

Artículo original

Trasplantes homólogos bovinos de túnica flava

Oscar Luján¹, Patricia Bertone¹, Mauricio Luján¹, Ricardo Cocco¹, Andrea Cristofolini^{2,3*}, Andres Boatti¹,
Alejandro Aramayo¹, Cecilia Merkis²¹Departamento de Clínica Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.²Área de Microscopía Electrónica, Departamento de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria,
Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba, Argentina.³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Argentina.

*e-mail: alcristofolini@gmail.com; acristofolini@ayv.unrc.edu.ar

(Recibido 9 de julio 2018; aceptado 28 de noviembre 2018)

RESUMEN

El objetivo fue determinar la competencia de la túnica flava como tejido de reemplazo en los defectos de la pared abdominal del bovino. En bovinos es importante la utilización de materiales protésicos para dar solución a hernias, eventraciones postquirúrgicas, traumatismos graves y exéresis de tumores, además es importante analizar el uso de un tejido cuya constitución histológica guarde relación con la función anatómica que deberá cumplir en el animal en pie. Se utilizó como tejido de injerto, túnica flava desnaturalizada y conservada convenientemente. Se practicó mediante cirugía un injerto de túnica flava a bovinos, clínicamente sanos y sin defectos en la pared abdominal. Clínicamente se observó el proceso inflamatorio local y la cicatrización para evaluar la aceptación del injerto, se tomaron biopsias en tiempo 0 y a los 15, 30, 60 y 90 días. Las muestras fueron evaluadas mediante estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos para la determinación de desmina y vimentina. Los resultados clínicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos demostraron la ausencia de rechazo y la incorporación del injerto al tejido del receptor. Nuestro protocolo de desnaturalización y conservación demostró que la túnica flava es una membrana biológica de fácil obtención y útil para reparar exitosamente defectos de la pared abdominal en los bovinos.

Palabras clave: túnica flava, trasplante, cirugía, inmunohistoquímica, bovino

INTRODUCCIÓN

Los defectos de la pared abdominal consecutivos a una intervención quirúrgica con cicatrización deficiente, separación de la fascia aponeurótica y músculo con la formación de eventraciones y hernias, son complicaciones frecuentes que ocasionan traumatismo de las estructuras intervinientes¹. En la práctica de la clínica quirúrgica de grandes animales, en especial la de los bovinos, se presentan casos en los que se hace indispensable la utilización de un tejido de reemplazo como la única forma de dar solución a

ABSTRACT

Homologous bovine transplants of tunica flava
The objective was to determine the competence of the tunica flava as a replacement tissue in the defects of the bovine abdominal wall. In this species, it is essential to use prosthetic materials to solve hernias, postsurgical eventrations, severe trauma and tumor excision, it is also important to analyze the use of a tissue whose histological structure is related to the anatomical function that must comply with the animal standing. As graft tissue, denatured and properly preserved tunica flava was used. Clinically healthy bovines and without defects in the abdominal wall were used; through surgery, a tunica flava graft was applied. Clinically, the local inflammatory process and healing to evaluate the acceptance of the graft was observed, biopsies were taken at time 0 and at 15, 30, 60 and 90 days. The samples obtained were evaluated by histopathology and immunohistochemistry for the determination of desmin and vimentin. The clinical, histopathological and immunohistochemical results demonstrated the absence of rejection and the incorporation of the graft into the tissue of the recipient. Our denaturation and conservation protocol demonstrated that the tunica flava is an easily obtainable and useful biological membrane to successfully repair defects of the abdominal wall in bovines.

Key words: tunica flava, transplant, surgery, immunohistochemistry, bovine

hernias y eventraciones. De la misma manera, la técnica se emplea en cualquier lesión que curse con pérdida de tejido, como por ejemplo traumatismos graves o exéresis de tumores.

Algunos autores han postulado que la reparación de la pared abdominal plantea en ocasiones un problema de difícil solución, que pone a prueba el ingenio del cirujano para resolverlo². En estas situaciones de difícil manejo es que el empleo de materiales protésicos está indicado. En estos casos es necesario el empleo de un material que sirva para completar el cierre permanente de la pared abdominal.

Asimismo, otros autores determinaron como satisfactorio el uso de mallas sintéticas como complemento en la resolución quirúrgica de orificios herniarios de gran extensión en bovinos³. Aunque no existe un consenso objetivo a la hora de definir el tamaño del anillo herniario en la bibliografía consultada, éste se considera excesivo cuando los puntos de afrontamiento no alcanzan para lograr el cierre de la herida o crean una tensión importante, haciendo necesario recurrir a técnicas de síntesis alternativas⁴.

Existen en la actualidad materiales protésicos de origen biológico, metálicos y sintéticos. Dentro de los biológicos se pueden mencionar: piel, fascia lata, duramadre, entre otros. Como ejemplo de prótesis metálicas figuran mallas de plata y de acero. Los materiales sintéticos se clasifican en no absorbibles (mallas de dacron, tycron, teflón, polipropileno) y absorbibles (mallas de derivados del ácido poliglicólico, derivados de poliglactínicos y derivados de la polideoxanona)². Cuando la superficie del tejido a transplantar se trata con un aldehído (por ej. aldehído glutárido), o con un tratamiento térmico, se convierte en lo que se denomina una superficie biológicamente inactivada, por un proceso de insolubilización, desnaturalización o entrecruzamiento de los componentes biológicos⁵. Varios autores refieren que el uso de diferentes membranas biológicas utilizadas como trasplante tales como pericardio, duramadre, piel, amnios y otros menos frecuentes, son frágiles y no reúnen las condiciones que se necesitan en la reparación de la pared abdominal de los bovinos, por lo que se decide optar por un tejido cuya constitución histológica lo haga más apto, relacionando las funciones anatómicas que el mismo tiene en un animal en pie.

La túnica flava consiste principalmente en un tejido elástico y de un color amarillento, de allí su nombre de flava. Está bien adaptada para el sostén pasivo de las vísceras abdominales y es más gruesa en su parte ventral, donde el peso es mayor. La parte dorsal se disecciona con facilidad respecto al músculo subyacente, pero su parte central intercambia fibras con la aponeurosis del oblicuo externo y se halla adherida con mayor firmeza⁶.

La inmunohistoquímica (IHQ) es la utilización de reactivos basados en anticuerpos para localizar epítomos específicos en cortes de tejidos^{7,8}. La IHQ por fluorescencia indirecta, es usada frecuentemente para la localización de diferentes antígenos, por emisión de fluorescencia⁸⁻¹⁰.

Existen tres tipos de filamentos en el citoesqueleto, los microfilamentos de 6 nm, los intermedios de 10 nm y los filamentos gruesos de 25 nm. Los filamentos intermedios son un grupo de proteínas relacionadas a la diferenciación del citoesqueleto, presentes en todas las células eucariotas^{11,12}. Están compuestos por una familia de al menos 5 clases de proteínas, cada una de las cuales presenta una especificidad tisular distinta. Los filamentos intermedios incluyen a citoqueratinas, vimentina, proteína glialcálcica, neurofilamentos y desmina¹³. Los filamentos intermedios se encuentran involucrados en numerosas e importantes funciones celulares, entre ellas, el mantenimiento de la organización celular y el contacto célula-célula, de manera tal que su presencia se encuentra relacionada con la reorganización tisular^{14,15}.

La vimentina, proteína de 57 kD, se encuentra en diferentes tipos celulares en su estado embrionario para ser reemplazados por los filamentos intermedios específicos en el proceso de diferenciación de las células mesenquimáticas a fibroblastos, células endoteliales, condrocitos, histiocitos y algunas células musculares lisas constituyentes de paredes vasculares^{16,17}. Por su parte, la desmina, proteína de 52 kD, forma el citoesqueleto de las células musculares lisas, esqueléticas y cardíacas, proporcionando una red citoesquelética para la inserción e integración mecánica de las proteínas contráctiles^{7,10,18}.

El objetivo del presente estudio fue determinar un método de obtención y conservación de la túnica flava, para ser utilizada como tejido de reemplazo en los defectos de la pared abdominal del bovino. La competencia del aloinjerto fue determinada mediante la evaluación clínica, histopatológica y la determinación de desmina y vimentina, por técnicas inmunohistoquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se trabajó con un grupo de bovinos, considerados libres de enfermedad de acuerdo a un examen clínico previo, destinados a ensayos biológicos (Comité de Ética de Investigación de la Universidad Nacional de Río Cuarto). Los animales fueron alojados en corrales pertenecientes a la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina (33,11° S, 64,3° O), acondicionados para tal fin, en los que permanecieron durante la realización del trabajo experimental. Se utilizaron 10 bovinos adultos, de ambos sexos, de raza Aberdeen Angus, de entre 10 a 12 meses de edad, de 210 kg aproximadamente. Se realizó la inspección general de los individuos y en particular de la región del abdomen. Se tomaron constantes fisiológicas (temperatura corporal, frecuencia respiratoria y frecuencia cardíaca) y se exploraron los linfonódulos inguinales superficiales. Los datos obtenidos fueron registrados en una ficha clínica individual para cada animal.

Obtención y conservación de túnica flava bovina

El tejido experimental se obtuvo de animales recién faenados bajo estrictas normas de higiene. Con la media res colgada, se resecaron trozos de tejido (túnica flava) de aproximadamente 20 cm de largo por 20 cm de ancho, uno por cada media res. Una vez en el laboratorio de cirugía se diseccionaron los segmentos de túnica, liberándola del tejido graso y muscular, utilizando para ello tijeras de Metzbaum, pinzas de disección y bisturí.

La etapa de desnaturalización se realizó colocando el material en recipientes cerrados que contenían 1 litro de solución de timerosal al 2% y 1 litro de alcohol etílico de 96°, permaneciendo sumergido por un lapso de 48 h. Finalizada la etapa de fijación y esterilización del tejido se procedió a realizar, bajo estrictas medidas de asepsia, un lavado con solución fisiológica estéril. Luego la pieza fue sumergida en un recipiente con glicerina pura, el cual fue llevado a 4°C por un período de una semana, después de la desnaturalización. Finalizado este tiempo la pieza estaba lista para ser implantada, previo lavado con solución fisiológica estéril.

Trasplante homólogo

En cada animal se realizó un injerto de túnica flava en un flanco, mientras que en el mismo acto se procedió a intervenir con una incisión en el otro flanco para actuar de control y evaluar el trauma quirúrgico sin el injerto (Figura 1). Para evitar una observación sesgada, la recolección de datos clínicos estuvo a cargo de personal no afectado a las maniobras quirúrgicas.

Toma de muestras

Al tiempo cero se realizó el trasplante y la toma de la primera muestra, luego a los 15, 30, 60 y 90 días postoperatorios se completó el muestreo. Para cada tiempo determinado se realizó la toma de muestra del injerto y la muestra control, que incluyó músculo y tejido celular subcutáneo y piel. Las muestras de la zona trasplantada y del flanco opuesto del mismo animal, fueron extraídas teniendo en cuenta los 4 ángulos del rectángulo que conforma el injerto a los efectos



Figura 1. Procedimiento de colocación del trasplante a bovinos de túnica flava con puntos simples, entre el tejido celular subcutáneo y el músculo oblicuo abdominal externo.

de obtener una muestra representativa. Las muestras fueron fijadas en formol tamponado al 10% para ser procesadas a través de la técnica histológica convencional y para el estudio inmunohistoquímico, para la detección de desmina y vimentina.

Evaluación clínica

El control y la evaluación de los animales en el período postoperatorio estuvieron a cargo de operadores que desconocían los objetivos del estudio.

La aparición de uno o más de los siguientes signos, luego de las observaciones clínicas locales, fue considerada como posibilidad de rechazo del injerto: a) reacciones inflamatorias locales exageradas: se utilizó un calibre para la medición y se consideró como reacción leve una reacción de 1 cm del labio de la herida; reacción moderada: entre 1 y 3 cm y reacción grave: más de 3 cm; b) alteraciones de la cicatrización (dehiscencias de suturas y/o cicatrizaciones hipertróficas); y c) complicaciones sépticas de las suturas (presencia de pus o exudado mucopurulento). Se determinaron una vez por día, durante los primeros 15 días postquirúrgicos tanto del lugar de las cirugías como del animal en general. El relevamiento de estos datos se realizó semanalmente hasta los 90 días postquirúrgicos.

Técnica histológica convencional

El tejido fue fijado en formol al 10% en solución salina tamponada por 48 horas. Luego se realizó la reducción del material, se deshidrató con baterías de alcoholes de graduación creciente atemperado a 38-40°C (3 veces por alcohol 96% y 2 veces por alcohol absoluto, 15 minutos cada uno de los lavados). Posteriormente se aclaró el tejido mediante 3 pasajes por xilol, de 10 minutos cada uno; y se impregnó colocándolo en parafina fundida a 51°C de 2 a 4 horas. Los tejidos fueron cortados en un micrótopo IEC Minetome (Microm, Alemania) en delgadas láminas de 4 a 5 μ m las que se colocaron en agua atemperada a 52°C para ser recogidas sobre portaobjetos y luego ser secados sobre platina térmica. Parte de los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina; el resto de los mismos fue destinado a los ensayos de inmunohistoquímica para la detección de desmina y vimentina, para ello fueron colocados sobre portaobjetos gelatinizados¹⁹.

Inmunohistoquímica para desmina y vimentina

Los cortes de túnica flava fueron desparafinados y rehidratados en 2 lavados de 10 minutos cada uno en solución salina tamponada pH 7,2-7,4. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta con visualización de fluorescencia. Se colocó sobre el tejido el primer anticuerpo anti-desmina (1 mg/l, RTU-DES-DERII, Novocastra®, USA) y anti-vimentina (0,97 mg/l, RTU-VIM-V9, Novocastra®, USA), se cubrió con una película de parafilm sin presionar, con el fin de homogeneizar el anticuerpo sobre el tejido, evitando la formación de burbujas y se incubó en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con solución salina tamponada a temperatura ambiente. Se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína (100ug/ml, FL-2001, Vector®, USA), durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad y en cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con solución salina tamponada. Las muestras fueron observadas a través de un microscopio óptico/epifluorescente Axiophot (Carl Zeiss, Alemania), adquiriendo las imágenes mediante una cámara digital Powershot G6, 7.1 megapixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio.

Cuantificación y análisis estadístico

Los resultados obtenidos a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta se expresaron en forma semicuantitativa determinando que: (-): negativo, (+): marcación positiva, (++) : abundante marcación, (+++) : cuantiosa marcación. Se determinó la distribución de intensidad de inmunomarcación a través del valor de High Score (HS), en donde para cada muestra el valor High Score derivará de la sumatoria de los porcentajes de tejido marcado para cada intensidad, multiplicado por el ponderado para esa intensidad de marcación. High Score = $\sum P_i (i + 1)$, en donde i = intensidad de marcación, P_i = % de tejido marcado para cada intensidad. La cuantificación fue realizada por un único operador, determinando el valor de High Score en cinco campos diferentes, sobre dos secciones de cada portaobjeto correspondiente a cada uno de los días postrasplante.

Se ajustó un ANOVA para evaluar el efecto del día postoperatorio sobre la inmunolocalización de desmina y vimentina siguiendo el siguiente modelo: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$; siendo Y_{ij} la observación del animal j en el día i ; μ = la marcación media total; T_i = el efecto del día i ; e_{ij} = el efecto residual aleatorio. La diferencia de medias se realizó mediante LSD de Fisher. Los análisis fueron realizados utilizando el software InfoStat²⁰.

RESULTADOS

Evaluación clínica

El examen clínico particular del lugar del injerto presentó durante los primeros diez días posteriores al mismo, una reacción inflamatoria local leve en 3 casos, reacción leve a moderada en 6 animales y reacción moderada a grave en 1 caso. A partir del día 10 los signos locales fueron disminuyendo hasta desaparecer en la tercera semana posterior a la cirugía. El animal que presentó un proceso inflamatorio moderado a grave, a los tres días de ser intervenido y para evitar mayores complicaciones, fue tratado convenientemente realizando antisepsia de la herida y administración de antiinflamatorios y antibióticos por vía parenteral, luego de lo cual no presentó ningún otro problema. El flanco de la zona control presentó en todos los animales una leve reacción inflamatoria, la que desapareció a los 10 días postoperatorio.

En cuanto a la observación de las alteraciones de la cicatrización, un animal trasplantado presentó a los 3 días

de la cirugía, la dehiscencia de uno de los puntos simples de la sutura de la piel, 2 presentaron leve separación de los bordes de la herida y los 7 restantes no presentaron ninguna alteración. El examen clínico del control no mostró ninguna alteración de la cicatrización. A los 15 días postrasplante en la zona del injerto se observó en 1 animal un exudado abundante no purulento, en dos casos un leve exudado no purulento mientras que en los siete animales restantes no hubo ninguna complicación. A partir del día 15 y hasta finalizar el ensayo, no se observaron particularidades (Tabla 1).

Evaluación histopatológica

El examen histopatológico de las muestras analizadas al tiempo cero mostró un tejido de piel normal compuesto de epidermis y dermis, al igual que el tejido subcutáneo y músculo. En la muestra de la túnica obtenida antes del implante se observó tejido conectivo denso compuesto por haces longitudinales de fibras de colágeno y escasos fibroblastos.

En las muestras de piel de la zona del injerto se observó a los 15 días postrasplante en la dermis, la presencia de una leve proliferación de fibroblastos y muy escasa reacción

Tabla 1. Complicaciones sépticas de las heridas durante los primeros 30 días luego del trasplante de túnica flava a 10 bovinos.

N° de animal	Zona del injerto	Zona control
1	Leve exudado no purulento	Ausente
2	Ausente	Ausente
3	Ausente	Ausente
4	Ausente	Ausente
5	Leve exudado no purulento	Ausente
6	Ausente	Ausente
7	Ausente	Leve exudado no purulento
102	Abundante exudado no purulento	Ausente
102"	Ausente	Ausente
148	Ausente	Ausente

inflamatoria, representada por monocitos y neutrófilos. Se observaron, además, focos de hemorragia con intensa proliferación vascular y escasa reacción inflamatoria compuesta principalmente por polimorfonucleares y neutrófilos (Figura 2 a). Al día 30 se observó proliferación vascular intensa, moderada reacción inflamatoria con presencia de polimorfonucleares neutrófilos, leve proliferación de fibroblastos (Figura 2 b). Por su parte, a los 60 días postoperatorio el tejido mostró gran proliferación de capilares infiltrando al implante y además leve reacción inflamatoria y gran proliferación de fibroblastos (Figura 2 c); mientras que al día 90 el tejido se presentó normal sin distinción del tejido trasplantado del resto del tejido, existiendo una rica red vascular en la zona con proliferación de fibroblastos y fibras de colágeno (Figura 2 d). En el análisis histopatológico de las muestras control se visualizaron estructuras tisulares normales en todos los casos.

Inmunohistoquímica de desmina y vimentina

Se observó en la inmunohistoquímica por fluorescencia indirecta, una marcación positiva y abundante de desmina a los 15 y 30 días postrasplante, respectivamente; mientras que a los 60 y 90 días, la marcación fue negativa (Figura 3). Por su parte vimentina presentó una marcación positiva a los 15, 30 y 90 días y abundante al día 60 (Figura 4). El análisis estadístico arrojó diferencias estadísticamente significativas para desmina entre los días 0-15, 15-30 y 30-60 ($p < 0,05$). Se observó una disminución abrupta de desmina hacia el día 15 postrasplante, a partir de allí su inmunolocalización aumenta significativamente hasta el día 60, superando ampliamente los valores basales, para luego disminuir

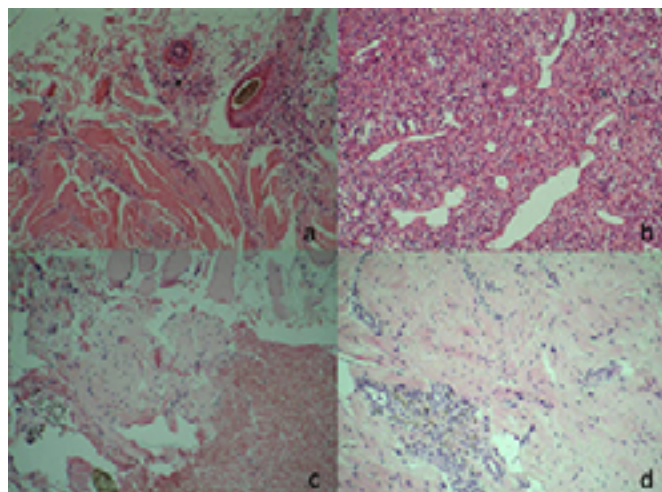


Figura 2. Histopatología realizada en la zona trasplantada a los 15 (a), 30 (b), 60 (c) y 90 (d) días postinjerto. HE, 200x.

levemente, de manera no significativa, al final del ensayo (Figura 5). En cuanto al filamento intermedio vimentina, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los días 0-15, 15-30, 30-60 y 60-90 ($p < 0,05$). Se determinó un decrecimiento marcado hacia el día 15 postoperatorio, para luego ir aumentando significativamente al día 30, alcanzando su valor máximo a los 60 días y continuar su crecimiento significativo hasta el final del ensayo (Figura 6).

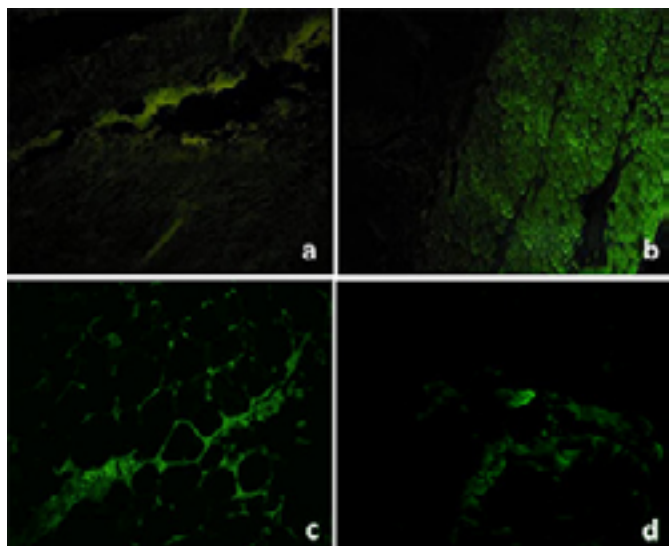


Figura 3. Localización de desmina en cortes de tejido trasplantado a los 15 (a), 30 (b), 60 (c) y 90 (d) días postinjerto. HE, 200x.

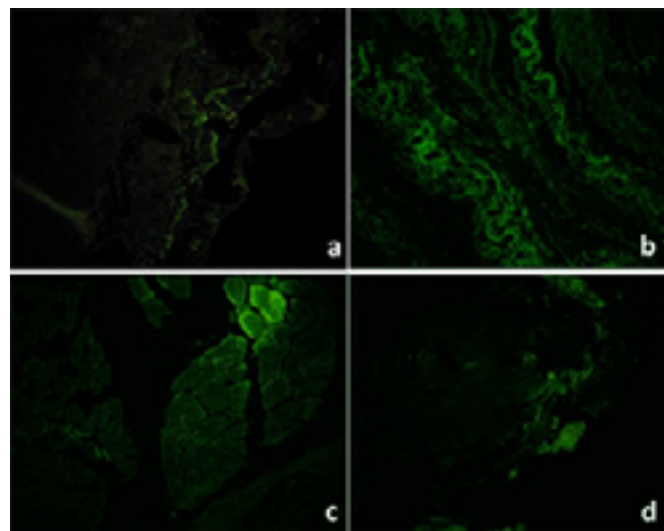


Figura 4. Localización de vimentina en cortes de tejido trasplantado a los 15 (a), 30 (b), 60 (c) y 90 (d) días postinjerto. HE, 200x.

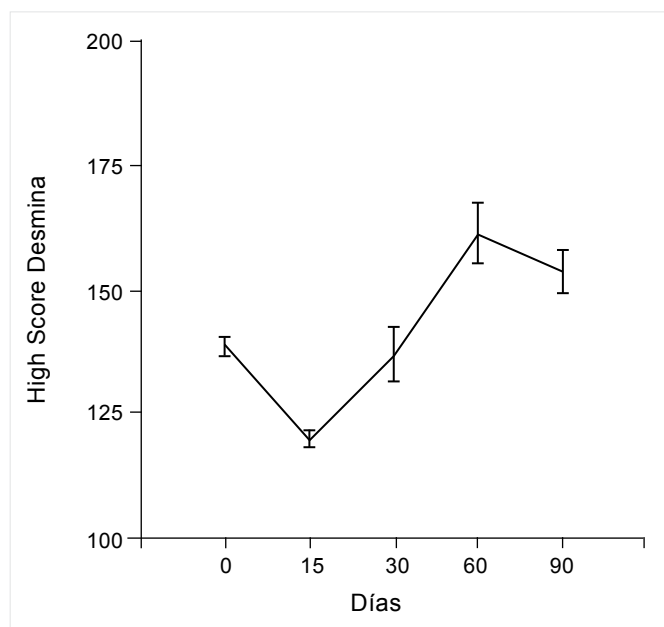


Figura 5. Distribución de intensidad de marcación de desmina en las muestras analizadas a los 15, 30, 60 y 90 días postinjerto.

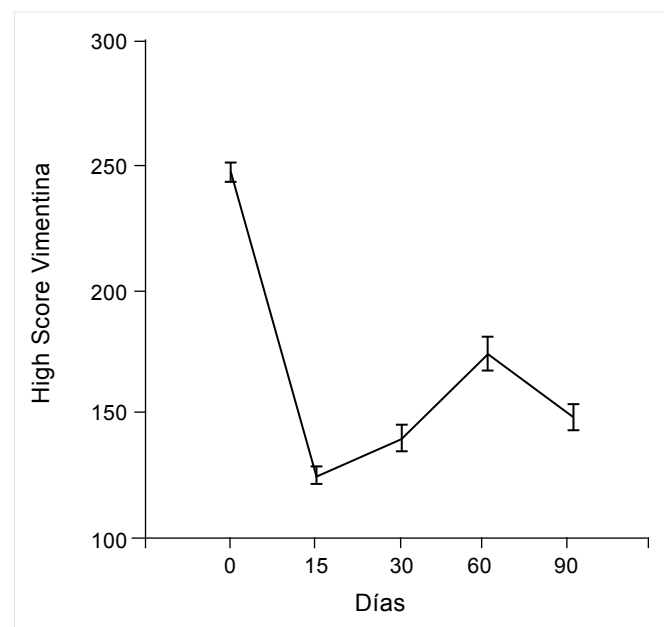


Figura 6. Distribución de intensidad de marcación de vimentina en las muestras analizadas a los 15, 30, 60 y 90 días postinjerto.

DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que es posible el empleo de la túnica flava bovina en la reparación de los defectos de la pared abdominal de los bóvidos, lo cual permitiría solucionar problemas graves como hernias, eventraciones o pérdida de tejidos por cualquier causa.

Los resultados de la observación clínica en el lugar del injerto en este trabajo, revelaron que en tres casos se presentó una inflamación local leve, en seis casos este mismo proceso inflamatorio fue leve a moderado y sólo en un animal se presentó en la zona un proceso inflamatorio intenso calificándolo de moderado a grave. En el flanco control hubo una leve inflamación de la zona intervenida quirúrgicamente que desapareció a los diez días postinjerto.

Otros autores reportaron al trabajar con el centro

tendinoso diafragmático homólogo en la corrección de hernias umbilicales, dehiscencias de heridas y abscesos en los animales intervenidos²¹, sin embargo para la conservación de este tejido protésico utilizaron dos métodos de conservación diferentes, glicerina 98% y glutaraldehído 4%.

Destacamos que en nuestro ensayo utilizamos el mismo método de conservación y tratamiento previo al injerto.

En un ensayo realizado con fascia fresca autógena se postuló que la misma puede representar una alternativa válida para resolver casos clínico-quirúrgicos²², sin embargo se observó en el postoperatorio inmediato un 80% de los animales con inflamación muy intensa en la región donadora de la fascia y un 40% con dehiscencias de las heridas en la zona receptora del injerto.

La túnica flava desnaturalizada y conservada de acuerdo a

nuestro ensayo, puede considerarse un tejido de reemplazo superior a la fascia autógena sin tratamiento previo.

En cuanto a la observación de las alteraciones cicatrizales después de los trasplantes de túnica flava desnaturalizada se observó un 10% de dehiscencia de un punto de sutura de piel y un 20% presentaron leve separación de los bordes de la herida, el 70% restante no presentaron ninguna alteración, a diferencia de lo reportado por otros autores^{21,22}.

Las complicaciones sépticas de las heridas en nuestro ensayo fueron menores y muy leves, observándose un 70% de animales sin complicaciones, a diferencia de otros autores en donde además se requirió de tratamientos específicos para controlar la sepsis.

En el análisis histopatológico a los 15 días del trasplante de la túnica flava desnaturalizada, se observó una leve infiltración de fibroblastos y una escasa reacción inflamatoria con gran proliferación vascular. Esta angiogénesis se presentó más marcada a los 30 y 60 días, mostrando además, una gran infiltración de fibroblastos. El análisis de la arquitectura tisular del injerto mostró, hacia el final del ensayo, la apariencia de un tejido con características histológicas normales y una adecuada remodelación y reorganización tisular tras la intervención quirúrgica, en concordancia con lo reportado por otros autores¹⁵.

Si bien estudios anteriores consideran que aún no se dispone de una prótesis ideal que sea incorporada sin tener un grado variable de rechazo y que cuando se introduce un material extraño en los tejidos orgánicos, se desencadenan reacciones fundamentalmente de tres tipos: destrucción o lisis, incorporación o tolerancia y rechazo o eliminación²³, de acuerdo a nuestros resultados postulamos que la túnica flava representa un mejor modelo de prótesis óptima de origen biológico para ser utilizada en casos de reemplazo de tejidos.

Nuestros resultados demuestran que la túnica flava trasplantada es aceptada e incorporada adecuadamente al tejido receptor.

No existen reportes de trasplantes de tejidos para reparar la pared abdominal en bovinos en los cuales se utilicen técnicas inmunohistoquímicas para su evaluación. Nuestros resultados son los primeros en reportar la evolución tisular de un tejido trasplantado mediante la aplicación de este tipo de técnica. La misma nos permitió cuantificar la localización de filamentos intermedios en el tejido trasplantado, involucrados en el reconocimiento célula-célula y en la reorganización tisular. Destacamos que ambos filamentos intermedios aumentan significativamente al día 30 alcanzando su máximo valor al día 60 postoperatorio. Desmín aumentó sus valores por encima de los niveles basales, por su parte vimentina presentó niveles basales muy elevados, los aumentos a los días 30 y 60 nunca llegaron a superar esos valores iniciales. Se estima que esos niveles basales elevados de vimentina al comienzo del ensayo son debidos a que la toma de la muestra incluye múltiples endotelios

vasculares del tejido celular subcutáneo, con presencia de abundante vimentina en las paredes vasculares, en coincidencia con otros autores¹³.

En todos los casos, el tratamiento de la bioprótesis previo al trasplante es un procedimiento que independientemente del método que se utilice, siempre tiende a crear una superficie biológicamente inactivada que no produzca una reacción inmunológica de rechazo al trasplante y en condiciones de asepsia de manera tal que no vehiculice o transporte alguna enfermedad infecciosa o una neoplasia. Numerosos autores citan otros métodos de obtención y conservación de su injertos^{5,24,25}, sin embargo el tiempo de conservación de sus tejidos fue notablemente menor al nuestro.

La utilización para la conservación del injerto de alcohol etílico 96° y timerosal al 2% en proporciones iguales, fue determinada de acuerdo a estudios previos^{26,27}. Estas sustancias fueron elegidas considerando que la inmersión en una solución, en partes iguales, someten a la túnica flava a un tratamiento, previo al trasplante, que elimina cualquier elemento de contaminación y que anula o disminuye la superficie antigénica del tejido a trasplantar conservando sus propiedades físicas como bioprótesis. Para la destrucción pre-trasplante de las células con capacidad inmunológica se utilizó, con éxito, una técnica de desnaturalización que anulara la superficie antigénica del injerto y que además, cumpliera con los requisitos de ser sencilla de realizar y con productos químicos de fácil adquisición. Destacamos que el presente trabajo optó por un tejido de reemplazo que no necesita una duración tan prolongada como en medicina humana, ya que el receptor o huésped fue el bovino, el cual es un animal de producción y cuya vida útil es más breve. Resaltamos además, la importancia del proceso de desnaturalización el cual permitió atenuar la respuesta inmunológica y disminuir la sepsis del tejido a trasplantar, obteniéndose mejores resultados clínicos que otros autores²².

En conclusión la túnica flava homóloga desnaturalizada puede ser utilizada como material protésico de origen biológico en la pared abdominal de los bovinos, destacando que la misma se incorpora al tejido del animal receptor sin generar rechazo. Señalamos que, además de la observación clínica y la histopatología convencionalmente utilizadas, el empleo de técnicas inmunohistoquímicas resultó ser una excelente herramienta complementaria para el seguimiento de la remodelación celular del tejido trasplantado, lo que permitió determinar la adecuada incorporación de la túnica flava trasplantada al tejido receptor.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Parte de este trabajo fue presentado en las 8vas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. 2013. Mar del Plata. Argentina.

REFERENCIAS

1. Gutiérrez-Samperio C, Vera-García FJ, Figueroa-Cárdenas JD, Gallegos-Corona MA. Bioprótesis de pericardio bovino tratado con glutaraldehído (PBTG) en la reconstrucción de la pared abdominal. *Cirugía y Cirujanos*, 2002, 70(4): 257-266.
2. Rappoport S. Reparación de la pared abdominal con prótesis de polipropileno. *Rev. Chil Cir*, 1993, 45(3): 75-78.
3. Dirksen G, Gründer H, Stöber M. *Medicina Interna y Cirugía del Bovino*. Vol I. Ed. Intermédica, 2005, Bs. As.
4. Trout N, Slatter D. *Tratado de cirugía en pequeños animales*. Editorial Intermédica. Buenos Aires, 2006, capítulo 22, pg 326-345.
5. Arias J. *Propedéutica Quirúrgica: preoperatorio, operatorio, postoperatorio*. Editorial Tebar, 2004, pg 540.
6. Dyce K, Sack W, Wensing J. *Anatomía Veterinaria*. Editorial Panamericana, Bs. As. 1996, pg 845.
7. Wei Y, Li Y, Chen C, Stoelzel K, Kaufmann A, Albers A. *Human*

- skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exp Cell Res*, 2011, 317(7): 1016-1027.
8. Groff BD, Kinman AW, Woodroof JF, Pompano RR. Immunofluorescence staining of live lymph node tissue slices. *JIM*, 2018, doi:10.1016/j.jim.2018.10.010, accedido octubre 2018.
 9. Finco I, Hammer G. Isolation, fixation and immunofluorescence imaging of mouse adrenal glands. *J Vis Exp*, 2018, 2 (140),doi: 10.3791/58530.
 10. Rodriguez MA, Liu JX, Parkkonen K, Li Z, Pedrosa Domellöf F. The cytoskeleton in the extraocular muscles of desmin knock out mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59: 4847-4855.
 11. Fernandez P, Portiansky E, Barbeito C, Gimeno E. Characterisation of cytotrophoblastic-like cells present in subinvolutioned placental sites of the bitch. *Histol Histopathol*, 1998, 13: 995-1000.
 12. Yoon K, Fitzgerald P. Periplakin interactions with lens intermediate and beaded filaments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50 (3): 1283-1289.
 13. Ferreyra G, Pedraza F, Robledo J, Vieco, B, Respreo M. Evaluación inmunohistoquímica de queratina, desmina, vimentina y actina músculo liso en tumor mixto mamario maligno canino en Medellín (Colombia). *Med Vet*, 2002, 19 (1): 12-19.
 14. Korgun E, Cayli S, Asar M, Demir R. Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. *J Mol Histol*, 2007, 38 (4): 253-60.
 15. Oliveira S, Greca C, Abrahamohn P, Reis M, Zorn T. Organization of desmin-containing intermediate filaments during differentiation of mouse decidual cells. *Histochem Cell Biol*, 2000, 113: 319-327.
 16. Moretti RM, Mai S, Montagnani Marelli M, Rizzi F, Bettuzzi S, Limonta P. Molecular mechanisms of the antimetastatic activity of nuclear clusterin in prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 2011,39 (1): 225-234.
 17. Park S, Park P. Growth hormone can decrease muscle damage complication in tibia lengthening by external fixation. *J Pediatr Orthop*, 2011, 31(4): 402-412.
 18. Favre B, Schneider Y, Lingasamy P, Bouamer J, Bégre N, Gontier Y y col. Plectin interacts with the rod domain of type III intermediate filament proteins desmin and vimentin. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90 (5): 390-400.
 19. Fiorimanti M. Incidencia de los factores angiogénicos y antiangiogénicos en el desarrollo vascular placentario en porcinos. Tesis Doctoral, 2018. Biblioteca de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba.
 20. Di Rienzo J, Casanoves A, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M., Robledo C. InfoStatGroup, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2016. En: <http://www.infostat.com.ar>.
 21. Franco da Silva L, Claudino da Silva O, Eurides D, Rodriguez de Souza V, Machado Silva A, Franco L y col. Hernioplastia umbilical em bovino: emprego de implante de cartilagem auricular homóloga e avaliacao clínica dos resultados. *Ac Sci Vet*, 2005, 33 (1): 57-62.
 22. Mastoby Martinez M, Oviedo C, Baullut P. Evaluación clínica de hernioplastia umbilical en bovinos: empleo de fascia abdominal autógena. *Rev MVZ Córdoba*, 2010, 15 (2): 2111-2117.
 23. Acevedo A. Mallas sintéticas irreabsorbibles: Su desarrollo en la cirugía de las hernias abdominales. *Rev Chil Ciru* 2008, 60 (5): 457-464.
 24. Aguirre P, Zarate S, Silva R, Histschfeld M. Proccesing Laboratory of Radioesterilized Biological Tissues. *Nucleotécnica* 2005, 38: 65.
 25. Bellon J. Bioprótesis: Indicaciones y utilidad en la reparación de defectos herniarios de la pared abdominal. 2009. En: <http://medicyafac.wordpress.com/tag/hernia/>, accedido junio 2018.
 26. Luján O. Transplantes homólogos de túnica flava en bovinos desnaturalizada con timerosal al 2% y alcohol etílico 96°. Seminario Académico Científico 2003, Escuela de Posgraduación, Universidad Nacional de Río Cuarto.
 27. Luján O, Iraci M, Grisolia M, Bertone P, Cocco R, Salvi M y col. Efectos locales de los implantes homólogos de túnica flava desnaturalizada en timerosal 2% y alcohol etílico 96° conservado en glicerina, en bovino. *Anales Primer Congreso de Cirugía Veterinaria de la Provincia de Salta*, 2005. pg 2-3.