



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

*“ESTANDARIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER
CORTES HISTOLÓGICOS DIAGNÓSTICOS DEL TERCIO PROXIMAL
DEL TERCER MÚSCULO INTERÓSEO (LIGAMENTO SUSPENSOR
DEL MENUDILLO) EN MIEMBROS PÉLVICOS DE EQUINOS”*

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA

PRESENTA
IGNACIO PÉREZ ORTIZ

ASESORES
MVZ MSc ALEJANDRO RODRÍGUEZ MONTERDE
MVZ MC PhD LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO

MÉXICO D.F JUNIO 2015





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.

DEDICATORIA

A mis padres Francisco y Mily por siempre apoyar mis sueños y aspiraciones.

A Karen por todo el amor que siempre me ha brindado durante todo este camino.

A mi hermano Gustavo por ser un gran ejemplo a seguir.

A mis amigos de la facultad Belem, Carlos, Laura, Lulu, Paty y Rodolfo por compartir grandes momentos siendo parte importante en mi formación.

A mis amigos Carlos, Fide, Isaac, Jaime, Josafat y Moisés por su gran y valiosa amistad.

A todos los animales que conocí en especial a jovi, dana y rocío. Por ser la parte más linda de la carrera trabajar con ustedes.

Con cariño Nacho

AGRADECIMIENTOS

Como más importante, me gustaría agradecer a mi asesores de Tesis. Alejandro Rodríguez Monterde, por darme la oportunidad y brindarme de sus conocimientos. Laura Romero Romero por dedicación y esfuerzo.

Agradezco a José Antonio Guerra Palos y Gabriela López Navarro por permitirme conocer su trabajo, compartir su proyecto y por todos los consejos y conocimientos que me brindaron.

Agradezco al Hospital de Équidos de la FMVZ-UNAM y a mis compañeros del mismo, por su apoyo al brindarme un lugar para aprender y trabajar. A los técnicos del departamento de Patología que me apoyaron con su trabajo y conocimientos.

CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
III.	JUSTIFICACIÓN	16
IV.	HIPÓTESIS.....	17
V.	OBJETIVOS.....	17
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
VII.	RESULTADOS.....	33
VIII.	DISCUSIÓN.....	50
IX.	CONCLUSIONES.....	62
X.	REFERENCIAS	63
XI.	ANEXOS	71

RESUMEN

PÉREZ ORTIZ IGNACIO. Estandarización de un procedimiento para obtener cortes histológicos diagnósticos del tercio proximal del tercer músculo interóseo (ligamento suspensor del menudillo) en miembros pélvicos de equinos (bajo la dirección de: MVZ MSc Alejandro Rodríguez Monterde y MVZ MC PhD Laura Patricia Romero Romero)

Los caballos están constantemente sujetos a lesiones en el aparato locomotor. Entre 46 y 53% son lesiones de ligamentos y tendones, por ello el interés de estudiar morfológicamente estas estructuras. El objetivo de este trabajo fue estandarizar un procedimiento que permita el procesamiento óptimo del tercio proximal del tercer músculo interóseo (ligamento suspensor del menudillo LSM), con el fin de obtener cortes histológicos de calidad diagnóstica, con el propósito de utilizar este protocolo como base para el procesamiento de este tejido en caballos que presenten patologías de esta estructura anatómica.

El principal problema con el procesamiento del LSM, es el endurecimiento excesivo que imposibilita el corte con microtomo de manera adecuada. Para lograr el manejo adecuado del tejido, consultamos diversas técnicas reportadas en la literatura en donde se describe el proceso del LSM para histopatología. Se realizaron cortes transversales del tercio proximal del LSM, cada uno de los cortes se fijaron por inmersión en diversas soluciones fijadoras por diferentes periodos de tiempo para su posterior procesamiento e inclusión en parafina, con el fin de conseguir cortes histológicos de calidad diagnóstica.

Se realizaron seis diferentes procedimientos consultados, a partir de los cuales se realizaron once técnicas de fijación para el LSM, de cada técnica se procesaron cuatro ligamentos y de cada ligamento se buscó obtener cinco cortes histológicos. Se concluyó que empleando la técnica de fijación con formalina al 10% durante 24 horas y solución amortiguadora de fosfatos por otras 24 horas, se obtienen cortes histológicos de calidad diagnóstica con las tinciones de Hematoxilina & Eosina y Tricrómica de Masson.

INTRODUCCIÓN

Durante siglos el caballo ha tenido una relación estrecha con el humano. Ha sido utilizado para la guerra, trabajo, como mensajero, en deportes, e incluso como compañía (Holdemess, Roddman 1993).

El hombre ha mantenido su relación con el caballo, conservándolo en gran medida como un animal para deporte. Para que logren un desempeño óptimo es imperativo mantener su aparato locomotor sano, por lo que es necesario el diagnóstico oportuno y preciso de problemas en el aparato músculo-esquelético (Rodríguez, Raygoza 2012, Butendick E 1982).

Todos los caballos son sujetos de lesiones en el aparato locomotor, y son la mayor causa de pérdidas económicas en la industria equina, siendo por supuesto los caballos dedicados a actividades deportivas los que se encuentran en mayor riesgo (Hodgson, Harrington, Mc Goman 2014).

Entre 46 y 53% son lesiones de ligamentos y tendones, por ello el interés de estudiar los cambios morfológicos en estas estructuras anatómicas de los caballos (Thorpe, Clegg, Birch 2010). En 1999, el centro para la Salud Equina en California EUA, realizó una encuesta entre propietarios tratando de determinar cuál era la afección más común en sus caballos. Después del cólico (síndrome abdominal agudo) las lesiones del ligamento suspensor del menudillo fueron las más frecuentemente mencionadas (Meierhenry, 2007).

Los ligamentos y tendones del aparato locomotor equino juegan una parte importante en la biomecánica; representan un área importante llena de retos para el tratamiento de diversas patologías (Toth, Schumacher, Schramme, Aldair y Donell 2008). La inflamación de la región proximal del tercer músculo interóseo (*Musculus Interosseus Medius*) (Nómina Anatómica, 2012) conocido en la práctica clínica como ligamento suspensor del menudillo (LSM) en miembros pélvicos, es una causa común de claudicación, en caballos de competencia entre los 4 a 10 años de edad (Toth *et al.*, 2008).

El LSM evolucionó a partir de los músculos interóseos, los cuales se ubican directamente en la superficie plantar de los huesos metatarsianos, y se originan en sus porciones proximales y en la filas distales del tarso (Bischofberger, Konar, Ohlerth, Geyer, Lang 2006). En el caballo aparece como una estructura ligamentosa, pero como resultado de esta evolución, el LSM contiene tejido muscular (Meierhenry, 2007) (Figura 1).



Figura 1. Corte transversal del aspecto proximal del LSM del miembro pélvico de un caballo.

(4)

El caballo posee tres músculos interóseos, pero solo la porción media adquiere importancia funcional como LSM, los otros dos son rudimentarios. El LSM en el miembro pélvico, se origina en el tercer hueso metatarsiano y en la fila distal del tarso (Bischofberger *et al.*, 2006), se ubica entre los metatarsianos rudimentarios (segundo y cuarto huesos metatarsianos) (König, Liebich 2004). Para su estudio, el LSM se divide en tres (Figura 2). La parte distal se divide en dos ramas que se insertan abaxialmente en los huesos sesamoideos proximales, pasan dorsalmente y se unen con el tendón extensor digital largo, en la región proximal de la falange proximal (Gary 2011).

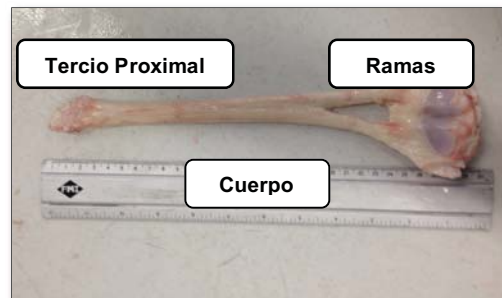


Figura 2. LSM disecado del miembro pélvico de un caballo. Se muestran las tres regiones anatómicas en las que se divide para su estudio.

El LSM en miembros pélvicos se encuentra inervado por la rama profunda del nervio plantar lateral que proviene del nervio tibial que a su vez proviene del nervio femoral caudal (Dyson, Murray 2011). La irrigación está dada por la continuación distal de la rama caudal lateral de la arteria safena (*Ramus caudalis*) que se comunica con la arteria plantar medial (*A. plantaris medialis*), junto con la arteria plantar lateral (*A. plantaris lateralis*) forman el arco plantar profundo (*Arcus plantaris profundos*), que habitualmente es doble y queda sobre las caras dorsal y

plantar del LSM. El retorno venoso está dado por el arco plantar profundo (*Arcus plantaris profundos*) en donde convergen la vena plantar medial (*V. plantar medialis*) y la vena plantar lateral (*V. plantar lateralis*) (Schaller, 1996).

La principal función del LSM es dar soporte al menudillo, prevenir la excesiva extensión de la articulación metatarso falángica, sostener completamente el peso corporal durante la propulsión y distribuir la compresión que produce el peso del animal sobre la articulación (Dyson *et al.*, 2011).

El LSM es una estructura fuerte que soporta grandes cargas y tensiones durante la estación y el movimiento, el cual se adapta en los animales jóvenes a las diferentes cargas producidas durante su desarrollo, sin embargo, al alcanzar la madurez esquelética, a partir de los cinco años, son propensos a acumular micro lesiones a causa de la fatiga constante producida durante la actividad atlética (Pool, Meagher 1990).

La presencia de desmitis en el tercio proximal del LSM ocurre en todas las disciplinas ecuestres. Los caballos afectados presentan pérdida en el impulso de miembros pélvicos, renuencia para ir hacia el frente, menor propulsión de salto, renuencia a saltar, dificultad en movimientos específicos de doma y deficiente desempeño en carreras. El diagnóstico de desmitis proximal del LSM en miembros pélvicos ha aumentado, esto se asocia a cambios en los métodos de entrenamiento y un incremento en la demanda atlética de los caballos (Dyson 2006).

El tratamiento depende de las expectativas atléticas, el grado de la lesión, la arquitectura del LSM, conformación, edad del caballo, cronicidad de la lesión y el número de miembros afectados (Dyson *et al.*, 2011).

Dada la importancia que representan las lesiones del LSM en la práctica clínica y del médico veterinario, es necesario realizar un adecuado diagnóstico de enfermedades, para esto es de gran utilidad realizar estudios histológicos que nos brinden más información acerca de esta estructura anatómica.

Un ligamento es una estructura de tejido conectivo que en la mayoría de los casos conecta dos huesos. Todos los tejidos conjuntivos derivan del mesodermo. Este compartimiento del mesénquima, desde el principio del desarrollo embrionario es un espacio bien definido, delineado y continuo, al que limitan el ectodermo y endodermo. La célula mesenquimatososa es aquella que da origen a todos los derivados mesodérmicos (Banks, 1996).

El tejido conectivo se compone predominantemente de matriz extracelular, contiene pocas células, en su mayoría fibroblastos o células formadoras de fibras de tejido conjuntivo, los fibroblastos jóvenes son estrellados, su citoplasma es abundante, poseen gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso y su aparato de Golgi se encuentra bien desarrollado. Los fibroblastos inactivos o fibrocitos son fusiformes y poseen escaso citoplasma (Banks, 1996), entre las células se aprecian fibras de colágeno.

Las fibras de colágena están constituidas por una glucoproteína estructural, denominada colágeno, cuya composición de aminoácidos es muy característica (Junquera, Carnerio 2012). El colágeno es la única proteína que contiene una cantidad apreciable de hidroxiprolina, es la proteína mas abundante en el cuerpo, representando el 30% de total de ellas en el organismo. La molécula de colágeno (tropocolágeno) es alargada, mide 280 nm de longitud por 1,5 nm de espesor y está formada por tres cadenas peptídicas enrolladas en hélice, denominadas cadena alfa. Hay diversos tipos de cadena alfa, cada una de ellas codificada por un gen, lo que da origen a diversas clases de colágeno (Jeffrey, 2010).

Dentro de la matriz el componente principal es el agua (60-70%), dentro de la materia seca el colágeno es principal componente (80%) (Batson, Paramour, Smit, Birch, Patterson-Kane 2003).

El colágeno tipo I, constituye el 90% del total de colágeno del cuerpo de los mamíferos, formando fibras muy resistentes. Las fibras de colágena tipo I son flexibles y tienen una resistencia tensora notable. Si se les examina con el microscopio óptico aparecen típicamente como estructuras onduladas de espesor variable y longitud indeterminada. Con la tinción de Hematoxilina & Eosina, se observa que las fibras forman un fondo homogéneo de color rosa pálido, con Tricrómica de Masson las fibras se tiñen de color azul intenso (Figura 3) (Ross, 2008).



Figura 3. LSM de un caballo mostrando fibras de colágeno.
Microfotografía Hematoxilina & Eosina 40x

Las fibras de colágeno frescas son de color blanco y en las preparaciones histológicas se tiñen con colorantes ácidos. Así, en cortes teñidos con Hematoxilina & Eosina son de color rojo a rosa. En un caballo adulto el 95% de las fibras de colágeno son del tipo I, estas fibras son flexibles y pueden adaptarse a los movimientos y cambios de tamaño de los órganos de los cuales forman parte; se caracterizan por una alta resistencia a la tensión, pudiéndose estirar sólo un 5% de su longitud inicial aproximadamente. El otro 5% son fibras de colágeno tipo III, es el que predomina después de presentarse una lesión en la etapa de reparación temprana (Hodgson 2014, Dieter 1993).

El tejido muscular en el LSM es funcional y puede estar en un grado variable, se encuentra en mayor proporción en hembras que en machos, el tejido adiposo se incrementa con la edad y aumenta distalmente en cantidad (Shikh, Antonie, Priet, Moula, Denoix 2013, Souza, Van Weeren, Van Schie Van de Lest 2010). Las fibras musculares en el LSM, son en un 95% del tipo I y contribuyen en la locomoción (Soffler, Carl, Hermason, John 2006).

El estudio histológico de una muestra de tejido tiene como fin su análisis morfológico. El empleo de fijadores tiene la finalidad de preservar la morfología y la composición bioquímica de los diferentes componentes citológicos y tisulares, de modo que lo que se observe en el microscopio corresponda a lo que existía cuando los tejidos formaban parte del animal vivo (Prophet, Mills, Jacquelyn, Leslie 1995).

Se denomina proceso histológico a la serie de métodos y técnicas histológicas que tienen por objetivo estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos extraídos de un animal vivo, enfermo o muerto, en secciones más delgadas y teñidas, las cuales se observan con el microscopio óptico (Figura 4) (Barry, Mitchel 2009).

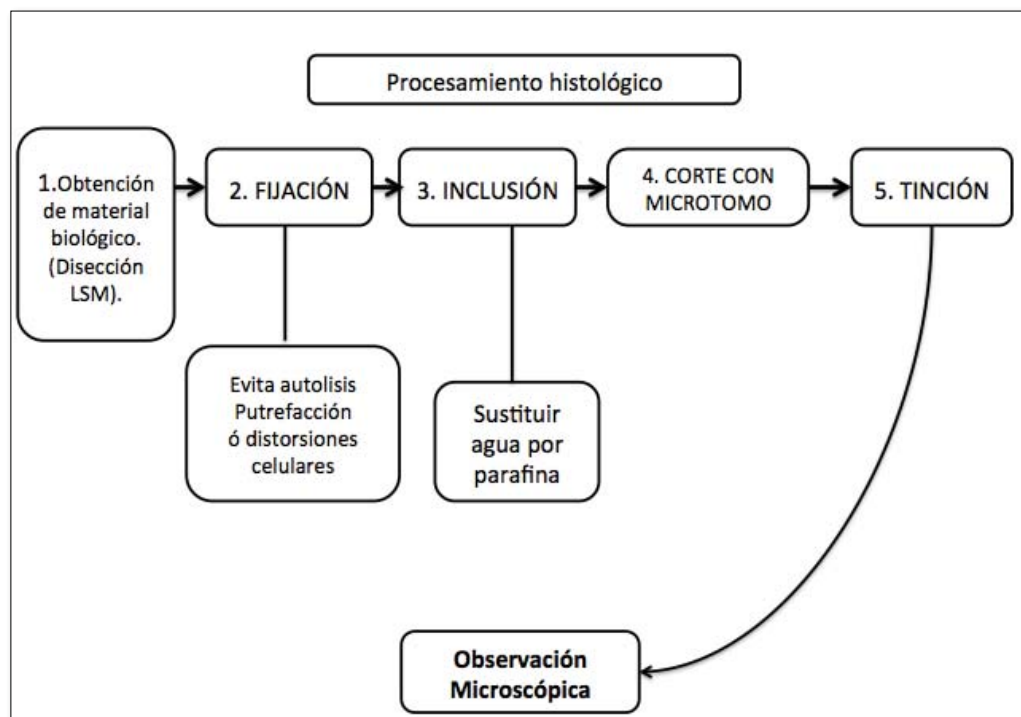


Figura 4. Procesamiento histológico.

El procesamiento histológico comienza con la obtención del tejido lo más pronto posible después de que el animal ha muerto o inmediatamente después de su resección quirúrgica; como recomendación, al cortar el tejido se debe utilizar de preferencia hojas de bisturí o navajas de afeitar que sean nuevas, sin hacer presión excesiva sobre los tejidos. No es recomendable el uso de tijeras para cortar las muestras, pues éstas ocasionan compresión que puede llegar a distorsionar la estructura microscópica del tejido (Samuelson, 2007).

Las muestras son habitualmente fijadas con soluciones líquidas que contienen sustancias denominadas fijadores, las cuales mantienen la estructura celular y molecular en su posición inicial durante el procesamiento (Genneser, 2000).

Todos los tejidos, cuando se extraen de un organismo o cuando el organismo muere, sufren dos tipos de procesos de degradación: autólisis (por acción de enzimas intracelulares, es decir, auto digestión) y putrefacción (por acción bacteriana). Fijar un tejido es preservar sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas a las que poseía en estado vivo. Así, los fijadores deben proteger las muestras de la proliferación bacteriana, así como evitar la autólisis, distorsiones y retracciones tisulares, además de penetrar y modificar el tejido para poder llevar a cabo su inclusión, corte y tinción posterior (Ross 2011, Genneser 2000).

No existe un fijador universal, ni un método de fijación único. La elección depende de las características fijadoras que necesitemos. La fijación tiene una duración

mayor a 12 horas y dependerá del tipo de fijador y del tamaño de la muestra (espécimen) con el que se esté trabajando (Ross 2011).

Los fijadores en general endurecen los tejidos, esto es conveniente pero no debe sobrepasar un cierto límite compatible con la obtención ideal de cortes histológicos; el efecto endurecedor de un fijador depende del tipo de tejido y puede incrementarse por la deshidratación en el proceso de preparación y del material para inclusión (Martoja, Martoja-Pierson, Leland 1970). Los fijadores usados en histología generalmente conservan las fibras conjuntivas, pero algunos métodos de tinción son incompatibles con el empleo de determinados fijadores (Finn G, 2000). La formalina neutra al 10% estabilizada, está considerada como el fijador general para especímenes patológicos (Prophet *et al*, 1995). Este fijador es utilizado en los laboratorios por proporcionar una buena preservación de los tejidos, provoca poca retracción tisular, además de ser compatible con la mayoría de las tinciones histológicas (Barry *et al*, 2009).

El formol comercial consiste en una solución acuosa del gas formaldehído ($\text{CH}_2=\text{O}$) al 37-40%, que al combinarla con otras sustancias químicas y amortiguadoras, como los fosfatos, obtiene un pH de 6.8 a 7 aproximadamente (Cecil, Johnson, Peter 1985). Se presenta como un líquido claro e incoloro, que emite vapores sumamente irritantes para las mucosas conjuntival y respiratoria. Su acción fijadora se ejerce mediante la formación de puentes entre las moléculas de proteínas coagulándolas. El tiempo de fijación de las muestras dependerá de

su tamaño, debe ser mayor a 12 horas y si es posible, de preferencia hacerlo en refrigeración (Cormack 2001, Cecil *et al* 1985).

La formalina tiene capacidad bactericida, fungicida y fija adecuadamente los tejidos que son procesados en parafina por lo que se utilizó como agente fijador. La podemos clasificar como un agente fijador no coagulante (Cuadro 1). Las soluciones fijadoras no coagulantes interactúan con diferentes sitios químicos de las macromoléculas tisulares para establecer a modo de puente uniones que originan una malla que entrelaza proteínas. A diferencia de los fijadores coagulantes la eliminación de moléculas de agua de la muestra es mucho menor logrando que la mayoría de los componentes tisulares se conserven adecuadamente (Suvarna, Layton, Bancroft, 2013).

Cuadro 1. Agentes fijadores coagulantes y no coagulantes

Fijadores Coagulantes	Fijadores no Coagulantes
Etanol	Formaldehído
Metanol	Glutaraldehído
Acetona	Glioxal
Ácido pírico	Hidrato de cloral
Ácido tricloroacético	Sales de mercurio de zinc
Propanol	Tetróxido de osmio

El poder de penetración es la velocidad con que el activo fijador alcanza las capas más profundas del espécimen. Este poder de penetración depende tanto de la

fluidez del líquido fijador como de la reactividad química que se produce entre este y el tejido. Se ha establecido un valor (constante "K") para cada elemento fijador (Cuadro 2) (Baker 1958), este valor nos permite conocer el poder de penetración del fijador en el tejido y se aplica de acuerdo a una fórmula (Figura 5). Debido a que las reacciones químicas que se producen al entrar en contacto la formalina con las proteínas son lentas, se recomienda mantener las muestras en contacto con la formalina por lo menos durante 24 horas, para conseguir una buena acción (Lillie, Fullmer 1976, Drurry, Wallington 1980). En las diferentes técnicas de fijación utilizadas, las muestras estuvieron en formalina a diferentes concentraciones, durante 24 horas o más.

Cuadro 2. (Baker, 1958). Tabla con las constantes de difusión de diferentes agentes fijadores.

Fijador	Constante K
Formaldehído	3.6
Glioxal	3.3
Ácido Pícnico	0.8
Ácido Acético	2.75
Glutaraldehído	3.4
Etanol	1.3
Metanol	1.45
Tetraóxido de Os	0.85
Bicloruro de Hg	2.2
Trióxido de Cr	1

$$t = [d/K]^2$$

Figura 5. Ecuación poder de penetración, en donde "t" es tiempo, "d" es diámetro del tejido y "K" es la constante de difusión.

Al concluir la fijación, el fijador debe ser eliminado de las muestras. Para tal fin se procede al lavado de los tejidos con solventes orgánicos que permitan la infiltración con parafina. Así se evita que los tejidos se endurezcan demasiado o que ciertos componentes del fijador modifiquen su estructura e impidan un adecuado corte de las secciones o la correcta coloración de sus componentes celulares (Cormack 2001). En la fijación por inmersión siempre debe utilizarse una proporción 1:10, es decir 10 veces más volumen del fijador que de la muestra (Genneser, 2000).

La inclusión en parafina es el método más común de inclusión. Consiste en infiltrar la muestra de tejido con sustancias líquidas que tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifican, sin afectar las características de la muestra (Dieter, 1993).

Para la inclusión en parafina es necesario sustituir el agua de los tejidos fijados y sumergirlos en parafina, para lo que se emplea el siguiente procedimiento previo: deshidratación de la muestra, cuyo propósito es eliminar toda el agua de los tejidos y sustituirla gradualmente por un solvente orgánico que se mezcle con el agua; para esto se utilizan generalmente alcoholes (Ross, 2011). Cuando el agua del tejido ya ha sido remplazada por el alcohol, se procede a sustituir este último por una sustancia que puede mezclarse con el alcohol y la parafina y que torna las piezas traslúcidas, a este paso se le conoce como aclaramiento o diafanización, generalmente para este procedimiento se utiliza benceno al 50%. La parafina es una sustancia de aspecto ceroso que está formada por mezclas de hidrocarburos

saturados; que a temperatura ambiente es sólida y su punto de fusión puede variar entre 40 y 70 °C (Ross 2011, Barry *et al* 2009).

Con el microtomo para parafina se pueden obtener secciones desde tres hasta veinte micras de grosor, para observar con el microscopio óptico. Poseen una cuchilla de acero, porta bloques y un sistema que permite acercar el bloque de parafina a la cuchilla según el grosor de la sección que se pretende obtener (Prophet *et al* 1995, Dieter 1993).

La tinción Tricromica de Masson nos permite diferenciar entre colágeno y fibras musculares, esta técnica de coloración especial permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno, aunque no hay colorantes verdaderamente específicos para la colágena, esta se demuestra mejor con los colorantes ácidos (Genneser 2000).

El último paso de todo proceso histológico es la observación de la muestra obtenida con la técnica realizada. Para lo cual necesitamos microscopios ópticos que nos permitan aumentar la imagen generada por las muestras o cortes histológicos para diferenciar identificar estructuras tisulares diminutas (Dolores, 2007).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que las patologías en el ligamento suspensor del menudillo son una de las principales causas de claudicación, con una alta incidencia en los caballos de alto rendimiento, es necesario profundizar en el estudio de los componentes histológicos de esta estructura anatómica para lograr entender las posibles patologías, así como las consecuencias de los tratamientos a corto, mediano y largo plazo. Para este tejido es indispensable una técnica (protocolo) de fijación y corte para obtener muestras adecuadas para la observación al microscopio.

HIPÓTESIS

El procesamiento histológico adecuado de las muestras de ligamento suspensor del menudillo, facilitará obtener cortes histológicos de calidad diagnóstica que permitan realizar una valoración adecuada del tejido.

OBJETIVO

Estandarizar un procedimiento que nos permita el procesamiento óptimo del tercio proximal del ligamento suspensor del menudillo de caballos clínicamente sanos, con el fin de obtener cortes histológicos de calidad diagnóstica, con el propósito de utilizar este protocolo como base para el procesamiento de este tejido en caballos que presenten patologías de esta estructura anatómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Cirugía y Zootecnia para Équidos en conjunto con el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se trabajó con especímenes de miembros pélvicos de caballos, los cuales se obtuvieron en las instalaciones del Rastro de San Vicente Chicoloapan, en el Estado de México.

Sujetos de estudio

Ligamento suspensor del menudillo de caballos de raza criolla de entre 4 y 18 años de edad, sexo indistinto.

Criterios de inclusión

Caballos clínicamente sanos, que a la inspección clínica no muestren signos de enfermedad.

Examen Físico General

1. Temperatura en caballos adultos: 38°C más-menos 1°C (Speirs 1997) (Figura 6).
2. Pulso arterial y frecuencia cardiaca: 30 a 40 pulsaciones por minuto (Speirs 1997) (Figura 7).
3. Frecuencia respiratoria: 8 a 20 respiraciones por minuto (Speirs 1997) (Figura 8).

4. Pulso digital normal, a la palpación del paquete neurovascular a la altura de la cuartilla (Speirs 1997) (Figura 9).
5. Sonidos intestinales (Figura 10).

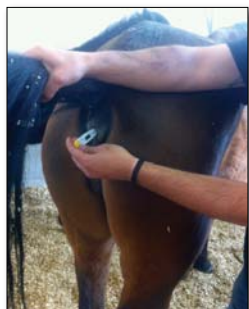


Figura 6. Toma de temperatura rectal



Figura 7. Toma del pulso arterial (arteria mandibular).



Figura 8. Toma de la frecuencia respiratoria.



Figura 9. Toma de pulso digital en miembros anteriores.



Figura 10. Auscultación de los sonidos intestinales.

Caballos que al examen del aparato locomotor no muestren signos de claudicación.

1. Evaluación en estática del aparato locomotor.
2. Examen visual del caballo en dinámica al paso (Figura 11).
3. Evaluación del casco: Manipulación y evaluación visual, conformación, desbalances, simetría y distancia entre talones, presencia de anillos y cuartos sobre la muralla, lesiones, golpes, secreciones sobre la banda coronaria, suela y ranilla (Figura 12), pinzado de casco (Figura 13).
4. Palpación de metatarsos, buscando dolor y anomalías cerca del ligamento suspensor del menudillo (Figura 14).



Figura 11. Evaluación en dinámica al paso.



Figura 12. Evaluación visual y manipulación del casco de miembros pélvicos de equinos.



Figura 13. Pinzado de casco en miembro pélvico.



Figura 14. Palpación de la región plantar del metatarso.

Criterios de exclusión

Caballos que a la inspección clínica mostraran signos de enfermedad.

Caballos que mostraron claudicación.

Caballos con evidencia de lesiones en la región del LSM (laceraciones, aumento de tamaño, dolor a la palpación).

Caballos con una alzada mayor de 165 cm y 500 kg de peso.

Obtención del ligamento

Después de la inspección clínica del animal, se obtuvieron los miembros pélvicos.

A los caballos se les practico eutanasia en el rastro San Vicente Chicoloapan, Estado de México, por medio de insensibilización con pistola de embolo oculto y desangrado por corte de yugulares. Los miembros pélvicos se desarticularon del resto del cuerpo animal a nivel de la articulación tibio-tarsiana (Figura 15). La forma de obtención y el método de fijación para los ligamentos, se describen más adelante para cada uno de las técnicas evaluadas.



Figura 15. Miembros Pélvicos, obtenidos en el rastro.

Descripción de las técnicas de fijación para procesamiento histológico

Se realizaron seis diferentes procedimientos histopatológicos previamente consultados, de los cuales se realizaron once técnicas de fijación para el tercio proximal del LSM; para cada una de las técnicas se procesaron cuatro ligamentos obtenidos de dos caballos y de cada porción proximal del LSM se buscó obtener cinco cortes histológicos.

Procedimiento 1

Técnica: Ligamento adherido al hueso

1. Se trabajó con 4 ligamentos de miembros pélvicos de caballos, desarticulados con cuchillo para necropsias a nivel de la articulación tibio tarsiana después se realizó un corte con sierra a nivel de la articulación intertarsiana proximal (Figura 16).
2. Con ayuda de instrumental para disección y hojas de bisturí número 20, se retiraron todos los tejidos blandos del área dejando expuesto al LSM y los ligamentos sesamoideos distales.
3. Los miembros sujetos con piola de algodón a las tablas de madera, se sumergieron en una solución de formalina neutra al 10% dentro de un recipiente de plástico durante 48 horas, manteniendo una angulación de 160° en la articulación metatarso falángica (Figura 16).
4. Se retiraron los LSM de su origen al hueso por una navaja de bisturí del número 20 y se colocaron en tablas de madera marcando los bordes proximal y lateral.

5. Se colocaron en un cuarto con una temperatura entre 15 y 20 °C dentro de bolsas de polietileno con formalina neutra al 10%, durante 14 días.



Figura 16. Miembro pélvico desarticulado a nivel de la articulación intertarsiana proximal el cual se diseccionó dejando el LSM. Sujetado en una tabla de madera para su fijación y posterior procesamiento histológico, con una angulación de 160°.

7. Se realizaron cinco cortes transversales de 1 cm de grosor aproximadamente, para su procesamiento histológico (Anexo 2) y posterior inclusión en parafina (Figuras 17 y 18).



Figura 17. Procesador de tejidos (Histokinette Leica), para procesamiento de los segmentos de ligamento.



Figura 18. Cápsulas de procesamiento histológico con segmentos de LSM embebidos en parafina.

8. El tejido incluido en parafina se trató de cortar en microtomo, sin embargo, no se pudieron realizar los cortes debido a la dureza de los ligamentos procesados (Figura 19).



Figura 19. Microtomo Leica RM2125
RTS.

Procedimiento 2

Técnica: Fijación sobre tabla

1. Se trabajó con cuatro ligamentos de miembros pélvicos de caballo, desarticulados a nivel de la articulación tibio tarsiana con un cuchillo de necropsias.
2. Con material de disección y hojas de bisturí del número 20, se disecó por completo el LSM, retirándolo de su origen e inserción (Anexo 5).
3. Se sujetaron con piola de algodón a tablas de madera, indicando el lado proximal y lateral (Figura 20).



Figura 20. LSM retirado del miembro pélvico.
Sujetado en una tabla para su fijación.

4. Se sumergieron los LSM por 14 días en formalina neutra al 10% y se mantuvieron en un cuarto a temperatura entre 15 y 20°C.
5. Partiendo de un centímetro de la parte más proximal, se cortaron cinco secciones transversales de un centímetro de grosor.
6. Los ligamentos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol, hasta llegar al 100%.
7. Se incluyeron en cápsulas para su posterior procesamiento histológico e inclusión en parafina.
8. Debido a la dureza del tejido incluido en parafina, no se pudieron realizar los cortes en el microtomo.

Procedimiento 3

1. Se trabajó con cuatro ligamentos (por cada técnica realizada), de miembros pélvicos de caballos, desarticulados a nivel de la articulación tibio tarsiana con un cuchillo de necropsias.
2. Con un equipo de disección y una hoja de bisturí número 20, se disecó el LSM y se retiró de su sitio de su origen e inserción (Anexo 5) (Figuras 21, 22, 23).



Figura 21. Disección del miembro pélvico.



Figura 22. Disección del LSM e identificación de estructuras.



Figura 23. Separación de su sitio de inserción LSM.

3. Se retiró un centímetro de la porción más proximal del ligamento y se realizaron cinco cortes transversales de un centímetro de grosor, empezando en la porción más proximal y hacia distal (Figura 24).



Figura 24. Sección de un centímetro de la porción más proximal del LSM y hacia distal.

4. Cada fragmento se fijó dentro de cápsulas para procesamiento histológico, en diferentes concentraciones de formalina neutra, durante 24 horas, en un cuarto temperatura entre 15 y 20°C (Figura 25).

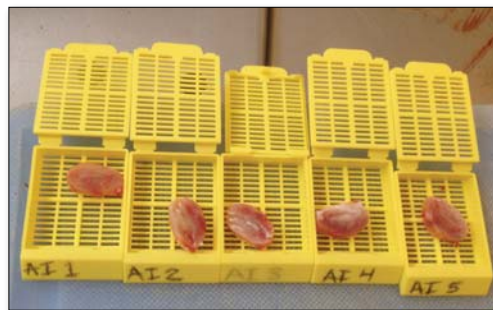


Figura 25. Cápsulas de procesamiento histológico con los segmentos del LSM.

3.1 Técnica: 10% formalina

Se realizaron cinco segmentos de un centímetro de grosor del LSM, los cuales se colocaron en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron en solución de formalina neutra al 10% durante 24 horas.

3.2 Técnica: 1% formalina

Se realizaron cinco segmentos de un centímetro de grosor del LSM, los cuales se colocaron en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron en solución de formalina neutra al 1% durante 24 horas.

3.3 Técnica: 3% formalina

Se realizaron cinco segmentos de un centímetro de grosor del LSM, los cuales se colocaron en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron en solución de formalina neutra al 3% durante 24 horas.

3.4 Técnica: 5% formalina

Se colocaron los cortes de LSM en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron con solución al 5% de formalina neutra durante 24 horas.

5. Se sometieron a procesamiento histológico para su inclusión en parafina.
6. De cada segmento se realizaron cortes en el microtomo.
7. Los cortes histológicos fueron teñidos con la tinción de Hematoxilina & Eosina (Figuras 26) (Anexo 3).



Figura 26. Tinción de Hematoxilina-Eosina

8. Se realizó una inspección visual de las laminillas, para evaluar la calidad de los cortes histológicos. Para todas las concentraciones de formalina, se encontró que los cortes obtenidos no tenían calidad para evaluarse al microscopio óptico.

Procedimiento 4

4.1 Técnica: Schulz Key una semana

Los cortes se colocaron en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron en solución de Schulz-Key (Anexo 1), durante 1 semana.

4.2 Técnica: Schulz Key dos semanas

Los cortes se colocaron en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron en una solución Schulz-Key, (Anexo 1) durante 2 semanas.

4.3 Técnica: glicerol 48 horas

Los cortes se colocaron en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron en formalina neutra al 10% durante 24 horas y se pasaron a una solución de glicerol por 48 horas (Anexo 1).

1. Se trabajó con cuatro LSM (para cada una de las técnicas descritas), de miembros pélvicos de caballos desarticulados a nivel de la articulación tibio tarsiana con un cuchillo de necropsias.
2. Con material de disección y una hoja de bisturí del número 20, se disecó el LSM y se retiró de su sitio de su origen e inserción (Anexo 5).
3. Se retiró un centímetro de la porción más proximal y se realizaron cinco cortes transversales de un centímetro de grosor, iniciando en la parte más proximal y hacia distal.
4. Se colocaron las secciones de tejido en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron en soluciones con glicerol en un cuarto con una temperatura entre 15 y 20°C (Anexo 1).
5. Para los tres procedimientos anteriores, los cortes fueron procesados para histología e incluidos en parafina para realizar cortes con el microtomo. Los cortes histológicos fueron teñidos con la tinción de rutina Hematoxilina & Eosina.
6. Se realizó la inspección macroscópica de las laminillas para evaluar la calidad de los cortes histológicos. Los cortes obtenidos no tuvieron la calidad para evaluarse al microscopio óptico.

Procedimiento 5

Técnica: Formalina 48 horas/PBS

1. Se trabajó con cuatro LSM de miembros pélvicos de caballos, desarticulados a nivel de la articulación tibio tarsiana con un cuchillo de necropsias.

2. Con material de disección y hoja de bisturí del número 20, se disecó el LSM y se retiró de su sitio de su origen e inserción (Anexo 5).
3. Se retiró un centímetro de la porción más proximal y se realizaron cinco cortes transversales de un centímetro de grosor, empezando lo más proximalmente posible y hacia distal.
4. Se colocaron los cortes en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron con formalina neutra al 10% durante 48 horas en un cuarto con una temperatura entre 15 y 20°C.
5. Los cortes se enjuagaron y se sumergieron en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés, phosphate buffered saline) durante 24 horas.
6. Los tejidos fueron procesados para histología e incluidos en parafina para realizar cortes con el microtomo. Las laminillas fueron teñidas con la tinción de Hematoxilina & Eosina.
7. Se realizó la inspección macroscópica de las laminillas para evaluar la calidad de los cortes histológicos. Los cortes obtenidos no tuvieron la calidad para evaluarse al microscopio óptico.

Procedimiento 6

Técnica: Formalina 24 horas/PBS

1. Se trabajó con cuatro LSM de miembros pélvicos de caballos, desarticulados a nivel de la articulación tibio tarsiana con un cuchillo de necropsias.

2. Con material de disección y una hoja de bisturí del número 20 se disecó el LSM y se retiró de su sitio de inserción (Anexo 5).
3. Se retiró un centímetro de la porción más proximal y se realizaron cinco cortes transversales de un centímetro de grosor, empezando lo más proximalmente posible y hacia distal.
4. Se colocaron los cortes en cápsulas para procesamiento histológico y se fijaron con formalina neutra al 10% durante 24 horas en un cuarto con una temperatura entre 15 y 20°C.
5. Se enjuagaron los cortes y se sumergieron en una solución de PBS durante 24 horas (Figura 27).

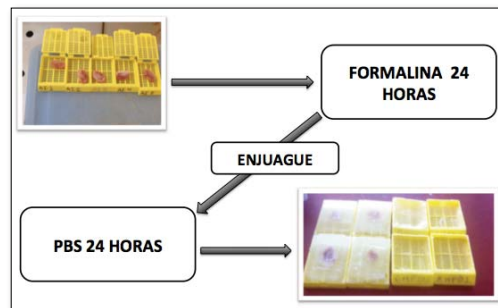


Figura 27. Técnica de fijación modificada.

6. Los tejidos fueron procesados para histología e incluidos en parafina para realizar cortes con el microtomo. Las laminillas fueron teñidas con la tinción de Hematoxilina & Eosina.
7. Se realizó la inspección macroscópica de las laminillas para evaluar la calidad de los cortes histológicos.

8. Los cortes obtenidos se observaron en un microscopio óptico LEICA DM 500, bajo los objetivos de 10x y 40x (Figura 28).
9. Se tomaron fotomicrografías con una lente LEICA ICC50 HD, utilizando el programa LAS E2
10. De las cápsulas procesadas se obtuvieron nuevos cortes histológicos y se tiñeron con Tricrómica de Masson.



Figura 28. Microscopio Leica DM 500, donde se observaron los cortes histológicos, utilizando una lente Leica ICC50 HD con el programa LAS E2.

Estadística

Se realizó la prueba de Ji cuadrada, para comparar dos variables nominales (laminillas con calidad diagnóstica y laminillas sin calidad diagnóstica). En donde la hipótesis nula formulada fue la siguiente. H_0 : No hay diferencia en las laminillas conseguidas entre las técnicas de procesamiento histológico realizadas.

RESULTADOS

En el examen físico realizado a los veintidós caballos en donde definimos como un caballo clínicamente sano aquel a la inspección no presentas signos de enfermedad. Sin cambios clínicos aparentes (SCCA), que a la inspección visual de la marcha del caballo, manipulación de los no se observó claudicación o evidencia que sugiera un problema locomotor los resultados se muestran en el Cuadro 3 (Anexo 4).

Cuadro 3. Resultados de la inspección clínica

CABALLO	EXAMEN CLÍNICO	EVALUACIÓN LSM
1	Clínicamente Sano	SCCA
2	Clínicamente Sano	SCCA
3	Clínicamente Sano	SCCA
4	Clínicamente Sano	SCCA
5	Clínicamente Sano	SCCA
6	Clínicamente Sano	SCCA
7	Clínicamente Sano	SCCA
8	Clínicamente Sano	SCCA
9	Clínicamente Sano	SCCA
10	Clínicamente Sano	SCCA
11	Clínicamente Sano	SCCA
12	Clínicamente Sano	SCCA
13	Clínicamente Sano	SCCA
14	Clínicamente Sano	SCCA
15	Clínicamente Sano	SCCA
16	Clínicamente Sano	SCCA
17	Clínicamente Sano	SCCA
18	Clínicamente Sano	SCCA
19	Clínicamente Sano	SCCA
20	Clínicamente Sano	SCCA
21	Clínicamente Sano	SCCA
22	Clínicamente Sano	SCCA

Cuadro 4. Evaluación macroscópica de las diferentes técnicas de procesamiento histológico.

Procedimiento	Técnica de fijación	Evaluación física LSM	Evaluación macroscópica de las laminillas	Laminillas con nivel diagnóstico
1	LSM adherido al hueso	La estructura anatómica completa se conservó bien. Al corte con cuchillo los ligamentos se mostraron fibrosos y duros	No se obtuvieron cortes por el microtomo	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
2	Fijación sobre tabla	La estructura anatómica se conservó en buen estado	No se obtuvieron cortes por el microtomo	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
3	Formalina 10%	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	Las laminillas presentaron una calidad deficiente, debido a la presencia de artificios (mella, desgarros y contracciones de tejido) que imposibilitaron la evaluación microscópica	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
	Formalina 1%	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	Las laminillas presentaron calidad deficiente debido a la presencia de artificios	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
	Formalina 3%	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	Las laminillas presentaron calidad deficiente debido a la presencia de artificios	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
	Formalina 5%	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	Las laminillas presentaron calidad deficiente debido a la presencia de artificios	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
4	Schulz Key una semana	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	La presencia de artificios tales como, mella, falta de tejido y dobleces, no permitieron la evaluación microscópica de estas muestras	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
	Schulz Key dos semanas	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	La presencia de artificios no permitieron la evaluación al microscopio de estas muestras	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
	Glicerol 48 horas	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	La presencia de artificios no permitieron la evaluación al microscopio de estas muestras	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
5	Formalina 48 horas/PBS	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	Debido a la presencia de artificios se decidió no evaluar microscópicamente	No se obtuvieron laminillas con nivel diagnóstico
6	Formalina 24 horas/PBS	Se evaluó macroscópicamente y se dividió en fragmentos de 1 cm de grosor	Cortes de calidad para la evaluación microscópica del LSM procesado bajo esta técnica	Se obtuvieron cortes histopatológicos de calidad diagnóstica con las técnicas Hematoxilina & Eosina y Tricromica de Masson

Las laminillas con presencia de artificios leves tales como mellas, dobleces, discontinuidad de tejido, precipitados del fijador o colorantes que interfieren en la evaluación microscópica del tejido, no consiguen un nivel diagnóstico.

Cuadro 5. LSM procesados, números de cortes realizados y laminillas de calidad diagnósticas obtenidas.

Procedimiento	Técnica	Ligamentos procesados	Cortes con microtomo	Laminillas con nivel diagnóstico
1	LSM adherido al hueso	4	No se consiguieron	No se consiguieron
2	Fijación sobre tabla	4	No se consiguieron	No se consiguieron
3	Formalina 10%	4	5 segmentos por ligamento	No se consiguieron
	Formalina 1%	4	5 segmentos por ligamento	No se consiguieron
	Formalina 3%	4	5 segmentos por ligamento	No se consiguieron
	Formalina 5%	4	5 segmentos por ligamento	No se consiguieron
4	Schulz Key una semana	4	5 segmentos por ligamento	No se consiguieron
	Schulz Key dos semanas	4	5 segmentos por ligamento	No se consiguieron
	Glicerol 48 horas	4	5 segmentos por ligamento	No se consiguieron
5	Formalina 48/PBS	4	5 segmentos por ligamento	No se consiguieron
6	Formalina 24/PBS	4	10 segmentos por ligamento	20 laminillas con calidad diagnóstica teñidas con Hematoxilina & Eosina y con 20 Tricromica de Masson
Total		44	200	40

Con la técnica 6 procedimiento formalina 24/PBS, se obtuvieron 20 laminillas con calidad diagnóstica utilizando la tinción Hematoxilina & Eosina, en base a esto se decidió utilizar los mismos segmentos ya procesados para obtener laminillas con la técnica Tricromica de Masson, obteniendo 20 laminillas con calidad diagnóstica.

Procedimiento 1

Técnica: LSM adherido al hueso

Evaluación Macroscópica: La estructura anatómica completa se conservó bien. (Figura 29). Al corte con cuchillo los ligamentos se mostraron fibrosos y duros. Durante el corte con el microtomo no se pudieron realizar cortes debido al sobre/endurecimiento del tejido.



Figura 29. LSM después del procedimiento de fijación (14 días en formalina neutra al 10%), preparados para ser procesados.

Evaluación Microscópica: No se lograron cortes con el microtomo, por lo que el procesamiento no se terminó y no se realizó la evaluación microscópica.

Procedimiento 2

Técnica: Fijación sobre tabla

Evaluación macroscópica: La estructura anatómica se conservó en perfecto estado (Figura 30).



Figura 30. Ligamentos sujetos en tabla de madera, durante la fijación (formalina neutra al 10% durante 14 días).

Evaluación microscópica: El corte con el microtomo fue muy complicado, por lo que en todos los casos la secciones histológicas presentaron numerosos artificios, como grosor excesivo, dobleces, mellas. Por lo que no fue posible realizar una evaluación microscópica.

Procedimiento 3

Evaluación macroscópica: El ligamento se evaluó inmediatamente después de su obtención. Se realizaron cortes de un centímetro de grosor y se incluyeron en cápsulas para su procesamiento histológico. El corte al microtomo fue complicado pues, el proceso de fijación provocó un sobre endurecimiento del LSM dificultando su corte.

Las laminillas presentaron una calidad deficiente, con la presencia de artificios (mella, desgarros y dobleces) que imposibilitaron la evaluación microscópica. Se obtuvo buena afinidad con la tinción Hematoxilina & Eosina (Figura 31).

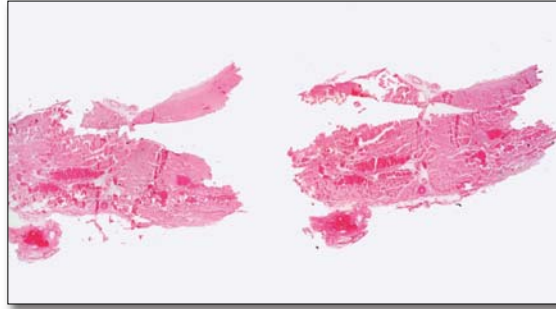


Figura 31. Fotografía preparado histológico de LSM en un corte longitudinal, teñida con Hematoxilina & Eosina se aprecia discontinuidad en el tejido, fracturas, dobleces y desprendimientos.

3.1 Técnica: Formalina 10%

Formalina al 10% durante 24 horas. (Figuras 32 y 33).

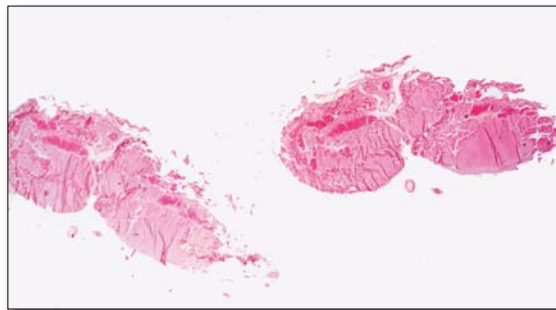


Figura 32. Fotografía preparado histológico de LSM en un corte longitudinal, teñido en Hematoxilina & Eosina. En la muestra encontramos discontinuidad de tejido, mella y dobleces.

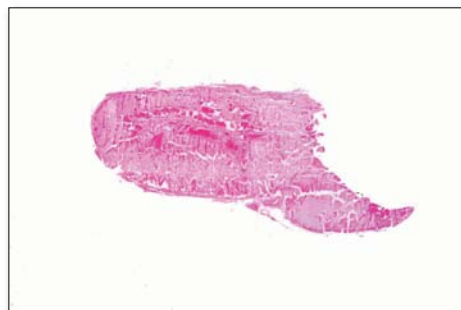


Figura 33. Fotografía preparado histológico de LSM en corte longitudinal, teñido con Hematoxilina & Eosina. El tejido se encuentra fragmentado y con zonas de desprendimiento.

Formalina al 1% durante 24 horas. (Figuras 34 y 35).



Figura 34. Fotografía de un corte longitudinal de LSM teñido con Hematoxilina & Eosina. El preparado histológico contiene un fragmento pobre de la muestra, el cual se encuentra severamente fragmentado.

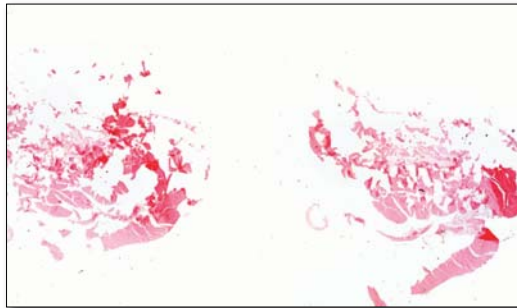


Figura 35. Fotografía de una laminilla de LSM teñida con Hematoxilina & Eosina. El tejido se encuentra tejido desprendido. El poco tejido que se aprecia se observa dañado.

3. 3 Técnica: Formalina 3%

Formalina al 3% durante 24 horas. (Figura 36 y 37).

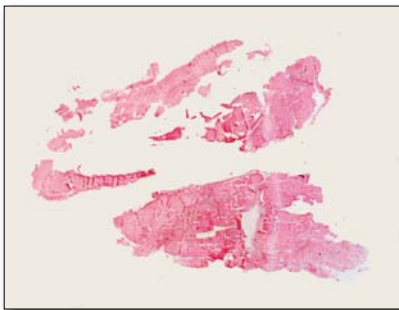


Figura 36. Fotografía de laminilla de LSM teñida con Hematoxilina & Eosina. En la muestra se encuentra tejido desprendido, mella, dobleces y fragmentación del tejido.



Figura 37. Fotografía de un corte longitudinal de LSM teñido con Hematoxilina & Eosina. El preparado histológico contiene dos fragmentos ambos se encuentra severamente dañados, presentan dobleces, pedazos de tejido desprendidos, y mella.

3.4 Técnica: Formalina 5%

Formalina al 5% durante 24 horas. (Figuras 38 y 39).



Figura 38. Fotografía de un corte longitudinal de LSM, procesado para histopatología teñido con Hematoxilina & Eosina. El preparado histológico se encuentra con dobleces y mella.

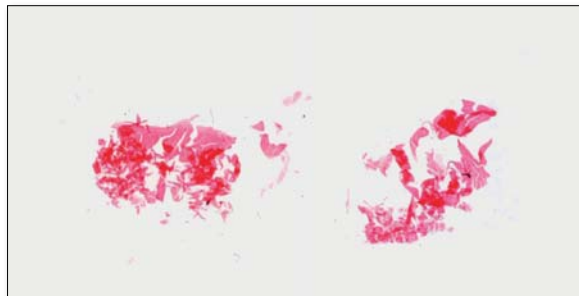


Figura 39. Fotografía de dos fragmentos de LSM procesados para histopatología. Ambos fragmentos se encuentra en pobre cantidad en la laminilla, con tejido desprendido, ambos inútiles para diagnóstico histopatológico.

Procedimiento 4

Evaluación Macroscópica: Las muestras ya incluidas en parafina, al ser cortadas por el microtomo, mostraron un sobre/endurecimiento, lo que imposibilitó la evaluación a nivel microscópico.

Las laminillas obtenidas tuvieron afinidad con las tinciones Hematoxilina & Eosina y Tricómica de Masson, sin embargo la presencia de artificios tales como; mella, falta de tejido, contracción de tejido y dobleces, no permitieron su evaluación al microscopio fotónico (Figura 40).

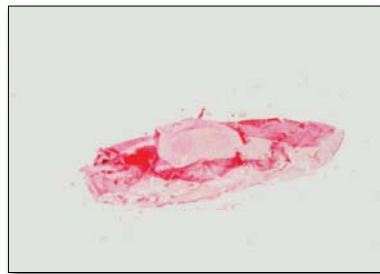


Figura 40. Fotografía de una muestra de LSM teñida con Hematoxilina & Eosina. Presenta dobleces, mella y tejido fragmentado.

4.1 Técnica: Schulz Key una semana

Solución Schulz Key durante una semana. (Figuras 41, 42).

(42)



Figura 41. Fotografía de un corte longitudinal de LSM, teñido con Hematoxilina & Eosina. El preparado histológico contiene tejido, el cual se encuentra severamente fragmentado.

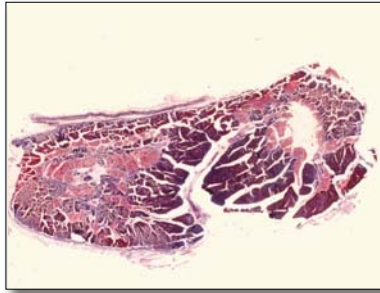


Figura 42. Fotografía de un corte longitudinal de LSM,. El preparado histológico, contiene un corte de tejido, el cual se encuentra severamente fragmentado.

4.2 Técnica: Schulz Key dos semanas

Solución Schulz Key durante dos semanas. (Figura 43 y 44).

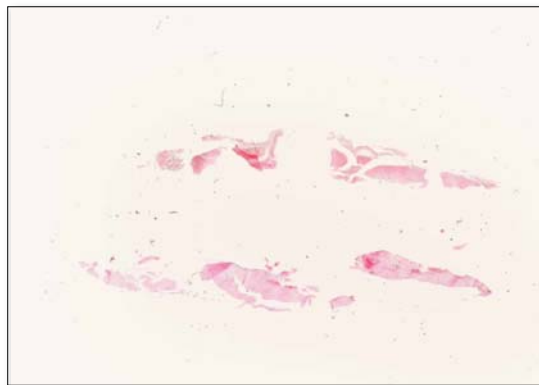


Figura 43 Fotografía de un corte longitudinal de LSM, teñido con Hematoxilina & Eosina. En el preparado histológico, apenas se aprecian fragmentos de LSM.

(43)

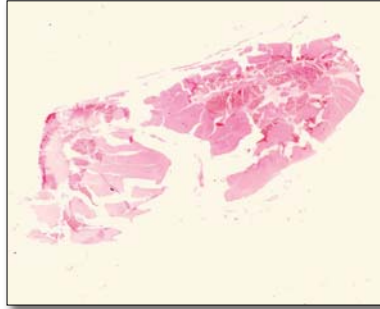


Figura 44. Fotografía de un corte longitudinal de LSM procesado para histopatología. Se observa con extensos fragmentos desprendidos.

4.3 Técnica: glicerol 48 horas

Formalina al 10 % con glicerol, durante 48 horas. (Figura 45, 46).

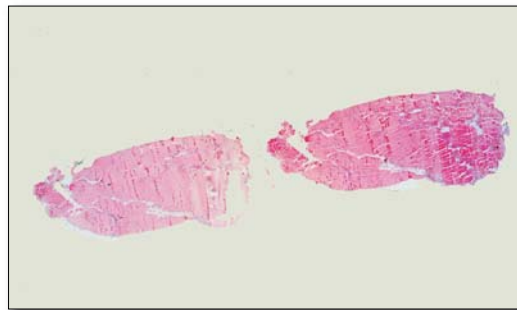


Figura 45. Fotografía de un corte longitudinal de LSM, teñido con Hematoxilina & Eosina. El preparado histológico, contiene dos fragmentos, en los cuales el tejido se encuentra con melladuras y dobleces.

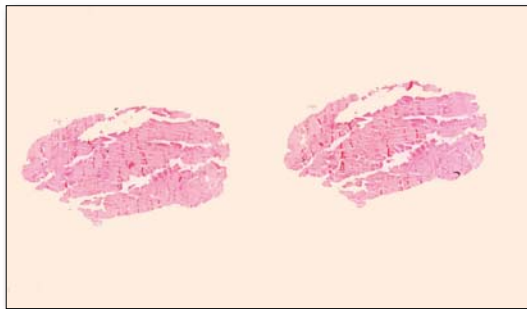


Figura 46. Fotografía de un corte longitudinal de LSM, procesado para histopatología teñido con Hematoxilina & Eosina. El preparado histológico, contiene dos fragmentos, en los cuales el tejido se encuentre con melladuras dobleces, fragmentado y con pedazos desprendidos.

Procedimiento 5

Evaluación Macroscópica: Para el procesamiento de LSM, se utilizaron cápsulas para la fijación. Después de ser incluidas en parafina, las muestras pasaron al micrótopo. Los cortes de tejido muestran artificios asociados a un sobre/endurecimiento.

Las muestras se tiñeron con Hematoxilina & Eosina teniendo afinidad con la tinción. Se evaluaron macroscópicamente y debido a la presencia de artificios, se decidió no evaluar por microscopía. (Figura 47).

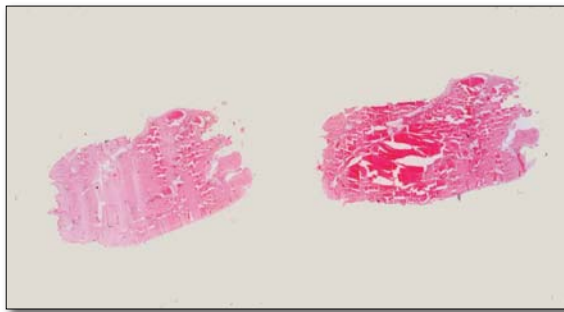


Figura 47. Fotografía de un corte longitudinal de LSM teñido con Hematoxilina & Eosina. El preparado histológico, contiene dos fragmentos, en los cuales el tejido se encuentra con mella, dobleces y severamente fragmentado.

Técnica: Formalina 48 horas/PBS

Formalina 10% durante 48 horas, cambio a PBS durante 24 horas (Figura 48 y 49).

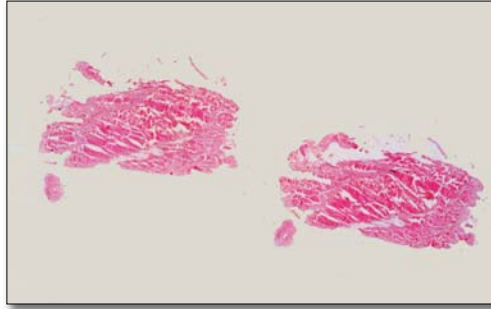


Figura 48. Fotografía de un corte longitudinal de LSM, teñido con Hematoxilina & Eosina. El preparado histológico, contiene dos fragmentos, en los cuales el tejido se encuentra severamente fraccionado.

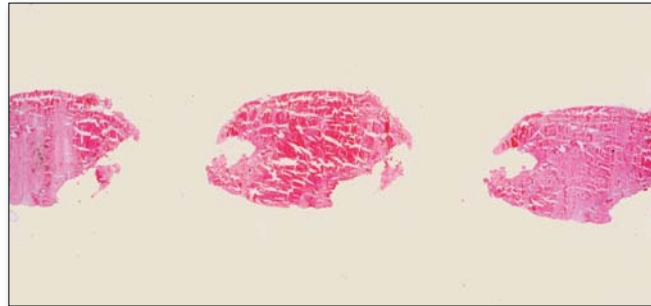


Figura 49. Fotografía de tres fragmentos que corresponde a corte longitudinal del LSM teñidos con Hematoxilina & Eosina. Muestran un tejido muy fragmentado que no es de utilidad diagnóstica.

Procedimiento 6

Evaluación Macroscópica: Los cortes histológicos ya teñidos con Hematoxilina & Eosina tuvieron buena afinidad a la tinción.

Evaluando la laminillas macroscópicamente se logran apreciar artificios propios del proceso de corte, como son dobleces y mella, pero estos artificios no son lo suficientemente perjudiciales por lo que se tomó la decisión de realizar la evaluación microscópica del LSM procesado bajo esta técnica (Figura 50).



Figura 50. Fotografía de un corte longitudinal del LSM, teñido con Hematoxilina & Eosina. El tejido presenta artificios como desprendimientos, fracturas, melladuras. Presenta zonas que no se ven afectadas por lo cual se puede realizar una evaluación microscópica.

Técnica: Formalina 24 horas/ PBS

Formalina 10% durante 24 horas, cambio a PBS durante 24 horas (Figuras 51 y 52).



Figura 51. Fotografía de dos fragmentos que corresponde al corte longitudinal del LSM. Teñidos con Hematoxilina & Eosina. Muestra un tejido con artificios pero puede ser de utilidad diagnóstica.

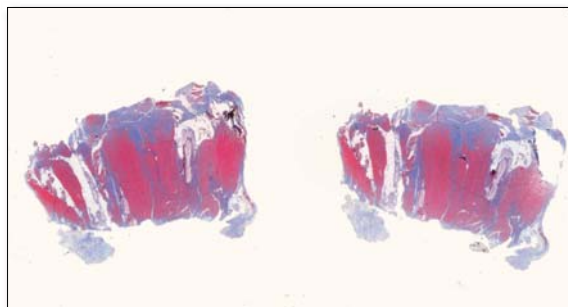


Figura 52. Fotografía de dos fragmentos que corresponde al corte longitudinal del LSM, teñidos con Tricrómica de Masson. Muestra un tejido con artificios pero puede ser de utilidad diagnóstica.

Evaluación Microscópica: Los preparados histológicos permiten diferenciar las estructuras histológicas del LSM, así como la definición de núcleos y citoplasma celular. La presencia de artificios leves tales como mellas, dobleces, discontinuidad de tejido, precipitados del fijador o colorantes, se presenta en las muestras, pero no interfieren en la evaluación microscópica del tejido (Figura 53 y 54).

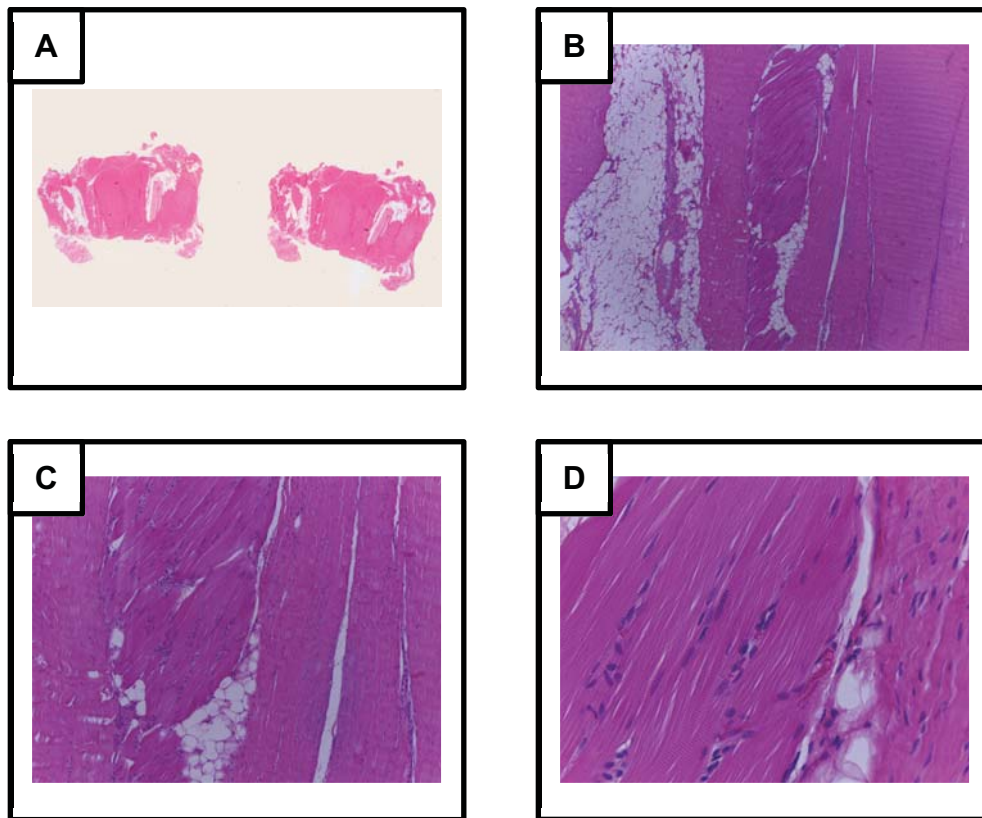


Figura 53. Corte longitudinal de LSM, teñido con Hematoxilina & Eosina. A) vista macroscópica de la laminilla con los cortes de LSM B) microfotografía del preparado histológico con un aumento 4x panorámico, C) microfotografía del LSM con un aumento 10x, D) microfotografía del preparado histológico con un aumento de 40x.

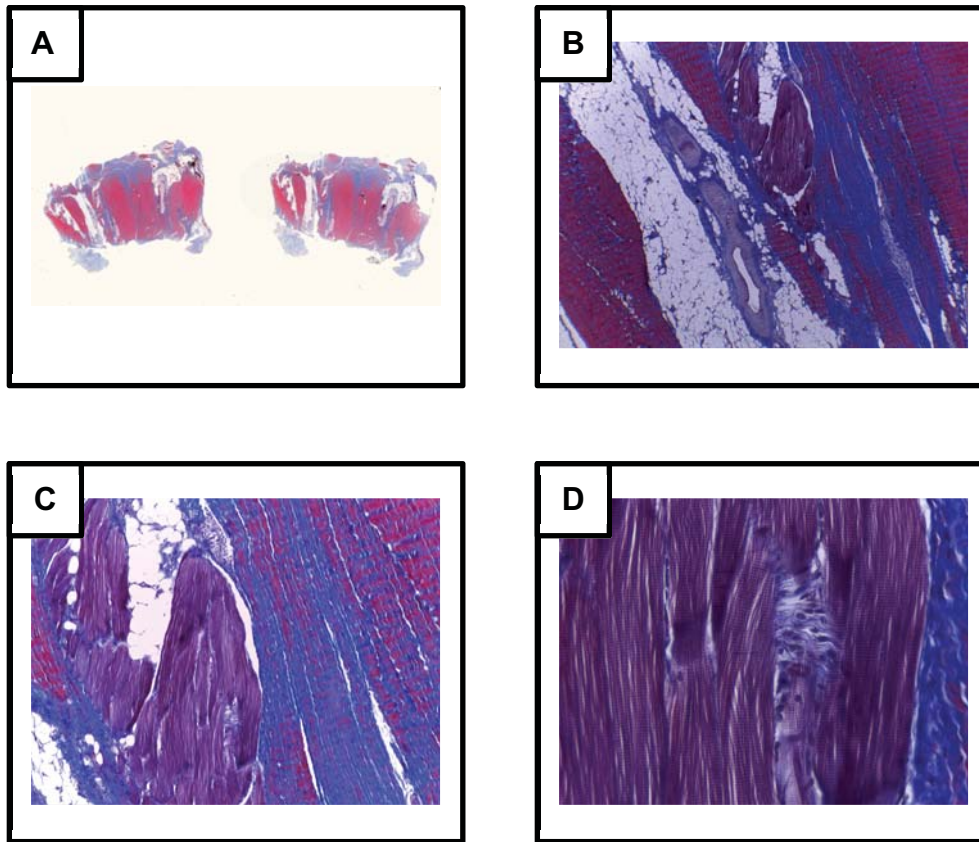


Figura 54. Corte longitudinal de LSM, teñido con Tricromica de Masson. A) vista macroscópica de laminillas con los cortes de LSM, B) microfotografía del preparado histológico con un aumento 4x panorámico, C) microfotografía del LSM con un aumento 10x, D) microfotografía del preparado histológico con un aumento de 40x.

Estadística

La hipótesis nula planteada (No hay diferencia en las laminillas conseguidas entre las técnicas de procesamiento histológico realizadas), fue rechazada utilizando la prueba de Ji cuadrada para las diferencias entre más de dos grupos. Se graficó el número de cortes obtenidos y las laminillas obtenidas con calidad diagnóstica con la tinción Hematoxilina & Eosina. En las dos primeras técnicas no se obtuvieron cortes al micrótopo; la única técnica con laminillas diagnósticas fue Formol 24h/PBS. (Figura 55).

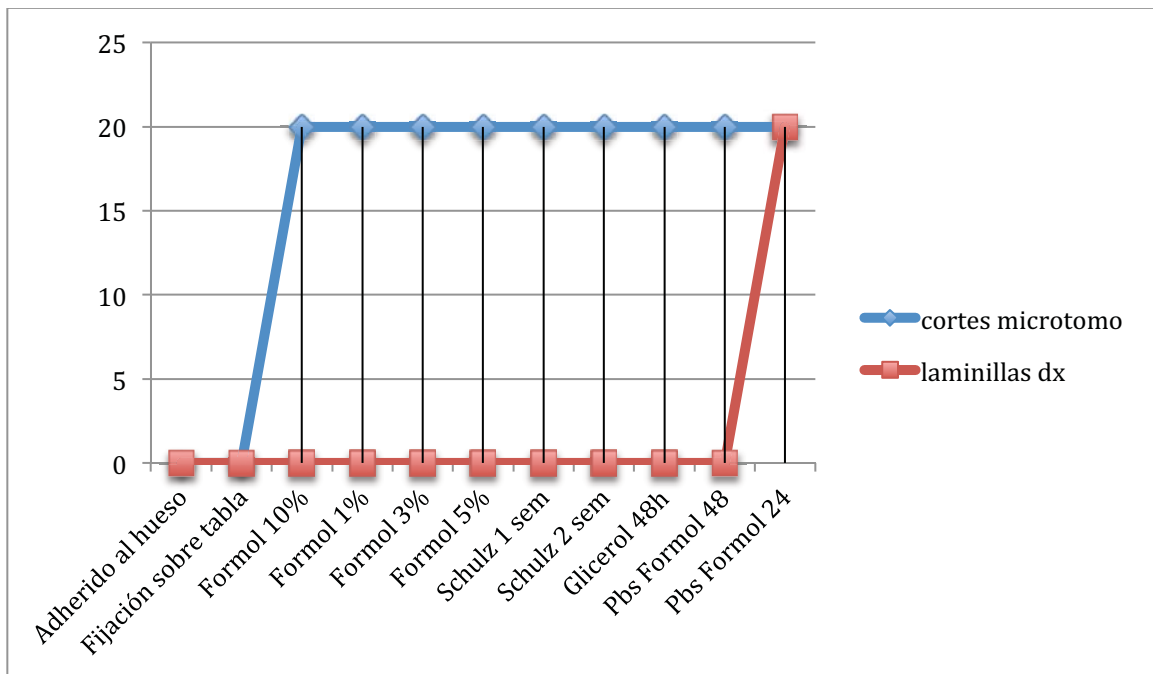


Figura 55 Cortes y laminillas diagnósticas obtenidas con las diferentes técnicas de fijación.

DISCUSIÓN

Se conocen como claudicaciones a las manifestaciones de cualquier alteración estructural o funcional de uno o más miembros o del dorso, observable durante la locomoción o la estación. Pueden estar causadas por traumatismo, anomalías congénitas o adquiridas, infecciones alteraciones metabólicas (circulatorias o nerviosas) y combinaciones de las anteriores (Cañet, Brouwer, Bois 2012).

Se trabajó con 22 caballos (44 LSM), ningún caballo de los seleccionados para el estudio presentó alteraciones clínicas significativas, signos de enfermedad o claudicación al examen del aparato locomotor. Los cortes histológicos obtenidos con los diferentes procedimientos realizados, fueron de caballos con miembros pélvicos sin evidencia a la inspección clínica de daños en el LSM, esto fue con la finalidad de que el LSM se encuentre sano y que las laminillas que consiguieron una calidad histopatológica diagnóstica sirvan como base para posteriores estudios acerca de la morfología de esta estructura. El LSM, del caballo, filogenéticamente representa el músculo interóseo medio de otros animales. En el caballo sufrió una evolución y se compone mayormente por una cantidad variable de tejido conectivo, con una cantidad variable de músculo (Cunningham, 1983, Wilson *et al* 1991). El LSM se describe como un ligamento debido a que es una estructura que tiene origen e inserción en hueso a diferencia de un tendón que generalmente conecta a un músculo con un hueso (Soffer , Hermason 2006).

No se realizaron métodos diagnósticos adicionales sobre el LSM, debido a que el objetivo es la calidad histopatológica diagnóstica y no estudiar a profundidad la morfología de esta estructura anatómica. Se menciona que la ultrasonografía, la resonancia magnética y la tomografía son métodos diagnósticos muy útiles en la evaluación del LSM con patologías. Para el examen del aspecto proximal del LSM el monitoreo de lesiones y durante la recuperación (Zauscher, Estrada, Edinger, Lischer 2012). Debido a que el objetivo del estudio es la obtención de cortes diagnósticos y no la evaluación morfológica la evaluación clínica y el examen locomotor resultan suficientes.

El traslado de las muestras desde el rastro hasta la sala de disección para comenzar con el procesamiento, se realizó con la mayor prontitud, nunca fue mayor a 4 horas, con el objeto que los cambios post mortem (autolisis y putrefacción) no se presenten. La obtención de la muestra es el primer paso del procesamiento histológico, es esencial procesar las muestras lo más pronto que fuese posible, con el fin de evitar la degeneración post mortem (Cediel, Cárdenaz, García, Chuaire 2009).

Los miembros fueron separados del cuerpo, a la altura de la articulación tibio tarsiana. Debido a que el LSM tiene su origen en el tercer hueso metatarsiano y algunas ramas tiene su origen en la fila distal del tarso (Köing, *et al* 2004).

Con la finalidad de procurar causar el mínimo daño a la estructura durante la manipulación las muestras fueron seccionadas con navajas de bisturí del numero

20. Es necesario disecar el tejido con instrumentos cortantes adecuados, evitando provocar compresión y aplastamiento que al final son causas de artificios durante el procesamiento de la muestra (Cediel *et al* 2009). Las secciones fueron obtenidas durante el procesamiento, de manera cuidadosa procurando evitar dañar la muestra.

Los procedimientos de fijación se realizaron en un cuarto con una temperatura de 20°C, en la mayoría de los métodos descritos la temperatura que se utiliza para fijar una muestra biológica se encuentra entre los 15 a 25°C, la difusión de las moléculas de formalina incrementa con la temperatura debido al movimiento más rápido. La mayoría de las reacciones químicas ocurren a mayor velocidad en temperaturas altas (Hopwood, 1985). No es recomendable trabajar con temperaturas mayores a 25°C ya que esta condición provoca alteraciones en el tejido durante su procesamiento (Baker 1970). El experimento se realizó durante los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre, en el Distrito Federal que presentó una temperatura promedio de 17°C en ese periodo (CONAGUA, 2015) (Cuadro 6).

Cuadro 10. Temperatura en el Distrito Federal durante la fase experimental

Temperatura Máxima Distrito Federal			
SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
23.5°C	22.6°C	23.1°C	21.3°C
Temperatura Media Distrito Federal			
18.6°C	17.3°C	16.8°C	15.2°C
Temperatura Mínima Distrito Federal			
13.7°C	12°C	10.5°C	9.2°C

Para el Procesamiento 1 utilizamos la referencia de (Wilson, Gordon, Pijarowski, Boero, Bardertsh 1991), en donde se reprodujo su técnica de fijación tal como se indica en la publicación en donde ellos trabajaron con el LSM, de 64 caballos (32 Standardbreds y 32 Thorugbreds), cortaron segmentos para el procesamiento de entre 3 a 5mm, tomando cuatro secciones del cuerpo y una sección de cada uno de las ramas de cada LSM. En el LSM en la porción proximal, encontramos mayor cantidad de músculo que la porción media y ramas (Souza, 2010), esto sugiere que durante la evolución del LSM este se comporta como un músculo en su origen y como un ligamento hacia distal (Shik, *et al* 2010). Esto puede explicar que nosotros al trabajar, la porción proximal con características histológicas diferentes al tercio medio y distal no conseguimos laminillas con calidad histopatológica diagnóstica empleando esta técnica como referencia.

Durante el procedimiento 2 se realizó la fijación del LSM por completo sin segmentarlo. Utilizando formalina al 10% durante 14 días y no se lograron obtener cortes por parte del microtomo pudiendo ser la causa que a diferencia de la literatura (Pauels, Schumacher 2009) en donde la infiltración fue realizada con metilmetacrilato y no con parafina como fue realizada en este trabajo.

Las técnicas de inclusión con metilmetacrilato son sugeridas para el procesamiento con microscopía electrónica o en el procesamiento de tejidos duros como el hueso. La inclusión en metilmetacrilato consiste brevemente en introducir la muestra en metilmetacrilato durante 24 horas a 4°C, para permitir que dicha sustancia se introduzca en todo el tejido pasa a una segunda inmersión en

metilmetacrilato a 32°C durante seis a siete días, en una estufa en donde se irá polimerizando y endureciendo paulatinamente (Peris, Prat, Comin, Dejoz, Roger 1993). Para los cortes histológicos de muestras en inclusión con metilmetacrilato, es necesario un aparato especial conocido como ultramicrotomo capaz de obtener cortes histológicos ultra finos (30-120 μm). En la actualidad muchos investigadores utilizan el metilmetacrilato como medio de inclusión ya que presenta ventajas frente a otras técnicas como su capacidad de infiltración en muestras de gran tamaño y su versatilidad en las tinciones con las que es compatible (Dieter, 1993). Se opto por utilizar parafina en lugar de metilmetacrilato, por ser el método de inclusión de rutina para microscopía óptica, tener un tiempo de procesamiento mas corto, ser mas económico, además de tener mayor disponibilidad de materiales y equipos.

Para el procedimiento 3, separamos el LSM del miembro y se seccionó en fragmentos de 1cm de grosor. Los cortes se realizaron con una navaja de bisturí del número 20 y fueron colocados en cápsulas de procesamiento histológico. Este procedimiento se realizó por comunicación personal (L. Romero entrevista personal, marzo 2014). El uso de cápsulas para procesamiento histológico facilita la tarea de procesamiento ya que permite que el agente fijador penetre por todos los lados de la muestra y facilita su identificación. Para conseguir una correcta fijación es conveniente que las muestras en estudio sean seccionadas durante la toma de muestras en fragmentos de cinco milímetros aproximadamente con el propósito de que el reactivo fijador alcance rápidamente las capas tisulares profundas (Dapson, 1993). Debido a esto tomamos cinco fragmentos de un cm de

grosor, a partir del origen del LSM, con la intención de abarcar la porción proximal del LSM, lo mejor posible y que estas muestras seccionadas pudieran ser penetradas correctamente por el agente fijador.

Durante el procedimiento 3, fueron probados diferentes concentraciones de formalina con el objetivo de encontrar una concentración que nos permita conseguir cortes histopatológicos diagnósticos. Las diferentes concentraciones de formalina y su efecto en los tejidos pueden ser medibles por varios criterios, uno de ellos es determinar el número de células por unidad de tejido, con cambios en la zona nuclear (Figura 57). En un estudio se demuestra el efecto de la formalina de acuerdo a su concentración. Se colocaron muestras de tejido (riñón de rata), en diferentes concentraciones de formalina (1, 2, 5, 10, 20, 40%). Se observó el efecto de la formalina sobre las estructuras nucleares y se conoció a que concentración la formalina provoca una mayor cantidad de zonas nucleares con cambios por unidad de tejido, demostrándose que a una concentración del 10%, la formalina logra una mayor acción sobre el tejido (Cecil 1985).

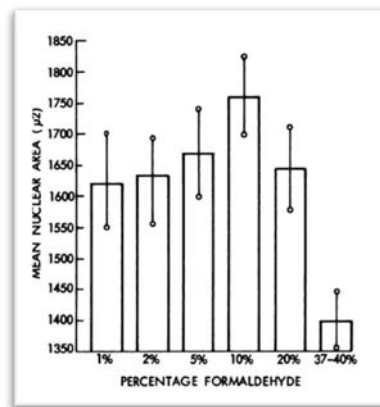


Figura 57. Segmentos de 1 cm de riñón de rata, fijados en formalina en concentración de 1,2, 5, 10, 20, 40 % por 24 horas.

Para el procedimiento 4 se utilizó glicerol con la intención de suavizar el LSM y permitir el corte por parte del microtomo, comunicación personal (John W. Hermason entrevista personal, marzo 2014). Se utilizó la solución Schulz Key que contiene glicerol al 70% como componente. Se utilizaron las soluciones con glicerol después de poner las muestras en una inmersión de formalina al 10% durante 24 horas.

La solución Schulz Key se compone de etanol, glicerina y agua (Anexo 1). La glicerina se utiliza como un agente fijador para la preservación y fijación de tejidos (Lillie, *et al* 1976). El etanol se puede ocupar como agente fijador con ciertas reservas, se debe utilizar junto con otros fijadores para potenciar su acción, debido a su pobre poder de penetración, por si solo es un mal fijador de núcleos y retrae excesivamente el tejido (Lillie, *et al* 1976). Los alcoholes son definidos como agentes fijadores, por si solos provocan una fijación deficiente para muestras procesadas en bloques de parafina (Suvarna, *et al* 2013). Una breve exposición en formalina, provoca una pobre inmovilización en las proteínas y la fijación, producida durante el procesamiento histológico es debido a los alcoholes empleados para deshidratar. Durante este trabajo utilizamos formalina para las diferentes técnicas de procesamiento histológico en donde las muestras permanecieron en el agente fijador durante 24 horas o más en todos los procedimientos.

La solución Schulz Key, tiene una acción de fijación lenta y efecto de conservación largo. No endurece las muestras lo suficiente para ser cortadas por congelación y

para su corte en parafina se necesita lavar cuatro horas en agua destilada (Armiñana, García 2008).

Las laminillas obtenidas con los protocolos donde utilizamos glicerina no tuvieron resultados favorables, las muestras obtenidas mostraban numerosos artificios, debidos a la dureza del LSM al corte por el microtomo.

En los procedimientos 5 y 6, se utilizaron la solución amortiguadora de fosfatos PBS, esta solución es usada con el objeto de mantener la osmolaridad de las células. Contiene iones de sal que equilibran la cantidad de iones en el interior de las células, tiene un efecto amortiguador de pH, que evita la desnaturalización de las proteínas (Suvana, *et al* 2013).

Durante el procesamiento 5, se utilizó el PBS por 24 horas después de haber pasado por formalina al 10%, 24 horas. Los resultados de esta técnica de fijación en el LSM fueron pobres. Las laminillas obtenidas presentaban numerosos artificios y la dureza del LSM dificultaba su corte por parte del microtomo.

En la técnica 6, se modificó por comunicación personal (Stacey Semovolos entrevista personal, marzo 2014), los ligamentos se fijaron en formalina al 10% durante 24 horas en lugar de 48 y se utilizó de nuevo la solución PBS durante 24 horas. Las laminillas obtenidas presentaron artificios y dificultad al corte por parte del microtomo. Pero a diferencia de todos los protocolos anteriores estas laminillas presentaban menor cantidad de artificios y se distinguían porciones significativas

de tejido sin daños por el procesamiento histológico y con una buena afinidad tintoreal. Con la tinción Hematoxilina & Eosina, se logró apreciar microscópicamente los componentes del LSM (Figura 58), los bloques de parafina posteriormente fueron procesados y teñidos con la técnica tricómica de masson, las laminillas obtenidas se evaluaron al microscopio óptico.

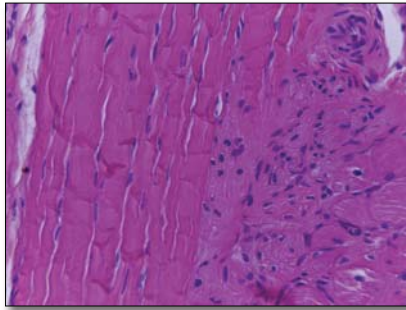


Figura 58. Microfotografía de LSM de miembro pélvico de un equino, teñido con la técnica de Hematoxilina & Eosina, visto con el microscopio óptico a 40X. Se aprecia tejido conectivo (fibras de colágeno) del lado izquierdo y del lado derecho se observa músculo estriado esquelético.

El LSM presenta una composición mixta de tejido, contiene esencialmente tejido conectivo con una cantidad variable de tejido muscular y tejido adiposo (Wilson, et al 1991). Con la tinción de Hematoxilina & Eosina se obtiene un buen contraste que permitió confirmar la presencia de fibras musculares adyacentes a vasos sanguíneos y nervios (Shik, *et al* 2013) (Figura 59).

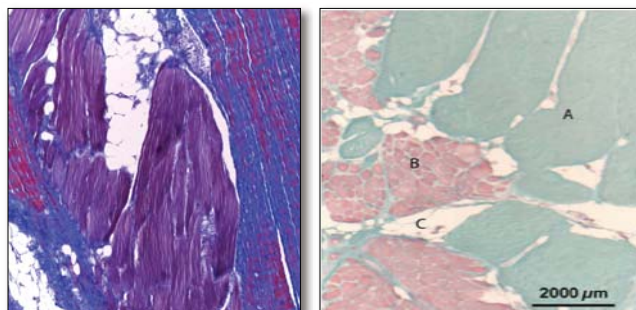


Figura 59. Lado izquierdo, microfotografía a un aumento de 10X, obtenida con el procedimiento 6, de un LSM de miembro pélvico equino teñido con Tricrómica de Masson. Lado derecho, microfotografía de LSM de equino procesado por (Shik *et al* 2013) con la misma tinción.

En los tendones las fibras de colágeno se disponen en un estricto patrón paralelo, mientras que en los ligamentos están dispuestos de una manera más al irregular. En este contexto el LSM es una estructura especial ya que no es ni ligamento ni tendón. La aparición de fibras musculares, predominantemente de tipo I, en diferentes partes del LSM varía entre razas y regiones del ligamento, así como entre miembros anteriores y posteriores (Wilson 1991; Toth 2008) (Figura 60).

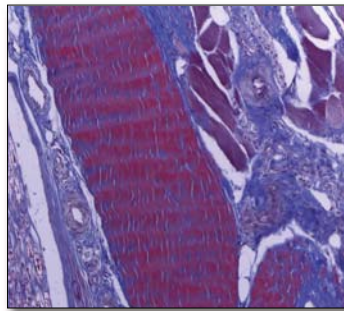


Figura 60. Microfotografía a un aumento 4x de tejido muscular en un corte longitudinal del LSM. En una laminilla obtenida por el procedimiento 6 teñida con tricrómica de Masson.

El procedimiento 6, permite identificar estructuras morfológicas reportadas en la literatura acerca del LSM, tales como son la presencia de tejido conectivo, tejido muscular en patrones diversos, vasos sanguíneos, nervios y tejido adiposo. Esta técnica con las tinciones Hematoxilina & Eosina y Tricromica de Masson nos otorga laminillas con la calidad suficiente para realizar un diagnóstico histopatológico.

Las secciones delgadas o “cortes” se obtienen utilizando instrumentos mecánicos diseñados para que en forma más o menos automática, seccionan el bloque de

parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. Los instrumentos se denominan Las secciones delgadas o “cortes” se obtienen utilizando instrumentos mecánicos diseñados para que en forma más o menos automática, seccionan el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. Los instrumentos se denominan micrótomos. Se utilizo un microtomo Leica modelo RM2125 RTS de rotación. Los modelos de rotación tipo minot o los deslizamiento están diseñados para utilizarse en muestras incluidas en parafina (Suvarna, *et al* 2013).

Los problemas en la obtención de cortes a partir de bloques de parafina; en general derivan de la mala orientación de la cuchilla o su mal afilado. Los problemas en el corte también pueden tener origen en defectos en la inclusión o en la dureza del material. El uso de cuchillas desechables ha facilitado la labor para cortar tejidos (Suvarna, *et al* 2013). En el caso de las muestras en las que se utilizó PBS después de la fijación, modificaron su dureza lo que permitió obtener mejores cortes por parte del microtomo.

Las navajas o cuchillas de microtomía requieren de un afilado y un asentado muy cuidadoso, pues el mantenimiento del filo en ellas depende el que se obtengan con éxito buenos cortes. Dentro de los artificios provocados durante la microtomía encontramos muescas; por irregularidades en el filo de la cuchilla, arrugas y pliegues al realizar el montaje y no extender los cortes de manera correcta (Suvarna, *et al* 2013) (Figura 61).

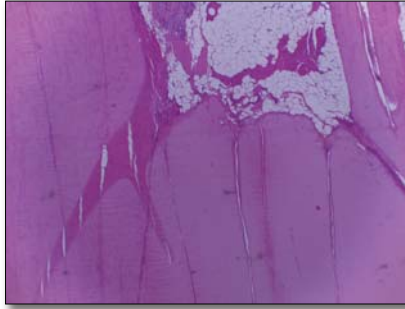


Figura 61. LSM visto a 4x presenta artificios provocados con la cuchilla. Procedimiento 6.

Se realizó como tinción complementaria la técnica Tricromica de Masson ya que nos permite diferenciar las fibras de colágena del tejido muscular. En el tejido conjuntivo se identifican varios elementos: músculo liso, estriado, eritrocitos, fibras y otros tipos celulares. En las fibras de tejido conectivo se identifican cerca de 20 tipos diferentes de colégena, reconocidas por su secuencia de aminoácidos y sus propiedades físicas e inmunológicas.). Dentro de las metodologías de identificación de las fibras de colágena, destacan las técnicas Tricrómicas (tres colores), en las que las fibras de colágena se tiñen de rosa a púrpura, las estructuras citoplasmáticas, queratina, fibras musculares y fibras intercelulares de rojo y los núcleos negro o de púrpura (Figura 62) (Samuelson, 2007).

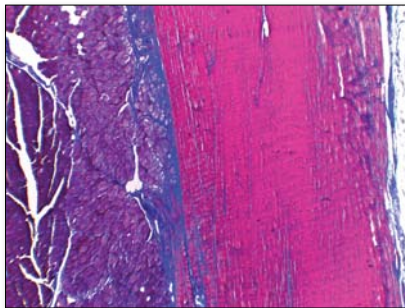


Figura 61. LSM Microfotografía del LSM obtenida con el procedimiento 6, teñido con tricrómica de Masson.

CONCLUSIONES

La solución de fosfatos amortiguadora (PBS), logró tener un efecto positivo durante el procesamiento del LSM, logró suavizar el tejido facilitando el corte por parte del microtomo. Para el procesamiento histopatológico de LSM, la técnica de fijación con formalina al 10% durante 24 horas y posterior pasarlo en la solución PBS durante 24 horas, permite conseguir cortes histológicos de muestras incluídas en parafina de calidad diagnóstica con las tinciones Hematoxilina & Eosina y Tricómica de Masson.

Durante el procesamiento de muestras histológicas es necesario seccionar las muestras en fragmentos pequeños que permitan que los agentes fijadores penetren con mayor facilidad y logren una correcta fijación. El uso de cápsulas para procesamiento histológico, no solo facilita la penetración del agente fijador, también permite una identificar con mayor facilidad las muestras.

En el procesamiento de muestras para histología no podemos hablar de técnicas de fijación universales, mucho menos de un fijador o solución para fijación universal. Los procedimientos óptimos para obtener resultados deseados solo se consiguen mediante el ensayo de los diferentes procedimientos consultados en la literatura. Cada investigador tiene a la mano diferentes herramientas y factores que pueden alterar los resultados. Por eso, para el desarrollo de cualquier técnica en histopatología es necesario conocer las circunstancias en donde se realizará el estudio y poder comparar con las de las diferentes técnicas consultadas.

REFERENCIAS

1. Holdennes, Roddmam. (1993). *Guía completa del caballo*. Barcelona España: BLUME
2. Rodríguez, A. Raygoza, M. (2013). *Metodología Diagnóstica Veterinaria*, Capítulo 3 México D.F: UNAM
3. Butendick, E. (1982). *Anatomía de la mano y el pie del equino y algunas consideraciones clínicas*, Valdivia Chile: Jornadas Clínicas Podopatología
4. Hogson, D.R., Harrington, K., McGoman, C.M. (2014). *The athletic horses principles and practices of equine sport medicine* (2da ed.). St Louis Missouri: Elsevier
5. Thorpe, C.T., Clegg P.D., Birch, H. (2010). "A review of tendon injury: why is the equine superficial digital tendon most risk?". *Equine Veterinary Journal*, 42(2), 147-80
6. Meierhenry, B. (2007). *Suspensory ligament injuries in horses*. Center for the equine health, school of veterinary medicine University of California Davis. California E.U.A: Prensa Académica

7. Toth, F., Schumacher, J., Schramme, M., Aldair, H.S., Donell R.L. (2008).
“*Compressive damage to the deep branch of the lateral plantar nerve associated with lameness caused by proximal suspensory desmitis*”.
Veterinary Surgery, 37(4), 328-35
8. Nomenclatura Anatómica Veterinaria. (2012). *Et Nomina Histologica revised Et Nomina Embriologica veterinaria international* (2da ed.). Ithaca E.U.A: Committee of Veterinary Anatomical Nomenclature. World Association Veterinary Anatomist
9. König, E.H., Liebich H.G. (2004). *Anatomía de los mamíferos domésticos: texto y atlas* (2da ed.). Buenos Aires Argentina: Panamericana
10. Gary, M. (2011). *Adams and Stashak's Lamenesses in Horses*, (6a ed.). Iowa E.U.A: John Wiley and sons
11. Dyson, S. Murray, R. (2011). “*Management of hind limb proximal suspensory desmopathy by neurectomy of the deep branch of the lateral plantar nerve and plantar fasciotomy: 155 horses (2003-2008)*”. Equine Veterinary Journal, 44 (3), 361-367
12. Schaller, O. (1996). *Nomenclatura veterinaria ilustrada*. España : Acribia

13. Pool, R., Meagher. (1990). *Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries*. Veterinary Clin North Am Equine Pract 6, 1-130
14. Juqueira, L.C., Carneiro, J. (2006). *Histología Básica*. (6a ed.). México D.F: Elsevier.
15. Jeffrey, K. (2010). *Functional histology*. (2da ed.). Australia: Mosby Elsevier
16. Dyson, S. (2006). *Diagnosis of proximal suspensory desmitis in the forelimb and hindlimb*. In *Management of Lameness Causes in Sport Horses: Muscle, Tendon, Joint and Bone Disorders*. Cambridge, U.K: Wageningen Academic Publishers
17. Banks, W.J. (1996). *Histología Veterinaria Aplicada* (2da ed.). México D.F: Manual Moderno
18. Batson, E.L., Paramour, R.J., Smith, T.J., Birch, H.L., Patterson-Kane, J.C., Goodship, A.E. (2003). "Are the material properties and matrix composition of equine flexor and extensor tendons determined by their functions?". Equine Veterinary Journal. 35, 314-318
19. Ross, M. (2011). *Histología (Texto y atlas a color) con biología celular y molecular* (6a ed.). Buenos Aires Argentina: Panamericana

20. Dieter, H. (1993). *Histología Veterinaria* (2da ed.). España: Acribia
21. Shikh M.K., Antonie, N. Priet, J., Moula, N., Busoni, V., Denoix, J.M., Gabriel, A. (2013). "*Mophometric analyse of the body and branches of the normal third interosseus muscle (suspensory ligament) in standarbreeds*". *Journal Veterinary Medicine*. 42(6), 461-70
22. Souza, M.V., Van Werren, P.R., Van Schie, H.T.M., Van De Lest, H.A. (2010). "*Regional difference in biochemical biomechannical and histomorphological characteristics of the equine suspensory ligament*". *Equine Veterinary Journal*. 42 (7), 611-620
23. Soffler, C, Hermason, J.W. (2006). "*Muscular design in the equine interosseous muscle*". *Journal of morphology*. (6) 696-704
24. Prophet, E.B., Mills, B., Jacquelyn, B.A., Leslie, H.B. (1995). *Métodos Histotecnológicos* . Washington E.U.A: ARP/AFIP
25. Barry, S., Mitchel, S.P. (2009). *Histology and illustrated color text*. México D.F: ELSEVIER
26. Samuelson, D.A. (2007). *Texbook of veterinary Histology*. México D.F: ELSEVIER Saunders

27. Gennerser, F. (2000). *Histología sobre bases moleculares* (3ª ed.). Buenos Aires Argentina: Panamericana
28. Martoja, R., Martoja-Pierson, M., Leland, C.G. (1970). *Técnicas de histología animal*. Barcelona España: Toray-Masson
29. Cecil, H. Fox, F.B., Johnson, J.W., Peter, P.R. (1985). "Formaldehyde fixation". *The journal of Histochemistry*, (33), 845-853
30. Suvarna, S.K., Layton, C., Bancroft, J.D. (2013). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (7a ed.). U.K: Elsevier
31. Cunningham, D.J (1983). "The development of the suspensory ligament of the fetlock in the foetal". *Journal Ana Physiology*. (18) 1-28
32. Cormack, D. (2001). *Essential histology* (2ª ed.). Philadelphia E.U.A: Lippicott Willians a Wilkins
33. Dolores, J.S. (2007). *Prácticas de histología*. México D.F: Editorial Alfil
34. Speirs, V.C. (1997). *Clinical Examination of Horses*. Philadelphia, E.U.A: Saunders

35. Cañet, A., Brouwer, E.D., Bois, N. (2012). *Deporte sano: control del dopaje en el caballo de deporte. Deontología Veterinaria*. España: Prensa Académica
36. Zuascher, J.M., Estrada, R., Edinger, J., Lischer, C.J. (2012). “*The proximal aspect of the suspensory ligament in the horse: How precise are ultrasonographic measurements?*”. *Equine Veterinary Journal*. (10), 2042-3306
37. Cediell, J.F., Cárdenas, M.H., García, A., Chuaire. (2009). *Manual de Histología tejidos fundamentales*. Bogotá Colombia: Universidad Rosario
38. México. CONAGUA. (2015). Resúmenes Mensuales (consulta de tabla nacional por entidad federativa). Distrito Federal.
39. Wilson, D. A., Gordon, J.B., Pijanowski, G.J., Boero, M.J., Badertscher, R.R. (1991). “*Composition and morphologic features of the interosseous muscle in Standardbreds and Thoroughbred*”. *American Journal Veterinary Reserch*. (52), 133-139
40. Lillie, R.D., Fullmer, H.M. (1976). *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry* (4ta ed.). New York: McGraw-Hill

41. Drury, R.A.B., Wallington, E.A. (1980). *Carleton's Histological Technique*. (5ta ed.). Oxford:University Press
42. Baker, J.R. (1958). *Principles of Biological Microtechnique* (Reprinted 1970, with corrections). London: Methuen
43. Pauwels, Schumacher, J. (2009). "Neurectomy of the deep branch of the lateral plantar nerve can cause neurogenic atrophy of the muscle fibers in the proximal part of the suspensory ligament". *Equine Veterinary Journal*. (5), 508-510
44. Peris, J.L., Prat, M., Comin, R.,Dejoz, I., Roger, I. (1993). *Técnica histológica para la inclusión en metil-metacrilato de muestras óseas no descalcificadas*. *Revista Esp. Cir Osteoart.* (28), 231-238
45. Dapson, R.W. (1993). "Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments". *Biotechnic & Histochemistry*. (68), 75-82
46. Armiñana, J.R., García, F, (2008). *Técnicas de Histología Vegetal*. Valencia España: Universidad Politécnica de Valencia
47. Montalvo, C.E. (2010). *Técnica Histológica*. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México

48. Gavilán, I (2012). *Guía Técnica de acción para residuos químicos* Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química Hoja de seguridad. <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf> [Cited Febrero 2015]
49. Adilson, B., Yara, J.K., Araújo., Denis, P. L. (2011). “*Glycerol: A brief history and their application in stereoselective syntheses*”. *Quim. Nova.* (34), 306-319

ANEXO 1 SOLUCIONES FIJADORAS

Formaldehído

Es un vapor que cuando se encuentra completamente disuelto en agua, forma una solución con una concentración de 37-40%. La solución acuosa de formaldehído es conocida como formalina. La formalina al 10% amortiguada es el agente fijador más comúnmente usado en histopatología (Cecil *et al*, 1985)

Se presenta como un líquido claro, incoloro, que emite vapores sumamente irritantes para las conjuntivas y la mucosa respiratoria. Su acción fijadora se ejerce coagulando las proteínas. Es un fijador que posee un buen poder de penetración y difusión. Mantiene de manera adecuada la estructura y facilita la coloración posterior de los componentes celulares y tisulares (Suvarna, *et al* 2013, Cecil *et al*, 1985)

Formalina amortiguada

Es una solución compuesta de una parte de formaldehído (37-40%) por nueve de agua destilada, más 4.0 gramos de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) y 6.5 gramos de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) por cada 1000 ml de solución. Suele emplearse como fijador de rutina, al igual que la formalina al 10%. Posee un pH de 6.8 a 7 aproximadamente (Montalvo, 2010).

Schultz Key

La solución Schulz Key se compone de etanol al 96%, glicerina al 70% y agua en una proporción de 3: 1: 1. La glicerina se utiliza como un agente fijador para la preservación y fijación de tejidos (Lillie, *et al* 1976).

Etanol

Formula: C_2H_6O , CH_3CH_2OH . Peso molecular: 46.07 g/mol. Composición: C: 52.24 %; H: 13.13 % y O: 34.73 %.

El etanol es un líquido incoloro, volátil, con un olor característico y sabor picante. También se conoce como alcohol etílico. Fija por deshidratación, es un buen elemento para preservar moléculas, como ciertas enzimas, propiedades antigénicas, glucógeno, pigmentos. Debido a que deshidrata a la vez que fija se puede usar como conservador de las muestras. Con el inconveniente de la retracción de tejidos (Gavilán, 2012).

Glicerina

Glicerina. También conocido como glicerol, líquido incoloro y espeso que forma la base de la composición de los lípidos. Es un compuesto alcohólico con tres grupos -OH (hidroxilos). Químicamente es un tri-alcohol con tres carbonos con sistémico (IUPAC) 1,2, 3-propanotriol (Adilson, Yara, Araújo, Denis 2011).

Solución amortiguadora de fosfatos.

La solución amortiguadora de fosfatos (por sus siglas en inglés PBS, phosphate buffered saline) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio y, en algunas formulaciones, con Fosfato de Potasio. Esta solución es isotónica y no-tóxica para las células de los mamíferos. El PBS se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal (Suvarna, *et al* 2013).

ANEXO 2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS HISTOLÓGICAS

(Utilizado en el departamento de patología FMVZ-UNAM).

En la sala de corte y almacén, los fragmentos de tejido destinados para su estudio histopatológico son cortados e incluidos en cápsulas de plástico con rejillas.

Las cápsulas identificadas, son colocadas según corresponda, en uno de dos frascos de vidrio con formalina al 10% los cuales están rotulados como biopsias y necropsias. Los frascos con cápsulas son trasladados al laboratorio de histopatología. Las cápsulas son colocadas en el procesador de tejidos (histoquinette) los cuales se procesan durante 24 horas. Dicho proceso consiste en el paso de los tejidos por diferentes soluciones con el objeto de fijar, deshidratar, aclarar, e impregnar de parafina.

Procesamiento de tejidos en el histoquinette

1. Formalina 10%, 2 h (fijación)
2. Alcohol 70%, 2 h (deshidratación)
3. Alcohol 80%, 2 h (deshidratación)
4. Alcohol 96%, 2 h (deshidratación)
5. Alcohol 96%, 2 h (deshidratación)
6. Alcohol 96%, 2 h (deshidratación)
7. Alcohol absoluto, 2 h (deshidratación)

8. Benceno (50%) - alcohol absoluto (50%), 2 h (deshidratación y aclaración)
9. Benceno, 2 h (aclaración)
10. Benceno, 2 h (aclaración)
11. Parafina a 56° C - 63° C, 2 h (infiltración)
12. Parafina a 56° C - 63° C, 2 h (infiltración)

Las cápsulas son retiradas del procesador y los tejidos son extraídos de éstas para ser incluidos en paneles de aluminio a los cuales se agrega parafina líquida. Posteriormente, se deja solidificar la parafina para formar bloques con tejidos incluidos. Para mayor endurecimiento, los bloques son colocados en un congelador por 20 minutos a 2° C bajo cero.

Los bloques de parafina se colocan en un microtomo y son rebajados hasta exponer la superficie de corte total del tejido. Posteriormente se realizan los cortes del tejido a un grosor de 4 µm.

Los cortes son colocados y extendidos en un baño de flotación que contiene agua de la llave (llenar el recipiente) con 5-7 gramos de gelatina bacteriológica (adhesivo), que está a una temperatura entre 62° C y 64° C.

Los cortes se montan en portaobjetos (laminillas de vidrio), la laminilla se identifica con un lápiz diamante (número de biopsia o necropsia asignado) y se deja escurrir para eliminar el exceso de agua.

(76)

Para desparafinar los tejidos, las laminillas se colocan en una platina a una temperatura entre 46-50° C.

Las laminillas son colocadas en canastillas de metal para su tinción de rutina con la técnica de Hematoxilina/Eosina.

Una vez teñidos, los tejidos son cubiertos con resina sintética y cubreobjetos.

Las laminillas son nuevamente identificadas en uno de sus extremos con tinta indeleble de acuerdo al número de caso asignado durante el registro de la muestra.

ANEXO 3 TINCIONES

TÉCNICA DE HEMATOXILINA & EOSINA:

1. Fijación en formalina al 10% amortiguada a pH de 7.2 durante 15 minutos.
2. Lavarse en agua de la llave 2 pases y 2 cambios.
3. Teñirse con hematoxilina de 3-5 minutos.
4. Lavarse en agua de la llave 2 pases y 2 cambios.
5. Sumergirse en alcohol ácido al 1% 1 pase.
6. Lavarse en agua de la llave 2 pases y 2 cambios.
7. Sumergirse en agua amoniacal al 1% 1-3 pases.
8. Lavarse en agua de la llave 2 pases y 2 cambios.
9. Teñirse con eosina 2 minutos.
10. Deshidratarse con etanol, 70, 80, 96, etanol absoluto, etanol absoluto-xilol y xilol 10 pases en cada uno.

Colocar resina sintética y cubreobjetos sobre la muestra que se encuentra en el portaobjetos.

Las características tintoreales que presentarán las células son núcleos acidófilos de color morado o azul y el citoplasma será de color basofílico, o sea, rosa.

TINCIÓN DE TRICRÓMICA DE MASSON

La tinción de Masson es otro método tricrómico de uso general, en que las fibras de colágena se tiñen de azul, las estructuras citoplasmáticas, queratina, fibras musculares y fibras intercelulares de rojo y los núcleos negro o de púrpura.

1. Fijar con formalina durante 15 minutos.
2. Se agrega el mordente de Bouin por una hora a 56° C o durante toda la noche a temperatura ambiente.
3. Se lava con agua de la llave hasta que se quite el color amarillo.
4. Se agrega la hematoxilina de Weigert por 10 minutos.
5. Enjuaga con agua de la llave 10 pases.
6. Se agrega la Fuchsina ácida de Biebrich scarlet por 2 minutos.
7. Lavar en agua corriente 10 pases.
8. Se agrega la solución de ácido fosfomolibdico y fosfotungstico por 15 minutos.
9. Se coloca la solución de azul anilina por 5 minutos.
10. Lavar con agua de la llave.
11. Agregar solución de ácido acético glacial por 1 minuto.
12. Deshidratar con etanol 96, etanol absoluto y xilol.
13. Colocar resina sintética y cubreobjetos sobre la muestra que se encuentra en el portaobjetos.

ANEXO 4 EXAMEN FÍSICO GENERAL Y EXAMEN DEL APARATO LOCOMOTOR.

Cuadro 1. Examen Físico General. Temperatura grados centígrados (°C), pulso fuerte, lleno y correspondiente (FLLC), frecuencia cardíaca (FC), latidos por minuto (LPM), frecuencia respiratoria medida en respiraciones por minuto (RPM), pulso digital normal (no es perceptible durante la palpación de los miembros, sonidos intestinales izquierdo (I) y derecho (D), (dorsal/ventral), normales 3 a 4 movimientos por minuto (++) , aumentados (+++), disminuidos (+-), ausentes(--).

CABALLO	TEMPERATURA	PULSO/ FC	F.RESPIRATORIA	PULSO DIGITAL	SONIDOS INTESTINALES
CABALLO 1	37.5°C	FLLC/34 LPM	12 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 2	37.5°C	FLLC/32 LPM	10 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 3	37°C	FLLC/30 LPM	10 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 4	38.5°C	FLLC/28 LPM	12 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 5	37°C	FLLC/35 LPM	12 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 6	37.5°C	FLLC/38 LPM	16 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 7	38.2°C	FLLC/30 LPM	10 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 8	38.5°C	FLLC/30 LPM	10 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 9	38.2°C	FLLC/32 LPM	12 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 10	37.5°C	FLLC/32 LPM	10 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 11	37°C	FLLC/38 LPM	16 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 12	38°C	FLLC/40 LPM	18 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 13	38.5°C	FLLC/32 LPM	12 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 14	38°C	FLLC/40 LPM	20 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 15	38°C	FLLC/38 LPM	18 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 16	37.5°C	FLLC/44 LPM	22 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 17	37°C	FLLC/36 LPM	16 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 18	37°C	FLLC/30 LPM	10 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 19	38°C	FLLC/32 LPM	12 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 20	37.5°C	FLLC/30 LPM	12 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 21	37°C	FLLC/32 LPM	10 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)
CABALLO 22	38°C	FLLC/36 LPM	12 RPM	NORMAL	I: (++/++) D: (++/++)

Cuadro 2. Examen del aparato locomotor. Estática; Evaluación de estructuras adyacentes al LSM (región palmar de la caña) palpación de metatarsos, buscando dolor y anomalías cerca del ligamento suspensor del menudillo (LSM). Dinámica: evaluación visual de la región palmar de la caña de los caballo al paso. Casco: manipulación y evaluación visual y pinzado del casco, buscando. SCCA (Sin cambios clínicos aparentes).

CABALLO	ESTÁTICA	DINÁMICA	CASCO
CABALLO 1	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 2	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 3	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 4	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 5	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 6	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 7	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 8	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 9	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 10	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 11	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 12	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 13	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 14	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 15	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 16	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 17	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 18	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 19	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 20	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 21	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA
CABALLO 22	SCCA	Claudicación no evidente al paso	SCCA

ANEXO 5 DISECCIÓN DEL MIEMBRO PÉLVICO PARA OBTENER EL LIGAMENTO SUSPENSOR DEL MENUDILLO.

1. Los especímenes de miembro pélvico de caballo son desarticulados a nivel de la articulación tibio tarsiana.
2. Los miembros pélvicos se mojan en su totalidad.
3. Con un cuchillo de necropsia se realiza un corte a todo lo largo del espécimen de proximal hacia distal en el borde dorso lateral, procurando solo cortar piel.
4. Se retira la piel del espécimen por completo, dejando expuesta las estructuras anatómicas.
5. Se identifican los tendones flexores digitales superficial y profundo. Ya identificados se sujetan y se separan con un corte colocando el cuchillo entre los tendones flexores y el ligamento suspensor del menudillo, desde los mas proximal del espécimen hasta la articulación interfalángica proximal.
6. En la articulación interfalángica proximal se continua el corte separando los tendones flexores cortando el ligamento anular dejando expuesto los ligamentos sesamoideos distales y las ramas del ligamento suspensor del menudillo.
7. Se cortan las ramas del ligamento suspensor lo mas distalmente posible.
8. Ya cortadas las ramas se toma el cuerpo ligamento suspensor del menudillo y con un cuchillo se separa del hueso desde el menudillo hasta su origen.
9. Debido a la dureza que presentan las fibras de Sharpey en el origen del LSM en su inserción con el hueso cortical, es necesario desprender el ligamento suspensor del menudillo traccionandolo hacia proximal y plantar el cuerpo del ligamento mientras se corta la parte adherida al hueso del ligamento suspensor del menudillo.