Mater Res 1989 Nov;23:1355-1365.
- 28.-Gallo JI, Artiñano E, Val F, Duran CG Glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the repair of diaphragmatic defects: experimental study. J Thorac Cardiovasc Surg 1982 Jun; 83:905-908.
- 29.-Gargiulo G, Napoleone CP, Solinas M, Frascaroli G, Pierangeli A A new patch for the Norwood procedure. Ann Thorac Surg 1999 Nov;68:1873-1874.
- 30.-Gatti AM, Galloni M, Monari E, Noera G, Pasquino E, Vallana F Calcification of chemically treated bovine pericardium. Int J Artif Organs 1991 Oct;14:647-654.
- 31.- Goodman GA. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Mc Graw Hill 9ª. Ed. 1996; 1173-1188.
- 32.-Grimsley BR, Wells JK, Pearl GJ, Garrett WV, Shutze WP, Talkington CM, Gable DR, Smith BL, Thompson JE Bovine pericardial patch angioplasty in carotid endarterectomy. Am Surg 2001 Sep; 67:890-895.
- 33.- Guzman V, Soto G. Evaluación clínica del implante de colágena con gentamicina en heridas quirúrgicas sucias. XIV Congreso de la asociación mexicana de ortopedia y traumatología. Mérida, Yuc. 25 octubre. 1997.

- 34.- Haneda K, Shoji Y, Togo T, Ito Y, Sato N, Mohri H [Autologous vs bovine pericardial valved patch for widening of the right ventricular outflow tract of tetralogy of Fallot] Rinsho Kyobu Geka 1994 Apr;14:129-132.
- 35.-Hernández Morales, 1 José E. Arango Casado2 y Lic. Juana M. Acosta Hosman Rev Cubana Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular Pericardio heterólogo como material protésico en cirugía Dr. E:\Pericardio heterólogo como material protésico en cirugía.htm Reconocimiento en urgencias de la rotura septal ventricular. Cardiol Cir Cardiovasc 1996;10(1).
- 36.-Herrero J., Fernández P, Turnay J, Olmo N, Calero P, García R, Freile I, Castillo-Olivares JL Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. Biomaterials 1999 Mar;20:539-545.
- 37.-Hettfleisch J. "Release of Gentamycin from Biomaterials implanted into the Lumen of intramedullary load Carriers" A Pharmacokinetic Study Dissertation for obtaining the doctorale in Medicine, Hamburgo. 1991.
- 38.-Heydom WH, Daniel JS, Wade CE A new look at pericardial substitutes. J Thorac Cardiovasc Surg 1987 Aug;94:291-296.
- 39.-Hyder PR, Dowell P, Singh G, Dolby AE Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen: analysis of properties. J Periodontol 1992 Mar;63:182-186.
- 40.-Hyder P, Singh G, Adam S Humoral responses to type I collagen after surgical curettage procedures employing bovine collagen implants. Biomaterials 1992;13:693-696.
- 41.-Ishihara T, Ferrans VJ, Jones M, Boyce SW, Roberts WC Structure of bovine parietal pericardium and of unimplanted Ionescu-Shiley pericardial valvular bioprostheses. J Torca Cardiovasc Surg 1981 May;81:747-757.
- 42.-Jorgensen L.G, Sorensen TS, Lorentzen JE. "Clinical and Pharmacokinetic Evaluation of Gentamycin containing Collagen in Groin Wound infections after Vascular Reconstruction". Eur J Vasc Surg. 5:88-91:1991.
- 43.-Keefe J, Wauk L, Chu S, DeLustro F Clinical use of injectable bovine collagen: a decade of experience. Clin Mater 1992;9:155-162.
- 44.-Kim GE, Kwon TW, Cho YP, Kim DK, Kim HS Carotid endarterectomy with bovine patch angioplasty: a preliminary report. Cardiovasc Surg 2001 Oct;9:458-462.
- 45.-Kligman AM, Armstrong RC Histologic response to intradermal Zyderm and Zyplast (glutaraldehyde cross-linked) collagen in humans. J Dermatol Surg Oncol 1986 Apr;12:351-357.
- 46.-Liao K, Seifter E, Hoffman D, Yellin EL, Frater RW Bovine pericardium versus porcine aortic valve: comparison of tissue biological properties as prosthetic valves. Artif Organs 1992 Aug; 16:361-365.
- 47.-Lozano Palencia T Reconocimiento en urgencias de la rotura septal ventricular. SERVICIO DE CARDIOLOGÍA. HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PRINCESA. MADRID. Emergencias 1999;11:432-434.
- 48.-Macchiarelli G, DiDio LJ, Allen DJ, Stoff NG, Pego-Fernandes P, Motta PM Scanning electron microscopy study of endocardial regeneration in bovine pericardial patch-grafts implanted in the canine heart. Cardioscience 1994 Mar;5:43-49.

- 49.-Mack JW, Smith VC, Ehler WJ, Rogers JH, Brown DL, Eason RL Glutaraldehyde-fixed bovine pericardium for right ventricular outflow enlargement. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1989 Sep-Oct; 30:774-778.
- 50.-Marien BJ, Raffetto JD, Seidman CS, LaMorte WW, Menzoian JO Bovine pericardium vs dacron for patch angioplasty after carotid endarterectomy: a prospective randomized study. *Arch Surg* 2002 Jul;137:785-788.
- 51.-McCoy JP, Schade W, Siegle RJ, Vanderveen EE, Zachary CB, Waldinger TP, Swanson NA Immune responses to bovine collagen implants. Significance of pretreatment serology. *J Am Acad Dermatol* 1987 May;16:955-960.
- 52.-McCoy JP, Waldinger TP, Cohen KA, Schade W, Siegle R, Hamilton TA, Swanson NA Connective tissue diseases and bovine collagen implants. *J Am Acad Dermatol* 1987 Feb;16:315-318.
- 53.-McPherson JM, Ledger PW, Ksander G, Sawamura SJ, Conti A, Kincaid S, Michaeli D, Clark RA The influence of heparin on the wound healing response to collagen implants in vivo. *Coll Relat Res* 1988 Jan; 8:83-100.
- 54.-McPherson JM, Sawamura S, Armstrong R An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants. *J Biomed Mater Res* 1986 Jan;20:93-107.
- 55.-McPherson JM, Sawamura SJ, Conti A Preparation of [3H]collagen for studies of the biologic fate of xenogenic collagen implants in vivo. *J Invest Dermatol* 1986 Jun;86:673-677.
- 56.-Meade KR, Silver FH Immunogenicity of collagenous implants. *Biomaterials* 1990 Apr;11:176-180.
- 57.-Mills SA Complications associated with the use of heterologous bovine pericardium for pericardial closure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986 Sep;92:446-449.
- 58.- Ocampo AL, Lazcano MM. Prevención de infecciones en artroplastias y hemiarthroplastias de cadera. *An. Med. Asoc. Med. Hosp.. ABC* 2000 45 (1): 27-30.
- 59.-Olmos R, Arreola JL, Santillán-Doherty P. et. al- "Uso de material biológico en la reparación de defectos de pared toracoabdominal" ( estudio experimental) *Rev. Acad. Med. Cir. Vel.*;2(4)1990:17-20.
- 60.-Olmos R, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A. et al. "Utilización de pericardio bovino tratado con glutaraldehído liofilizado en la reparación de defectos abdominales en ratas". *cir. gral. (Méx.)*.1996 1:8:161-165.
- 61.-Olmos-Zúñiga R., Jasso-Victoria R., Sotres Vega et. al. "Utilidad del pericardio bovino tratado con glutaraldehído en las resecciones no anatómicas en perros". *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1997;10:155-159.
- 62.-Pires AC, Saporito WF, Cardoso SH, Ramaciotti O Bovine pericardium used as a cardiovascular patch. *Heart Surg Forum* 1999;2:60-69.
- 63.-Quteish D, Dolby AE Immune responses to implanted human collagen graft in rats. *J Periodontal Res* 1991 Mar;26:114-121.

64.-Richards WO, Doolin EJ, Miginsky MP, Moulton AL Pharmacologic inhibition of scar contracture of intracardiac prosthetic patches. J Surg Res 1984 Jul;37:33-42.

65.-Santibañez Salgado, Jose Alfredo Tratamiento quirúrgico de hernias postincisionales con pericardio de bovino tratado con glutaraldehido Tesis Especialidad (Especialidad en Cirugía General)-UNAM, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina México : El autor, 1994.

66.- Santillán-Doherty P, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega A. et al "Thoracoabdominal wall repair with glutaraldehyde-preserved bovine pericardium" J Invest Surg;1996 9:45-55.

67.-Santillán-Doherty P, Jasso-Victoria R, Sotres-Vega, et. al. "Reparación de defectos de pared toracoabdominal de perros con bioprótesis de pericardio bovino". Rev Invest Clin 1995;47:439-446.

68.-Santillán-Doherty P, Jasso-Victoria, R. Sotres Vega A et al. "Pulmonary perfusion during lung transplant rejection and experimental pneumonia". Transplantation 1991;53:533-535.

69.-Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. Am J Pathol 1986 Apr ;123:134-145.

70.-Schwartzmann M Use of collagen membranes for guided bone regeneration: a review. Implant Dent 2000;9:63-66.

71.-Sciafani AP, Romo T, Jacono AA, McCormick S, Cocker R, Parker A Evaluation of acellular dermal graft in sheet (AlloDerm) and injectable (micronized AlloDerm) forms for soft tissue augmentation. Clinical observations and histological analysis. Arch Facial Plast Surg 2000 Apr-Jun; 2:130-136.

72.-Sciafani AP, Romo T, Parker A, McCormick SA, Cocker R, Jacono A Homologous collagen dispersion (dermalogen) as a dermal filler: persistence and histology compared with bovine collagen. Ann Plast Surg 2002 Aug;49:181-188.

73.-Slatter, D.H. Texto de cirugía de los pequeños animales. Ed. Salvat pp. 1989;265.

74.-Smith VC, Knauf DG, Alexander JA Bovine pericardial patch fibrosis requiring reoperation. J Invest Surg 1988;1:289-290.

75.-Smith K, Skelton H, Barrett T, et al. "Histologic and immunohistochemical features in biopsy sites in which bovine collagen matrix, was used for hemostasis". J Am Acad Dermatol.1996; 34:434-438.

76.- Sorge A.A. et.al. "Gentamicin containing implantable devices: in vitro elution characteristics" <http://openglobal.med.uoeh-uac.jp/4iwc/SESSIONS/POSTERS/PA0113/>

77.- Steel, Torrie. Bioestadística. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 1988.

78.- Sumano LH, Ocampo CL. Farmacología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill Int.2a.Ed. 1997.144-155.

79.-Trautinger F, Kokoschka EM, Menzel EJ Antibody formation against human collagen and C1q in response to a bovine collagen implant. Arch Dermatol Res 1991;283:395-399.

80.-Vanderveen EE, McCoy JP, Schade W, Kapur JJ, Hamilton T, Ragsdale C, Grekin RC, Swanson NA The association of HLA and immune responses to bovine collagen implants.

- 81.-Vialle-Presles MJ, Hartmann DJ, Franc S, Herbage D Immunohistochemical study of the biological fate of a subcutaneous bovine collagen implant in rat. Histochemistry 1989;91:177-184.
- 82.-Vrandecic M, Filho BG, Fantini F, Barbosa J, Martins I, Cesar de Oliveira O, Martins C, Max R, Drumond L, Oliveira C, Ferrufino A, Alcocer E, Silva JA, Vrandecic E The use of bovine pericardium for pulmonary valve reconstruction or conduit replacement: long-term clinical follow up. J Heart Valve Dis 1998 Jan;7:54-61.
- 83.-Vrandecic M, Gontijo Filho B, Fantini F, Barbosa J, Martins I, de Oliveira OC, Martins C, Max R, Drumond L, Oliveira C, Ferrufino A, Alcocer E, Silva JA, Vrandecic E Use of bovine pericardial tissue for aortic valve and aortic root replacement: long-term results. J Heart Valve Dis 1998 Mar;7:195-201.
- 84.-Wang Y, Xu YD, Li JS [Cholangioplasty by using a patch of bovine pericardium in the treatment of stricture of extrahepatic bile duct] Zhonghua Wai Ke Za Zhi 1994 May;32:269-270.
- 85.-Wantz GE. "Abdominal wall hernias". Principles of Surgery de Schwarz. SI, Shires GT, Spencer FC. 6th. edición, McGraw-Hill. 1994;1517-1543.
- 86.-Wu R, Luo Z, Zhang J [The experience in applying bovine pericardial patch in the correction of tetralogy of Fallot] Zhonghua Wai Ke Za Zhi 1996 Aug;34:492-294.
- 87.-Zhang Q, Yao K, Liu L, Sun Y, Xu L, Shen X, Lai Q Evaluation of porous collagen membrane in guided tissue regeneration. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1999 May;27:245-253.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN