



**Universidad Nacional
Autónoma de México**

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



24
de 5

**TECNICA DE FIJACION DE TEJIDOS Y ORGANOS POR
PERFUSION MEDIANTE LA UTILIZACION DE UNA BOMBA
DE RODILLOS DE CIRCULACION EXTRACORPOREA.**

T E S I S

**PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO
ZOOTECNISTA**

P O R

ANDRES GUSTAVO BARRERA MORALES

**Asesores : MVZ. Susana Gállego Martín del Campo
MVZ. Nuria de Buen de Argüero
M en C. Dolores González Barranco
MC. Guillermo Careaga Reyna**

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F., 1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TÉCNICA DE FIJACIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS POR PERFUSIÓN
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE UNA BOMBA DE RODILLOS DE
CIRCULACIÓN EXTRACORPÓREA.**

Tesis presentada ante la

**División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

de la

**Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de**

Médico Veterinario Zootecnista

por

Andres Gustavo Barrera Morales

**Asesores: MVZ. Susana Gállego Martín del Campo
MVZ. Nuria de Buen de Argüero
M en C. Dolores González Barranco
MC. Guillermo Careaga Reyna**

México, D.F. 1995.

DEDICATORIA

A mis padres. José Alejandro Barrera Licona y Alicia Morales de Barrera. Porque son las personas más importantes en mi vida y como una muestra de gratitud, respeto y cariño, ya que por sus sabios consejos, apoyo, cariño y confianza que han puesto en mi he podido concluir esta etapa de mi vida. Me sería difícil sin ustedes.

A mi novia. C.D. Esperanza Sosa Mendoza. Por su gran amor, comprensión e invaluable ayuda que me ha brindado a lo largo de la carrera y gran parte de mi vida y por compartir con migo los momentos mas bonitos de la vida. Te amo linda.

A mi hermano. Myr. M.V. Alejandro Barrera Morales y su esposa C.P. Blanca Quintos Rojano, ya que siempre han sido mi ejemplo y admiración, tanto en la vida profesional como personal. Sigán juntos siempre así.

A mi pequeño sobrino Alex por regalarnos tu alegría, tu sonrisa y darnos la oportunidad de tener una ilusión diferente. Se grande.

A mi hermano. Ing. Petrolero Daniel Barrera Morales y su novia M.C. Iliana Bolaños Ceballos por su gran dedicación tenacidad y entrega a su profesión que son facultades que pocos seres humanos tienen y que mucho se desean. No cambien.

DEDICATORIA

A mis padres. José Alejandro Barrera Licona y Alicia Morales de Barrera. Porque son las personas más importantes en mi vida y como una muestra de gratitud, respeto y cariño, ya que por sus sabios consejos, apoyo, cariño y confianza que han puesto en mi he podido concluir esta etapa de mi vida. Me sería difícil sin ustedes.

A mi novia. C.D. Esperanza Sosa Mendoza. Por su gran amor, comprensión e invaluable ayuda que me ha brindado a lo largo de la carrera y gran parte de mi vida y por compartir con migo los momentos mas bonitos de la vida. Te amo linda.

A mi hermano. Myr. M.V. Alejandro Barrera Morales y su esposa C.P. Blanca Quintos Rojano, ya que siempre han sido mi ejemplo y admiración, tanto en la vida profesional como personal. Sigán juntos siempre así.

A mi pequeño sobrino Alex por regalarnos tu alegría, tu sonrisa y darnos la oportunidad de tener una ilusión diferente. Se grande.

A mi hermano. Ing. Petrolero Daniel Barrera Morales y su novia M.C. Iliana Bolaños Ceballos por su gran dedicación tenacidad y entrega a su profesión que son facultades que pocos seres humanos tienen y que mucho se desean. No cambien.

AGRADECIMIENTOS

A José Alejandro Barrera Licona, Alicia Morales de Barrera, Alejandro, Blanca, Alex, Daniel, Iliana, y Pera por estar siempre unidos y formar mi pequeña gran familia que es la base de la superación.

A mis amigos: Rafael, Gizela, Josefina, Emmita, Ricardo, Carolina, Luis, Pepetón, Enrique, Luis Antonio, Vinicio, Saul, Fernando. Por su amistad, ayuda y realizar juntos esos buenos y malos momentos a lo largo de mi carrera.

Un agradecimiento muy especial a la Doctora Nuria de Buen de Argüero, y a su esposo M.C. Ruben Argüero por su apoyo, ayuda incondicional, consejos y la oportunidad que me brindó para la realización de este trabajo.

A mis Asesores . MVZ Susana Gállego Martín del Campo. M.C. Guillermo Careaga Reyna y M en C Dolores González Barranco. Por su tiempo, disposición y consejos que me brindaron para poder llevar a termino este trabajo.

CONTENIDO.

	<i>PAGINA</i>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	9
DISCUSIÓN	10
LITERATURA CITADA	12
FIGURAS	14

RESUMEN

BARRERA MORALES ANDRES GUSTAVO. Técnica de Fijación de Tejidos y Organos por Perfusión, Mediante la Utilización de una Bomba de Rodillos de Circulación Extracorpórea. (Bajo la Dirección de MVZ Susana Gállego Martín del Campo, MVZ Nuria de Buen de Argüero, M en C Dolores González Barranco y MC Guillermo Careaga Reyna.)

La fijación es uno de los aspectos mas importantes en el tratamiento de los tejidos para ser observados en el microscópio fotónico o electrónico.

Se utilizaron 10 cerdos híbridos de traspatio de 3-5 meses de edad con 17 kg de peso promedio. Se les realizó traqueostomía através de la cual se les conectó a una bomba de respiración modelo 16-24 (CF palmer) London UK, se realizó una incisión quirúrgica en la región medial de los muslos para referir y canalizar la arteria y vena femoral por las cuales se efectuó la exsanguinación y perfusión de la solución fijadora utilizando una bomba de rodillos de circulación extracorpórea, hasta observar la presencia de formol en tráquea y zona de incisión en muslos. Después de 24 horas se realizó la necropsia y se observó que los órganos cambiaron de color normal a diferentes tonos de blanco grisáceo. A la palpación se encontró consistencia firme, posición y relación anatómica muy semejantes a las existentes en un animal in vivo. Esto indicó que la distribución de la solución fijadora fue homogénea consiguiendo de esta manera una buena fijación de los órganos in situ. Se determinó que éste método es una buena alternativa en la fijación de tejidos y órganos para diferentes modelos experimentales que así lo requieran.

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes en el tratamiento de los tejidos para ser observados con el microscopio fotónico y electrónico, es la fijación, ya que de ésta depende el que las diferentes estructuras celulares y tisulares muestren una configuración e interrelaciones lo más parecidas a las existentes in vivo (6).

Un fijador es cualquier sustancia empleada para preservar y endurecer los tejidos para su evaluación histológica. Aunque el simple proceso puede ser dañino y provocar efectos en la morfología celular (2).

En Medicina Humana como en Medicina Veterinaria uno de los fijadores comúnmente empleados para la preservación de tejidos es la formalina amortiguada al 10%, la cual actúa removiendo el agua contenida en las moléculas del tejido (proteínas primarias y ácidos nucleicos) con lo que se obtiene una estructura más firme de los órganos (2,12).

Existen distintas técnicas de fijación como la inmersión en formalina o glutaraldehído, fijadores para la observación del tejido en microscopía fotónica o electrónica. Esta técnica ofrece algunas ventajas como son su fácil manejo y bajo costo. Sin embargo, es necesario practicar cortes de 3-5mm de grosor por la calidad de la fijación y para eliminar artificios; además que la formalina es tóxica, altamente irritante para las membranas mucosas y piel, además de que es potencialmente carcinogénica, lo cual, al no tener una campana de extracción adecuada promueve la contaminación del ambiente y daños al operador (1,13).

Existen otros métodos de fijación como son la congelación, que se utiliza de manera constante en la patología quirúrgica e inmunopatología. Algunas de sus ventajas son la buena preservación

de la morfología celular, la rapidez y una buena conservación de la antigenicidad de los tejidos o de agentes infecciosos. Sin embargo se requiere de sustancias fijadoras como glutaraldehído en alcohol absoluto, equipo costoso para la congelación, que mantenga una temperatura de menos 70 grados centígrados y aparatos como el criostato, además de que las secciones de tejido deben ser menores a 1-2mm (9). Este tipo de técnicas tiene un rango corto de tiempo para su interpretación ya que no detiene la autólisis.

Por otro lado el empleo del uso de las microondas combinadas con sustancias fijadoras es de gran utilidad ya que los tejidos pueden procesarse inmediatamente después de la irradiación, se reduce el tiempo de fijación, la disminución o ausencia total de fijadores, es económico, y además se evita la exposición del personal a los vapores tóxicos del formaldehído. Desafortunadamente las desventajas de utilizar esta técnica es que la fijación no es homogénea y algunas áreas quedan mejor fijadas que otras, al no estar bien estandarizados los tiempos y cantidad de tejido irradiado, aunado a que el tamaño de las piezas debe ser menor a 4-5cm de grosor (1).

Se ha utilizado la técnica de fijación por perfusión, la cual consiste en la utilización de un aparato de perfusión constituido de 2 botellas colocadas a una altura de 1.40-1.50cm del nivel de la mesa de trabajo donde una botella contiene una solución saturada de Ringer en la cual, se introduce una mezcla de aire/CO₂ (95/5%) a burbujeo fino, y la otra botella contiene la solución fijadora. Cada una de las botellas está conectada con un tubo de 1cm de diámetro externo el cual en su extremo inferior se conecta a una válvula de 3 vías que en su salida tiene colocado un conector de plástico para adaptarlo al tejido u órgano a perfundir. El principio de la perfusión de éste método es por gravedad. El proceso de fijación depende del tamaño del órgano o del animal y de la difusión de la solución fijadora (6,14).

En las técnicas de perfusión vascular descritas no existen informes de la utilización de bomba de rodillos de circulación extracorpórea para la perfusión de soluciones fijadoras a los tejidos. La utilización de ésta bomba de rodillos de circulación extracorpórea ha sido empleada en las cirugías de corazón abierto y preservación de órganos con fines de trasplante (11,4). El uso de la bomba de rodillos ofrece ventajas como graduación del volumen perfundido/minuto, y mantenimiento de una perfusión constante; lo que es particularmente importante en lechos capilares para evitar estancamiento sanguíneo y alteraciones hemodinámicas asociadas a un fenómeno de hipotensión por hipovolemia lo que permite mantener al individuo en condiciones más cercanas a la fisiología normal durante el tiempo que dure el acto quirúrgico asegurando un adecuado grado de oxigenación y perfusión tisular (5), es importante, además de éste principio el tipo de soluciones utilizadas con la finalidad de regular la presión osmótica para lograr introducir al espacio vascular el agua secuestrada en las células endoteliales e intersticio y evitar la pérdida de líquidos a éste nivel, facilitando el flujo de éstos y soluciones fijadoras através de los capilares para lograr una adecuada perfusión y que exista una buena fijación de los tejidos y órganos (4,8,9). El mejor efecto se logra añadiendo dextrán a la solución que se utiliza en la perfusión (3,8).

En la investigación tanto en Medicina Veterinaria como en Medicina Humana son numerosas las alteraciones morfológicas y por lo tanto fisiológicas de los tejidos, así como los artificios y cambios tisulares, celulares y ultraestructurales, que ocurren durante el proceso de fijación de los tejidos, que en múltiples ocasiones en los diferentes experimentos realizados tanto a nivel nacional como internacional, provocan problemas de interpretación en la revisión microscópica (1,10,13). Por lo anterior, es de gran interés estudiar con más detalle la técnica de perfusión por

En las técnicas de perfusión vascular descritas no existen informes de la utilización de bomba de rodillos de circulación extracorpórea para la perfusión de soluciones fijadoras a los tejidos. La utilización de ésta bomba de rodillos de circulación extracorpórea ha sido empleada en las cirugías de corazón abierto y preservación de órganos con fines de transplante (11,4). El uso de la bomba de rodillos ofrece ventajas como graduación del volumen perfundido/mínuto, y mantenimiento de una perfusión constante; lo que es particularmente importante en lechos capilares para evitar estancamiento sanguíneo y alteraciones hemodinámicas asociadas a un fenómeno de hipotensión por hipovolemia lo que permite mantener al individuo en condiciones más cercanas a la fisiología normal durante el tiempo que dure el acto quirúrgico asegurando un adecuado grado de oxigenación y perfusión tisular (5), es importante, además de éste principio el tipo de soluciones utilizadas con la finalidad de regular la presión osmótica para lograr introducir al espacio vascular el agua secuestrada en las células endoteliales e intersticio y evitar la pérdida de líquidos a éste nivel, facilitando el flujo de éstos y soluciones fijadoras através de los capilares para lograr una adecuada perfusión y que exista una buena fijación de los tejidos y órganos (4,8,9). El mejor efecto se logra añadiendo dextrán a la solución que se utiliza en la perfusión (3,8).

En la investigación tanto en Medicina Veterinaria como en Medicina Humana son numerosas las alteraciones morfológicas y por lo tanto fisiológicas de los tejidos, así como los artificios y cambios tisulares, celulares y ultraestructurales, que ocurren durante el proceso de fijación de los tejidos, que en múltiples ocasiones en los diferentes experimentos realizados tanto a nivel nacional como internacional, provocan problemas de interpretación en la revisión microscópica (1,10,13). Por lo anterior, es de gran interés estudiar con más detalle la técnica de perfusión por

medio de la utilización de una bomba de rodillos de circulación extracorpórea por la importancia que tiene la fijación de los tejidos en numerosos modelos experimentales, y con ello ofrecer una alternativa adecuada en los procesos de fijación para beneficio directo en la interpretación y evaluación de secciones histológicas de investigaciones que así lo requieran lo cual podrá redundar en los mejores resultados de las mismas y en su generación de conocimiento.

HIPOTESIS

- 1.- La fijación de tejidos y órganos con la técnica de perfusión con formalina mediante el uso de la bomba de rodillos de circulación extracorpórea es útil para la fijación de órganos in situ.
- 2.- El empleo de la bomba de rodillos de circulación extracorpórea permitirá una distribución y homogeneidad de fijación de tejidos adecuada con la perfusión de formalina amortiguada al 10%

OBJETIVOS

- 1.- Demostrar que la técnica de perfusión con formalina mediante la bomba de rodillos de circulación extracorpórea es adecuada para la fijación de los tejidos y órganos.
- 2.- Demostrar la distribución y homogeneidad de la fijación utilizando bomba de rodillos de circulación extracorpórea con formalina amortiguada al 10% en la perfusión de órganos y tejidos.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 10 cerdos de traspatio, híbridos de 3-5 meses de edad con 17kg de peso promedio, clínicamente sanos y con óptimas condiciones de hidratación que se prepararon para cirugía administrando por vía intramuscular Ketamina de 2-4mg/kg como tranquilizante. Después, fué canalizada la vena auricular para contar con una vía permeable al torrente sanguíneo que permitió la administración de soluciones y anestésicos. Posteriormente en el quirófano se indujo a cada uno de los animales a un plano anestésico profundo con la aplicación de 15-17 mg/kg de Tiopental. Una vez anestesiado y en posición de decúbito dorsal, se realizó traqueotomía e intubación para permitir la ventilación asistida del organismo mediante una bomba de respiración modelo 16-24 (CF) Palmer London UK con fracción inspirada de oxígeno 21% (Fi O2 21%) que se conectó a la cánula endotraqueal. Se colocaron los campos quirúrgicos, para incidir y diseccionar la región medial de los muslos del animal hasta localizar la arteria y vena femoral las cuales se refirieron y canalizaron con un catéter del número 18 y además se heparinizó a los animales con 300 UI/kg. La exsanguinación se efectuó por el catéter colocado en la arteria femoral, y simultáneamente fue perfundido a través de la vena femoral un volumen proporcional de Solución Salina Fisiológica (SSF) y Dextrán 60,000 MW mediante la bomba de rodillos Sarns de circulación extracorpórea para reemplazar el volumen sanguíneo con SSF y Dextrán con la finalidad de regular la presión oncótica.

Concluido dicho procedimiento se invirtió el flujo del cabezal para perfundir por vía arterial formalina amortiguada al 10% con pH de 7.0. Esto se realizó hasta que se observó

extravasación de formalina en la incisión traqueal y los tejidos expuestos en el acto quirúrgico sobre la región medial de los muslos.

Posteriormente se retiraron las cánulas. Se realizó la necropsia después de 24 horas para determinar por simple observación directa de los órganos y tejidos la funcionalidad de ésta técnica experimental de fijación.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9

RESULTADOS

Los resultados de fijación obtenidos por perfusión mediante la bomba de rodillos de circulación extracorpórea fueron los siguientes:

En los 10 cerdos estudiados, la totalidad de los órganos contenidos en las diferentes cavidades (craneana, torácica y abdominal) y masas musculares presentaron la morfología, arquitectura y relación anatómica semejante a la existente en un animal *in vivo*. El aspecto de los órganos fue uniforme en su superficie sin defectos o cambios en el color, se encontraron los pulmones grises, hígado, bazo, riñón, corazón y músculo esquelético gris claro, el cerebro, estómago e intestinos de color blanco amarillento. Todos ellos con consistencia firme. Por otro lado, la superficie de corte en los órganos mostró una distribución homogénea del color previamente descrito, lo cual indica que existió una distribución adecuada de la solución fijadora en los órganos. En los cerdos estudiados no se encontró evidencia de fijación parcial o ausencia de fijación en dichos órganos.

DISCUSION

Uno de los aspectos más importantes en el tratamiento de los tejidos para ser observados con el microscopio fotónico y electrónico, es la fijación, existen numerosos artículos sobre el tema, ya que de ésta depende el que las diferentes estructuras celulares y tisulares muestren una configuración e interrelaciones lo mas parecido a las existentes in vivo (1,6,9,10,13,14). Sin embargo, no existen datos en la literatura sobre este método.

En este estudio se pudo determinar que la técnica de fijación por perfusión mediante la utilización de una bomba de rodillos de circulación extracorpórea es una alternativa en el complejo proceso de fijación, obteniendo mejores resultados que los señalados con otras técnicas (1,6,9,13).

A pesar de ser un método mas complejo que los utilizados de rutina (13), este procedimiento mostró ser de gran utilidad ya que con esta técnica se obtiene una distribución homogénea de la solución fijadora en el organismo lo que permite la observación de la morfología y posición anatómica semejante a la de un animal in vivo, tambien el proceso de distribución de la solución fijadora en los tejidos es adecuado, evidenciando homogeneidad, lo que consideramos nosotros se logra haciendo uso, de ésta técnica con soluciones cristaloides ya que éstas evitan la retención de líquidos a nivel capilar, disminución del diametro del lumen vascular por edema de las células endoteliales, logrando con estos una homogénea distribución de la solución fijadora hacia los tejidos dato que no siempre se logra con las técnicas de fijación mas comunmente utilizadas (1,6,9,13) lo que disminuirá sesgos y/o artificios en la interpretación de la histología o histopatología. Independientemente de que el método de perfusión con bomba de rodillos de

circulación extracorpórea requiere de equipo costoso; se justifica ampliamente su empleo en los modelos experimentales que requieran alta precisión de interpretación macro y microscópica, lo cual redundará en la generación de conocimiento en la investigación médica para beneficio del hombre y los animales.

Este es el primer informe de la utilización del método de fijación por perfusión mediante la utilización de una bomba de rodillos de circulación extracorpórea en el Mundo.

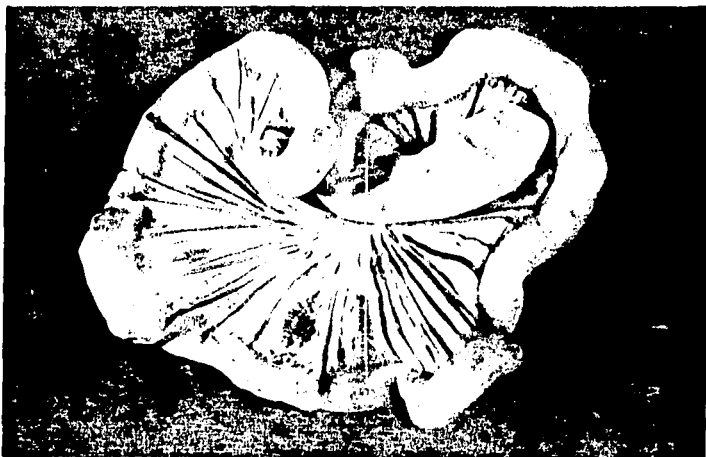
LITERATURA CITADA

- 1.- Arellano B.: Uso de microondas en la fijación de tejidos para microscopía óptica e inmunohistoquímica. Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM 1995
- 2.- Dunstan R.: A User's Guide to Veterinary Surgical Pathology Laboratories Vet. Clin. of North Am Practice, 20:1397-1417 (1990)
- 3.- Gallego S. Evaluación de la Efectividad de la combinación de solución hipertónica hiperoncótica naloxona y aceptadores de radicales de oxígeno libres para el tratamiento del choque hipovolémico en el perro. Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM 1992
- 4.- Gibbon J.R. Jr. Application of a Mechanical Heart and Lung Apparatus to Cardiac Surgery. Min. Med. 27: 171-178. 1954.
- 5.- Glennie G.: Elección de una especie animal de experimentación para evaluar el prototipo de oxigenador del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM 1990
- 6.- Feria A.: Preservación Óptima del Sistema Nervioso Central por Perfusión con Ghteraldehido para Estudio Ultraestructural. Arch. Inv. Méd. 1:201-220 (1970)
- 7.- Maningas P.A.: Resuscitation With Hipertonic Saline/Dextran During Hemorrhagic Shock in Swine: Effects on Organ Blood Flow. Crit. Care. Med. 15: 427,1987.
- 8.- Mazzoni M.C.: Dynamic Fluid Redistribution in Hyperosmotic Resuscitation of Hypovolemic Hemorrhag. Am.J.Physiol. 255: H629-H637,1988.

- 9.- Inpanburt N. Immunocytochemical localization of type A influenza virus nucleoprotein in chicken kidney, using freeze substitution technique for tissue fixation. Am. J. Vet. Res 54:425-428 (1993)
- 10.- Karlsson U. Fixation of the Central Nervous System for Electron Microscopy by Aldehyde Perfusion. III Structural changes after exsanguination and delayed perfusion. J.Ultrastruct. Res 14:47-63 (1966)
- 11.- Reichman R.T.: Improvet patient survival after cardiac arrest using a cardiopulmonary support system. Ann. Thorac. Surg. 49 (1): 101-105
- 12.- Rosai J. Ackerman's Surgical Pathology Vol 1 Seventh Edition C.V. Mosby Co. 1989.
- 13.- Valero G.: Diagnóstico Veterinario. 1a edición Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C. 1993
- 14.- Van Harreveld A.: Perfusion Fixation with Glutaraldehyde and Post-Fixation with osmium tetroxide for electrone microscopy. J. Cell. Sci. 3:579-594 (1968)



Superficie de corte de pulmón donde se observa un color blanco-grisáceo en forma homogénea obtenido por perfusión de formalina al 10% con bomba de rodillos de circulación extracorpórea.



Sección de hígado en donde se aprecia el color blanco-grisáceo con una distribución homogénea tanto en el órgano como en los vasos mesentéricos obtenidos por perfusión de formalina al 10% con bomba de rodillos de circulación extracorpórea.



Superficie de corte de riñón donde se observa un color blanco-grisáceo en forma homogénea obtenido por perfusión de formalina al 10% con bomba de rodillos de circulación extracorpórea.



Sección de riñón, hígado, pulmón, cerebro e íleon en donde se aprecia el color blanco-grisáceo con una distribución homogénea en todos ellos como resultado de una adecuada fijación obtenida por perfusión de formalina al 10% con bomba de rodillos de circulación extracorpórea.