



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

Departament de Pediatria, Obstetrícia i Ginecologia

**“REPARACION INTRAUTERINA DEL LABIO
LEPORINO EN EL FETO OVINO”.**



TESIS DOCTORAL

presentada para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por

José Luis Peiró Ibáñez

Dirigida por

Dr. Vicenç Martínez Ibáñez

Prof. Dr. Félix García Arnas

Tutor

Prof. Dr. Antonio Carrascosa Lezcano

BARCELONA, 2014

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

- 1.- La creación quirúrgica de un defecto labiopalatino unilateral completo en una fase temprana de la gestación reproduce la FLP que se origina congénitamente.
- 2.- En los fetos ovinos portadores del defecto y no reparados (grupo LUT), podremos hallar las deformidades maxilares características de las FLP del humano.
- 3.- La reparación diferida del defecto, con un intervalo de tiempo de 2 semanas en unos fetos ovinos y de 6 semanas en otros, permitirá a las estructuras maxilares corregir o revertir la deformidad que conllevan las FLP congénitas en el feto humano
- 4.- Se supone una restitución tisular del defecto labial sin cicatriz aparente, macro y microscópicamente, en mayor medida en la reparación intrauterina precoz.
- 5.- La utilización de la fetoscopia (fetendo) para la reparación de la FLP es factible en el animal de experimentación, y su aplicación en el humano reducirá en gran manera el estrés quirúrgico y la incidencia de prematuridad.
- 6.- Creemos que la reparación mediante micrograpas es una técnica más rápida, sencilla e igual de efectiva que la sutura (sutura vs stapler), y el momento (timing) de la gestación más adecuado para la reparación del labio leporino sería en una fase precoz de la gestación.



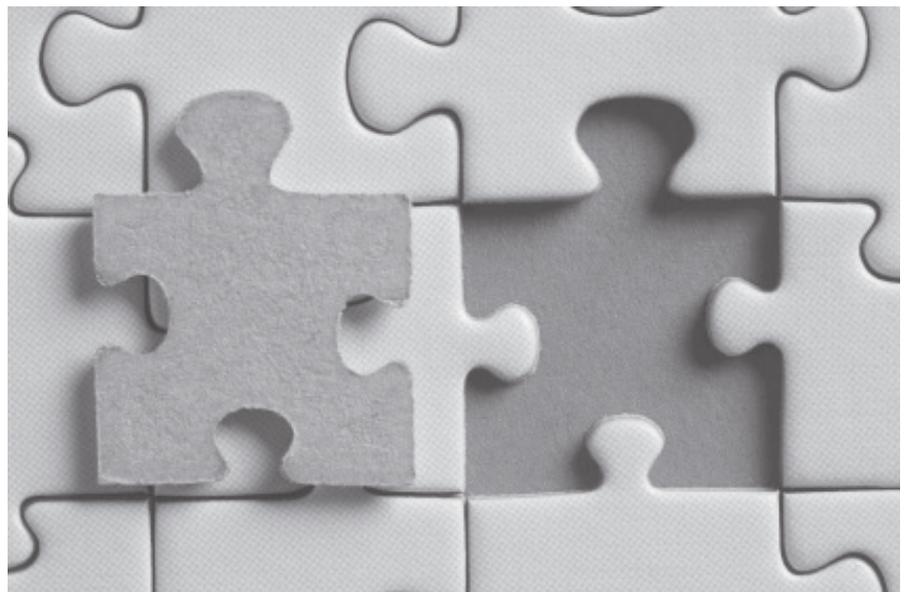
OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL TRABAJO

- 1.- Comprobar la efectividad y las limitaciones de la reparación intrauterina del labio leporino mediante fetoscopia.
- 2.- Comparar dos técnicas en la reparación intrauterina del labio leporino (sutura versus grapado).
- 3.- Constatar la regeneración tisular con ausencia o menor grado de cicatriz en los labios intervenidos, así como la corrección de las deformidades maxilares.
- 4.- Comparar la idoneidad del tratamiento en una etapa precoz y en una etapa tardía de la gestación.
- 5.- Aplicabilidad o traslación de este tratamiento al feto humano afecto de una FLP.



MATERIAL Y MÉTODOS



Elección de la especie experimental.

Se ha escogido el modelo ovino (oveja gestante) por diversas razones. La principal es por su larga gestación (145-150 días) y que normalmente tienen sólo una o dos crías, con un tamaño adecuado para la manipulación quirúrgica a partir de la mitad de su gestación. Se trata de una especie monotócica, que presenta más similitudes gestacionales con los humanos, que otras especies de pequeños e incluso grandes animales. El carácter dócil de estos animales, facilita su manejo, su estabulación y su control postoperatorio (Fig.117).



Fig. 117. Oveja gestante y feto ovino como animales de experimentación

Animales de experimentación.

Los animales gestantes procedieron de las granjas de la facultad de veterinaria de la UAB. Se utilizaron ovejas gestantes de raza manchega y pirenaica-ripollesa. Se realizó monta controlada y control ecográfico de la gestación para asegurar la misma y datar con precisión la edad de gestación en todo momento.

En todas las fases del estudio experimental se atendió al cuidado y tratamiento de los animales (ovejas) según las regulaciones del Real Decreto 223 (1988) y del actual Real Decreto 53/2013 (BOE del 8 de febrero de 2013) de experimentación animal, que incluye la nueva directiva Europea del 2010 y mediante el cual se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales que se utilizan en experimentación u otros objetivos científicos. Esta regulación incluye recomendaciones similares a las del NIH Guide for the use of laboratory animals.

El proyecto fue financiado por una beca FIS PI040501 y con la colaboración de la Fundació A. Bosch de NOEL S.A. Alimentaria.

Fue aprobado para su realización por el comité de ética de experimentación animal (CEEA) de la UAB y del Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR) de Barcelona. CCEA num. de registro 11/04.

La estabulación (Fig. 118), los procedimientos quirúrgicos (Fig. 119) y los cuidados postoperatorios se realizaron tanto en las instalaciones de la facultad de veterinaria de la UAB como del Institut de Recerca del Hospital vall d'Hebron (VHIR) de Barcelona.



Fig. 118. Ovejas gestantes en el estabulario del VHIR.

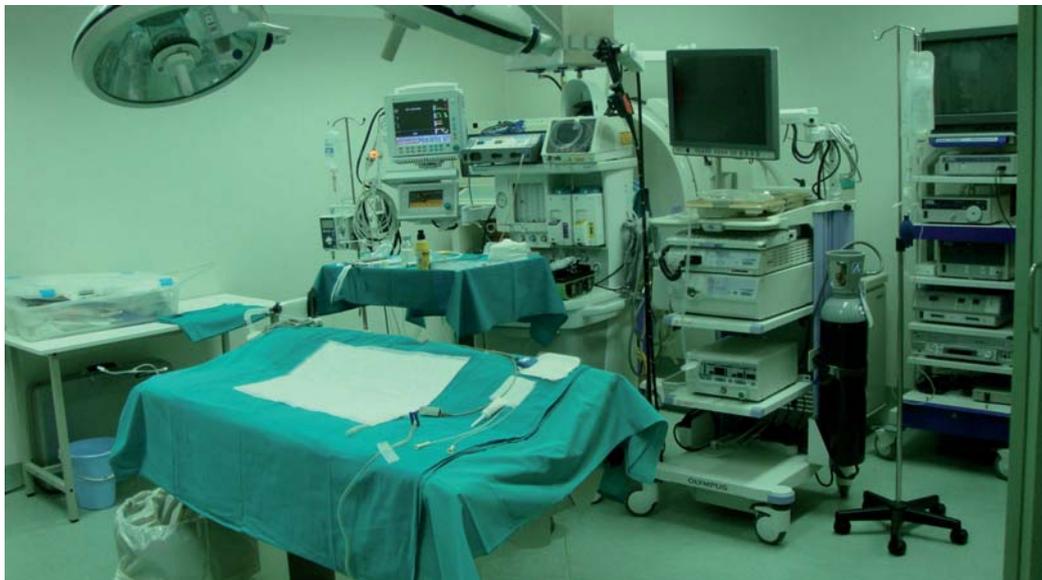


Fig. 119. Uno de los dos quirófanos de experimentación animal del VHIR.

Creación de la FLP unilateral en el feto ovino.

Se realizó este proceso en 18 fetos ovinos, en una etapa precoz de la gestación, entre 58 y 62 días (E60+/-2), previa comprobación del estado gestante y datación por ecografía. En el caso de gestaciones dobles, sólo se creó el defecto en uno de los fetos, para minimizar la agresión quirúrgica y el tiempo operatorio, con la intención de disminuir el número de muertes fetales o abortos. Los fetos no manipulados, sin defecto de FLP inducido quirúrgicamente, se consideraron controles normales. Las pérdidas fetales por este primer procedimiento fueron de 3/18 (16%), quedando 15 fetos con FLP creada. En dos casos hubo fallo en la evaluación ecográfica y se practicó laparotomía a una oveja supuestamente gestante, donde se evidenció la ausencia de gestación al encontrar un útero pequeño no grávido. Estos animales fueron excluidos, obviamente del estudio.

Se procede a la anestesia de la oveja gestante (ver apartado). Las ovejas deberán permanecer en ayunas las 48 horas previas a la intervención, a excepción de la ingesta de agua. El animal se coloca en decúbito-dorsal con una inclinación a la izquierda de 15° para evitar la compresión de la vena cava. Se realiza la sedación por vía intramuscular, se canaliza un acceso venoso y se llega a un nivel anestésico adecuado y mantenimiento mediante anestesia inhalatoria con derivados halogenados. La monitorización materna controla ECG, presión arterial no invasiva, frecuencia cardíaca y temperatura corporal (39°C), mediante monitores Horizon, capnógrafo y pulsi-oxímetro Ohmeda.

En la cirugía de la oveja gestante se practica laparotomía media infraumbilical y queda expuesto el útero bicornuado de la oveja (Fig. 120). Se localiza la cabeza del feto ovino por palpación y se inmoviliza por sujeción manual del ayudante, a través de la pared uterina. Se colocan 2 puntos de tracción hemostáticos de PDS 2/0 y se practica, entre ambos una mini-histerotomía de 3 cm. con la ayuda del electrobisturí (Fig. 121), y evitando afectar alguno de los numerosos cotiledones placentarios. Se fijan las membranas mediante puntos sueltos y pinzas de Babcock (Fig. 122). Posteriormente se extraen unos 150 cc de líquido amniótico mediante aspiración en jeringas de 60 cc, que se guardan en medio estéril sumergidas en suero caliente (Fig.123). Se exterioriza únicamente el hocico del feto ovino. Se intenta no perder líquido amniótico, aunque éste se puede reponer con suero fisiológico o Ringer-lactato calentado a 37°C.

En la cirugía del feto ovino (Fig. 124-125), se practica una doble incisión paralela con bisturí microquirúrgico (Fig.126) para la excisión de 2 mm. de ancho en el lado izquierdo de todo el espesor del labio superior del feto ovino (Fig. 127), incluyendo base de la fosa nasal y el alveolo. Se prolongará la incisión mediante tijera por la línea media palatina hasta la úvula (Fig.128). Así, hemos reproducido quirúrgicamente una FLP unilateral total (LUT).

Se repone el líquido amniótico mantenido a 37°C y se añade penicilina (1000 U) o cefoxitina (1g/L de Ringer-lactato). Se repone la falta de fluido intruterino con Ringer-lactato si es preciso. Se cierra la incisión uterina (Fig.130) con puntos

globales de PDS 2/0. Se reubica el útero y se cierra el abdomen de la oveja gestante. Es importante cerrar bien la aponeurosis abdominal con sutura reabsorbible, polyglactin-910 (vicryl) 2, el plano graso subcutáneo con Vicryl 0 y realizar una sutura intradérmica con vicryl 1 de aguja triangular, para evitar la eventración y la dehiscencia de sutura cutánea por rozamiento con el suelo en el postoperatorio.

Como grupo con el defecto de FLP unilateral creado (LUT), en el que no se procede a ningún procedimiento de reparación, se dejaron 5 ovejas sin someterse a una segunda intervención fetal. Uno de estos fetos abortó unos días después de la creación del defecto, sin una segunda cirugía.



Fig. 120. Diferencias entre útero humano y útero ovino bicorne (arriba). Diferencias entre útero gestante y no gestante en la oveja (abajo).

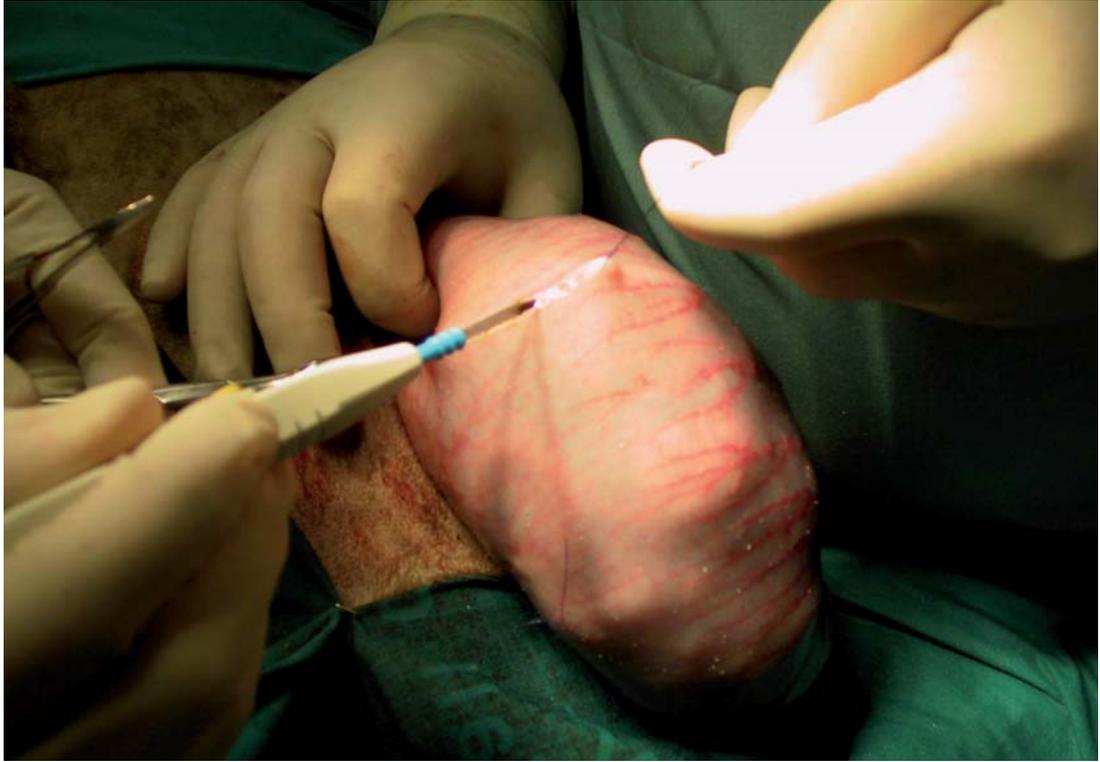


Fig. 121. Incisión en el útero ovino bicorne mediante electrobisturí.

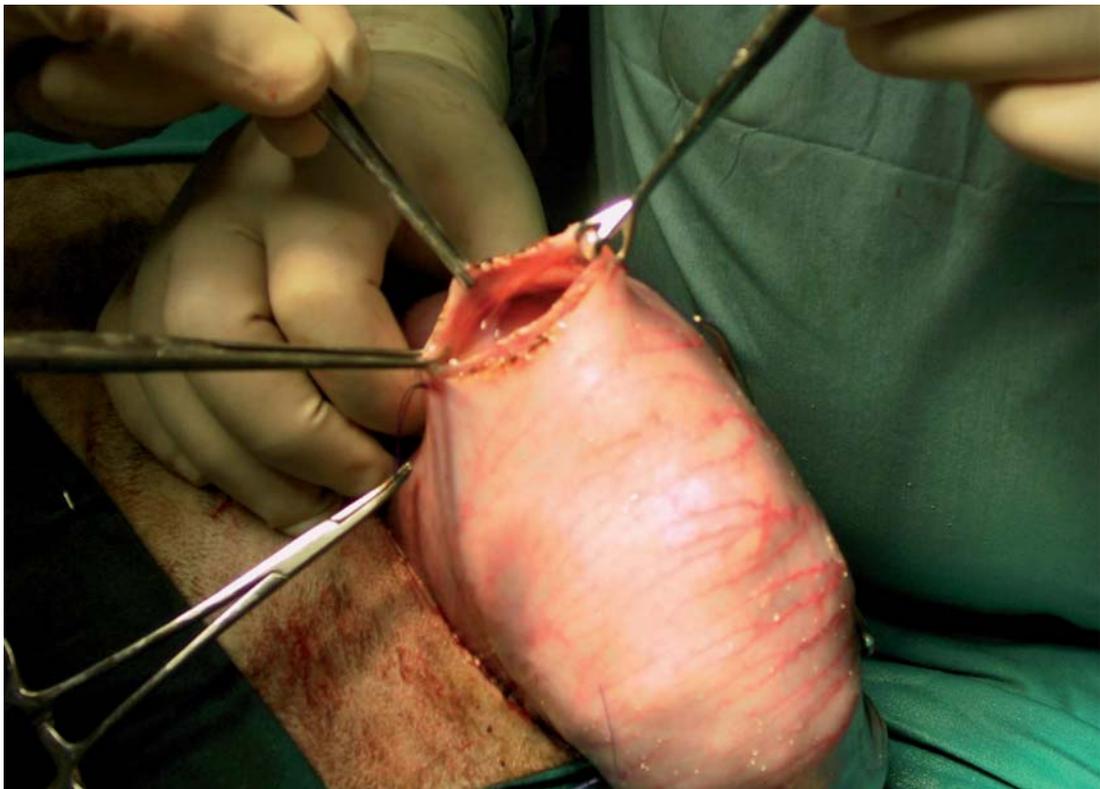


Fig. 122. Apertura del útero ovino para acceso intrauterino con anclaje de las membranas.



Fig. 123. Aspiración del líquido amniótico para conservarlo y para estudio. Exposición de la cabeza fetal (E65).

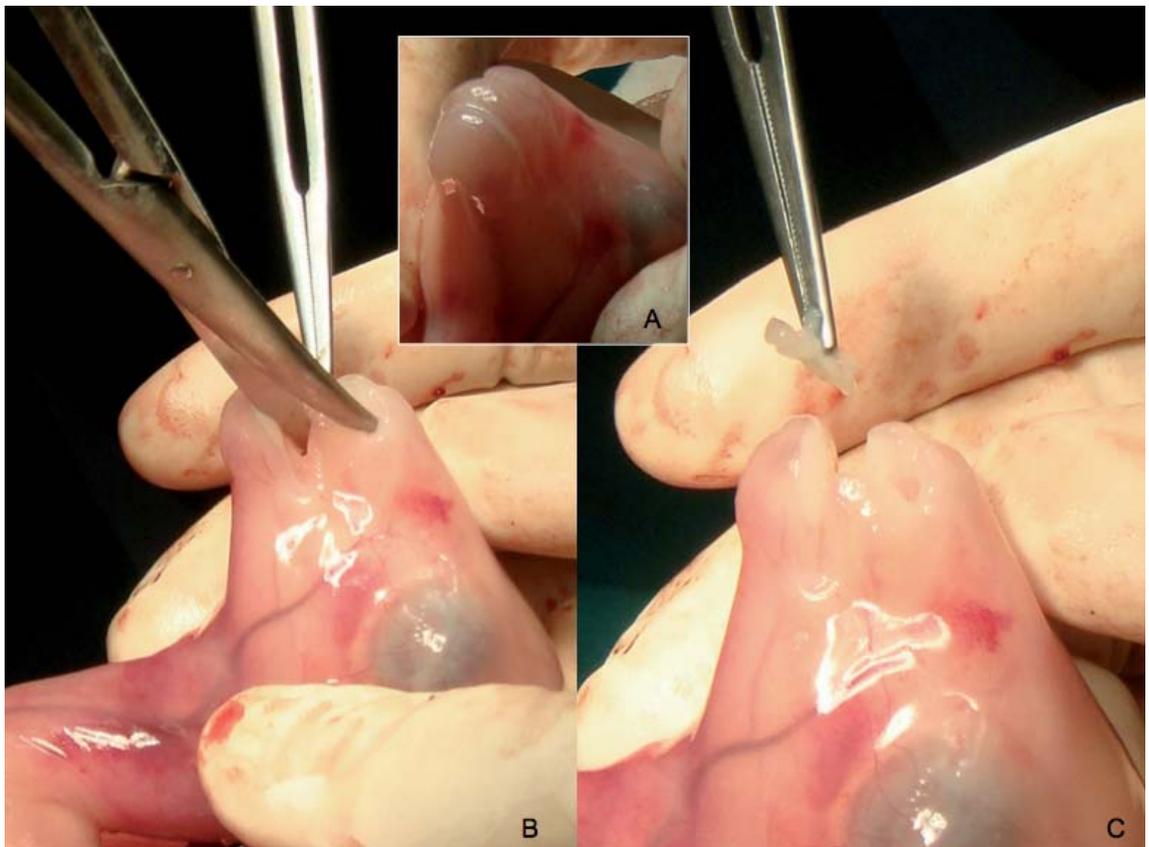


Fig. 124. Exposición del hocico fetal (A). Se corta sobre la incisión labial (B) y se reseca una porción de tejido naso-labial de 2mm (C).

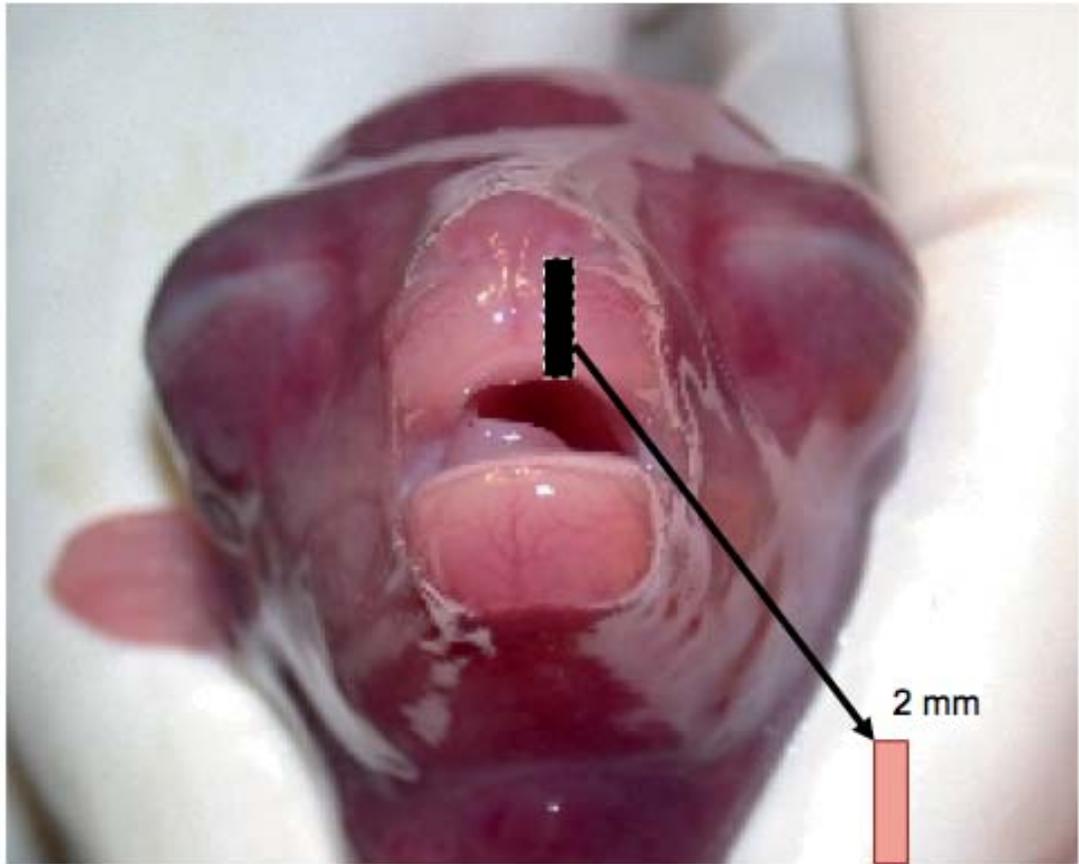


Fig. 125. Exposición del hocico fetal con escisión de tejido naso-labial de 2mm.

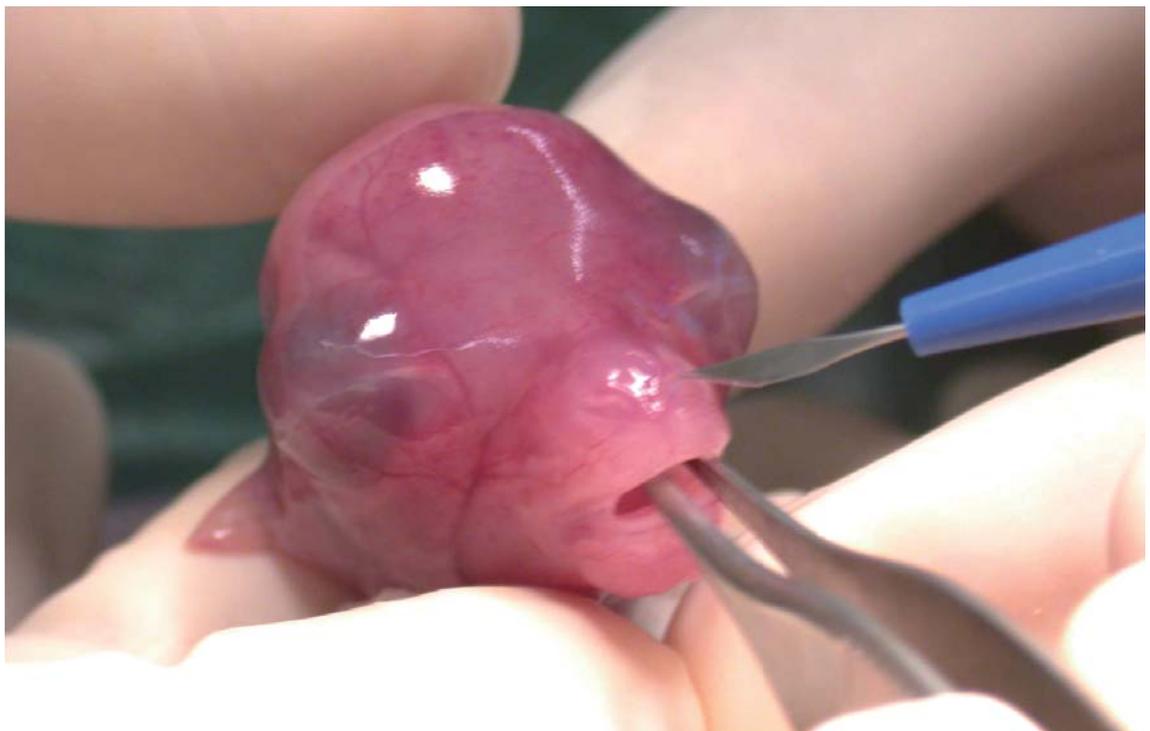


Fig. 126. Incisión doble naso-labial izquierda con bisturí microquirúrgico.



Fig. 127. Corte con tijeras sobre la incisión naso-labial izquierda.

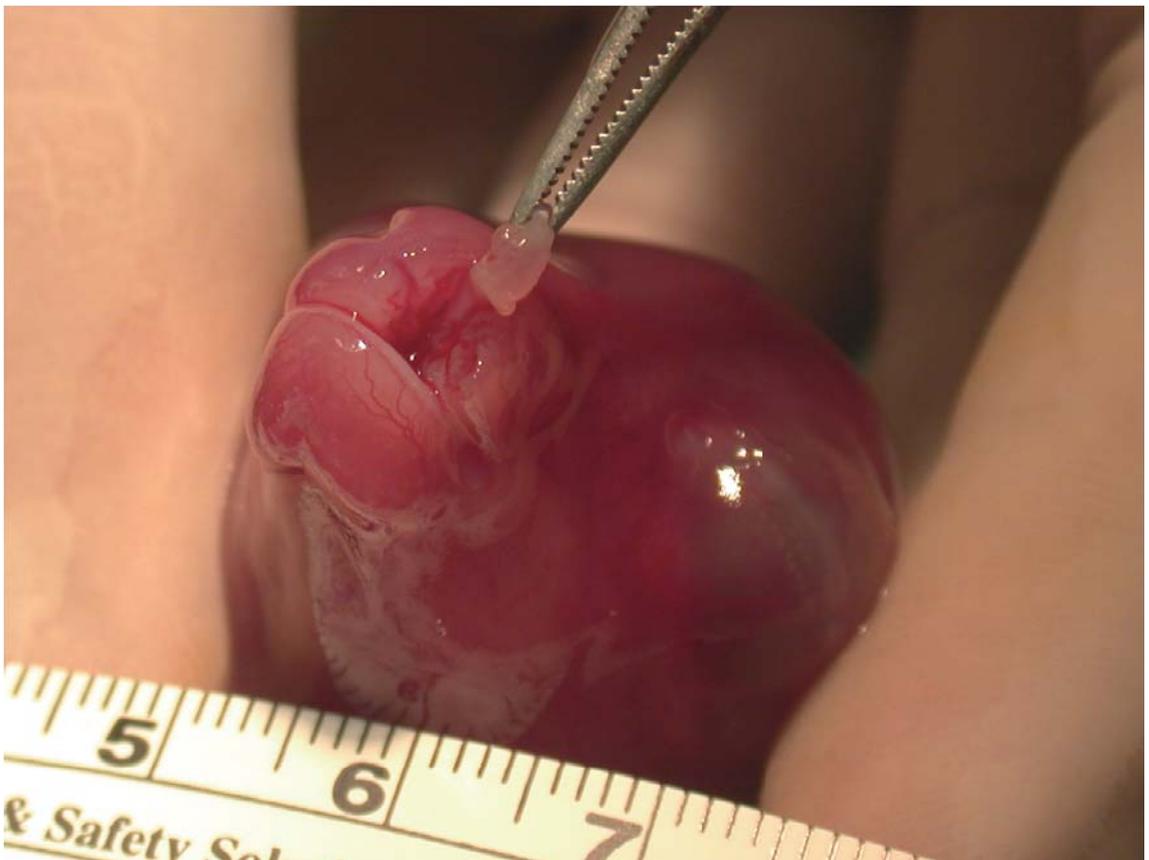


Fig. 128. Escisión de tejido naso-labial de 2mm.



Fig. 129. Se prolonga la incisión mediante tijera por la línea media palatina hasta la úvula



Fig. 130. Cierre de la histerotomía.

Reparación de la FLP unilateral en el feto ovino en un periodo precoz de la gestación (E75).

Se realizó este proceso en 6 fetos ovinos (de los que sobrevivieron 4 fetos y abortaron dos) en una etapa precoz de la gestación, entre los 73 y 77 días (E75+/- 2), previa comprobación del estado gestante y fetal por ecografía. La mitad se operaron mediante cirugía fetal abierta y la otra mitad mediante abordaje fetoscópico. Para la reparación, se refrescaron mínimamente los bordes labiales del defecto con el corte del electrobisturí y se utilizaron 2 puntos de sutura (SUT) de PDS 4/0 en una mitad de los casos (Fig. 131) y uso de 2 grapas (STP) aplicadas mediante aplicación directa de una grapadora, en la otra mitad (Fig.132).

Para la cirugía abierta se utilizó la misma técnica y método de abordaje que en la creación del defecto (ver apartado anterior).

Para la fetoscopia (Fig. 133), previa exposición uterina, se colocaron 2 trócares puertos de entrada de 5 mm. y otro de 10 mm., previa mini-abertura uterina con electrobisturí y sutura circundante en bolsa de tabaco con PDS 2/0, para evitar el escape de gas y anclar las membranas amnióticas. La colocación de los trócares siempre en disposición de triángulo y evitando la posición de los cotiledones placentarios.

Una vez colocado el primer trocar, alejado de la cabeza fetal para obtener buen campo de visión, se aspira una parte de líquido amniótico (unos 150 cc.) mediante aspiración en jeringas de 60 cc, que se guardan en medio estéril sumergidas en suero caliente. Se insufla gas CO2 a una presión máxima de 3-5 mm Hg. Tras la distensión de las paredes uterinas se colocan los otros 2 trócares. Mediante un fetoscopio o una óptica laparoscópica de 5 mm. se consigue la visualización del defecto nasolabial creado 2 semanas antes.



Fig. 131. Reparación precoz del defecto (E75). Se refrescan mínimamente los bordes labiales del defecto con el corte del electrobisturí y se utilizaron puntos de sutura de PDS 4/0.

Previa a una ligera aplicación del corte del electrobisturí en los márgenes labiales separados, se procede a la reparación del defecto labial (Fig 134) mediante sutura de polidioxanona (PDS) 4/0 realizada con instrumentación endoscópica (grupo SUT1) o mediante colocación de dos grapas metálicas (Fig.135) a través de una endograpadora de 10 mm (Ethicon endosurgery) pasada por el trócar de mayor diámetro (grupo STP1).

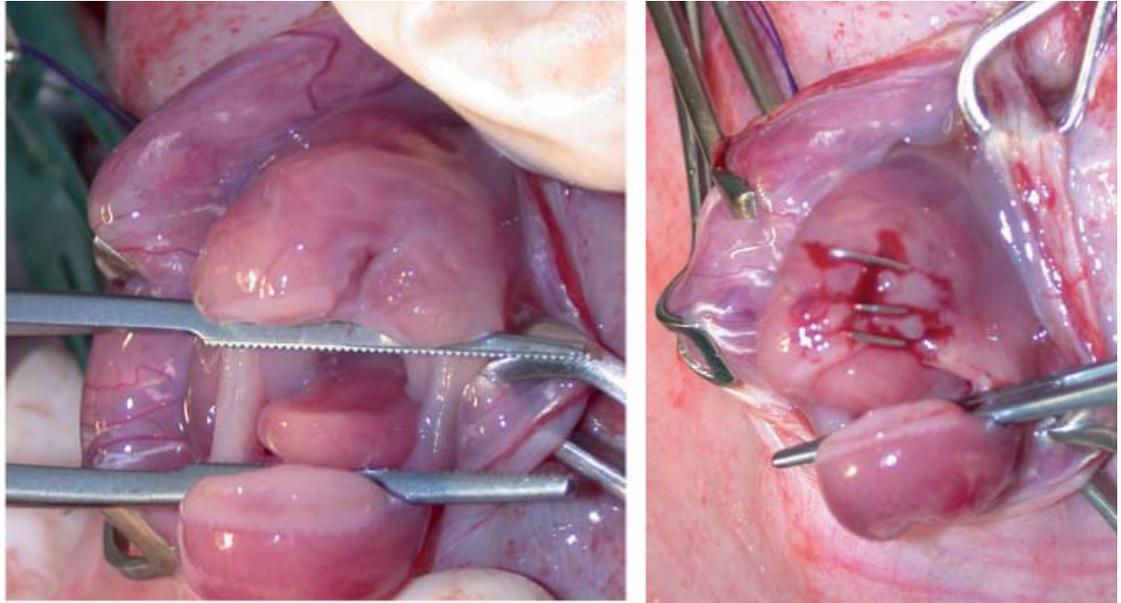


Fig. 132. Reparación precoz del defecto (E75). En otro grupo se realiza grapado del defecto.

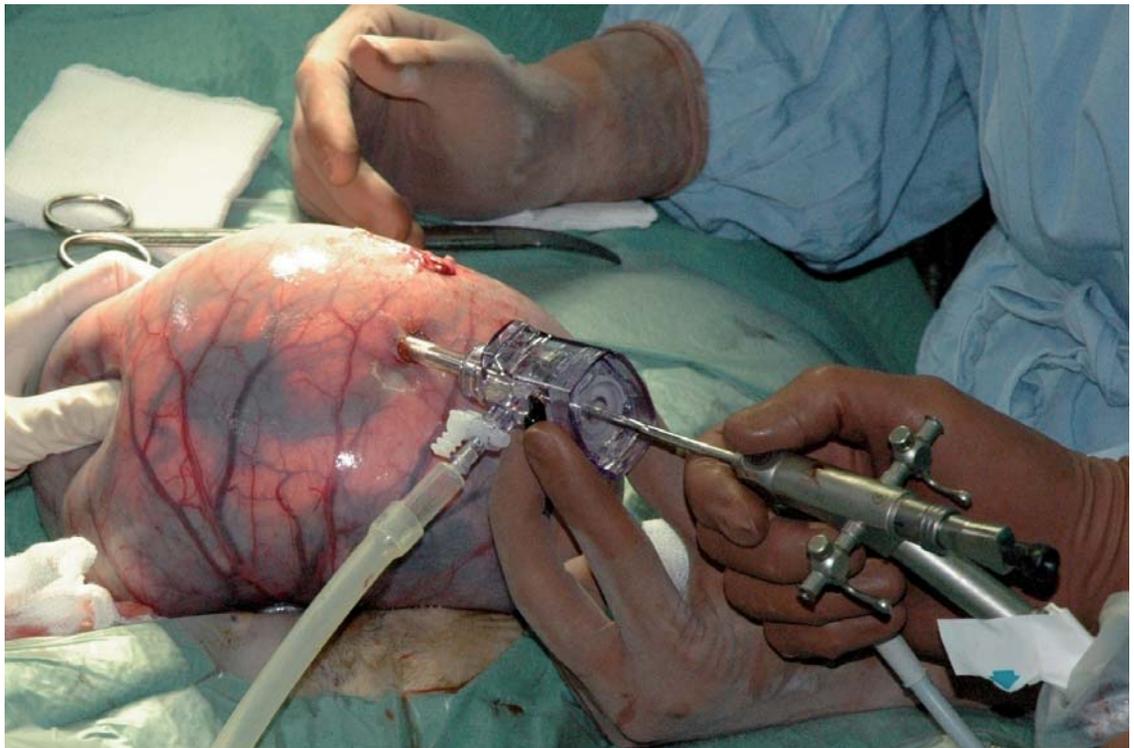


Fig. 133. Acceso intrauterino mediante fetoscopia.

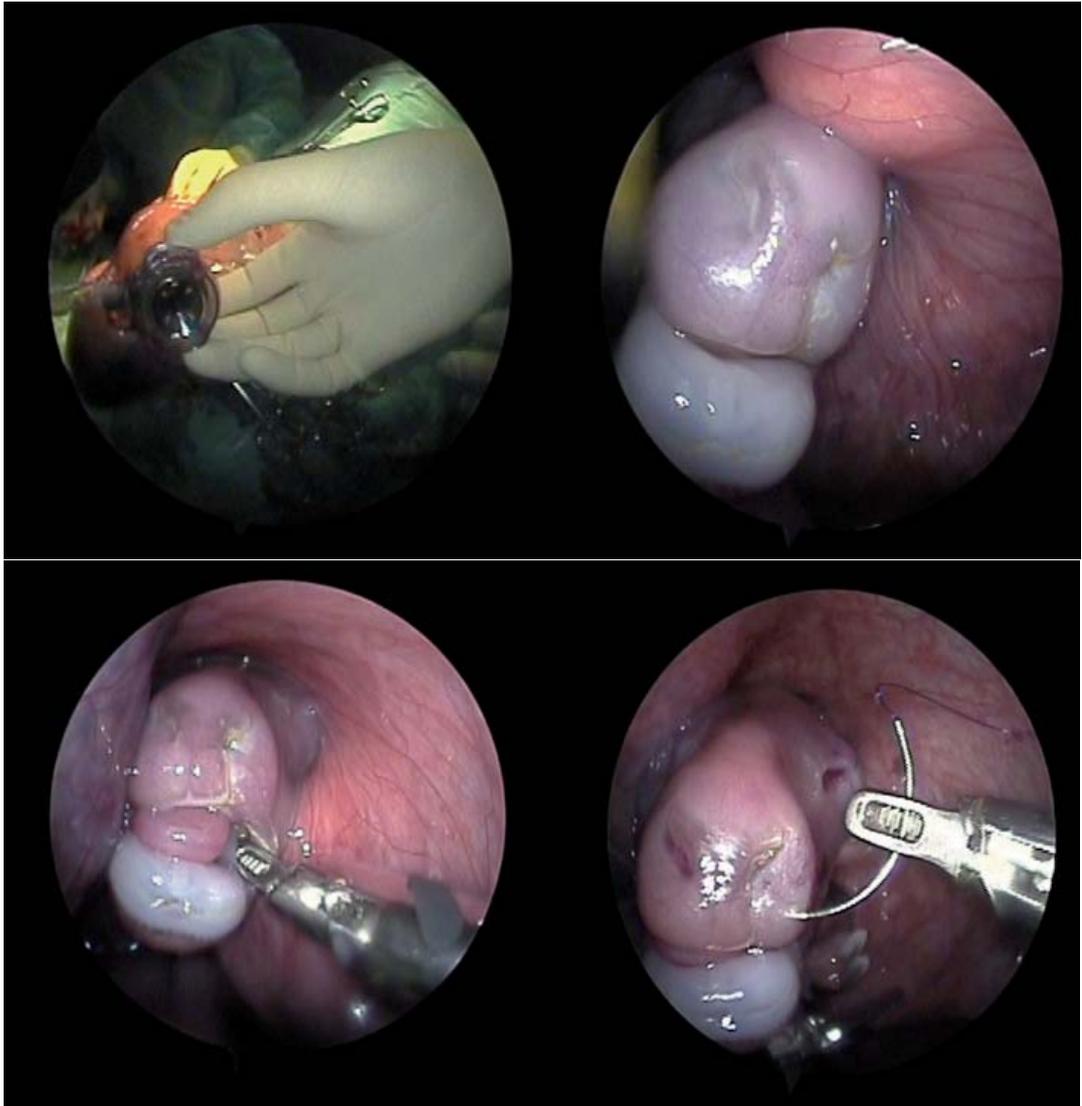


Fig. 134. Reparación precoz del defecto (E75) mediante fetoscopia. Sutura endoscópica.

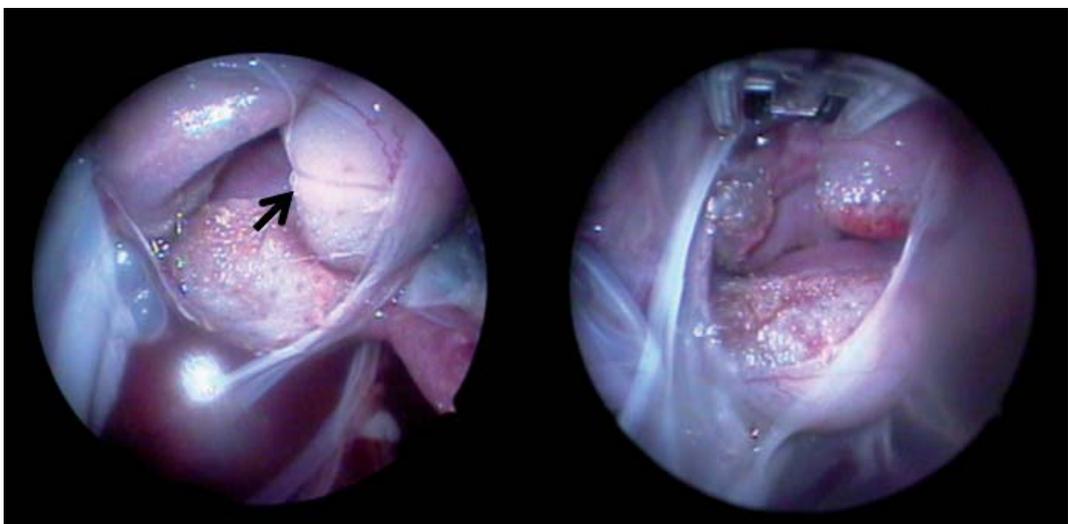


Fig. 135. Reparación precoz del defecto (E75) mediante fetoscopia. Grapado con endo-grapadora.

Reparación de la FLP unilateral en el feto ovino

en un periodo tardío de la gestación (E105)

Se realizó este proceso en 5 fetos ovinos (de los que sobrevivieron 4 fetos y abortó uno) en una etapa precoz de la gestación, entre los 103 y 107 días (E105+/-2), previa comprobación del estado gestante y fetal por ecografía. La mitad se operaron mediante cirugía fetal abierta (Fig. 136) y la otra mitad mediante abordaje fetoscópico. Para la reparación, se refrescaron mínimamente los bordes labiales del defecto con el corte del electrobisturí y se utilizaron 2 puntos de sutura (SUT) en una mitad de los casos (Fig. 137-138) y uso de 2 grapas (STP) aplicadas mediante aplicación directa de una grapadora, en la otra mitad (Fig. 139).

Para la cirugía abierta se utilizó la misma técnica y método de abordaje que en la creación del defecto y la reparación precoz (ver apartado anterior).

Para la fetoscopia, previa exposición uterina, se colocaron de igual forma que en la reparación precoz, 2 puertos de entrada de 5 mm. y uno adicional de 10 mm. El resto de la técnica feto-endoscópica fue igual que la descrita anteriormente. La única diferencia es la mayor dimensión y tamaño del útero gestante y del feto. Además, en la visualización del defecto nasolabial creado 6 semanas antes, se pueden observar aparición de inicios de lana y pelos en la región facial del feto ovino en esta edad gestacional más avanzada (Fig.140-141). Las reparaciones se realizaron también mediante sutura con PDS 4/0 (grupo SUT2) o grapas (grupo STP2).

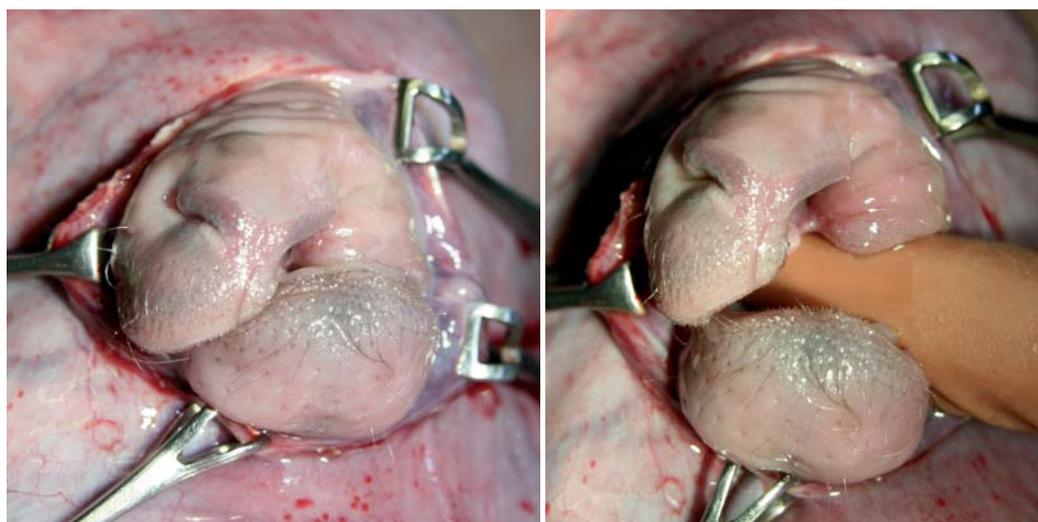


Fig. 136. Reparación tardía del defecto (E105) con cirugía fetal abierta. Exposición hocico fetal.



Fig. 137. Reparación tardía del defecto (E105) con cirugía fetal abierta. Sutura del defecto fetal.



Fig. 138. Reparación tardía del defecto (E105). Defecto fetal suturado.

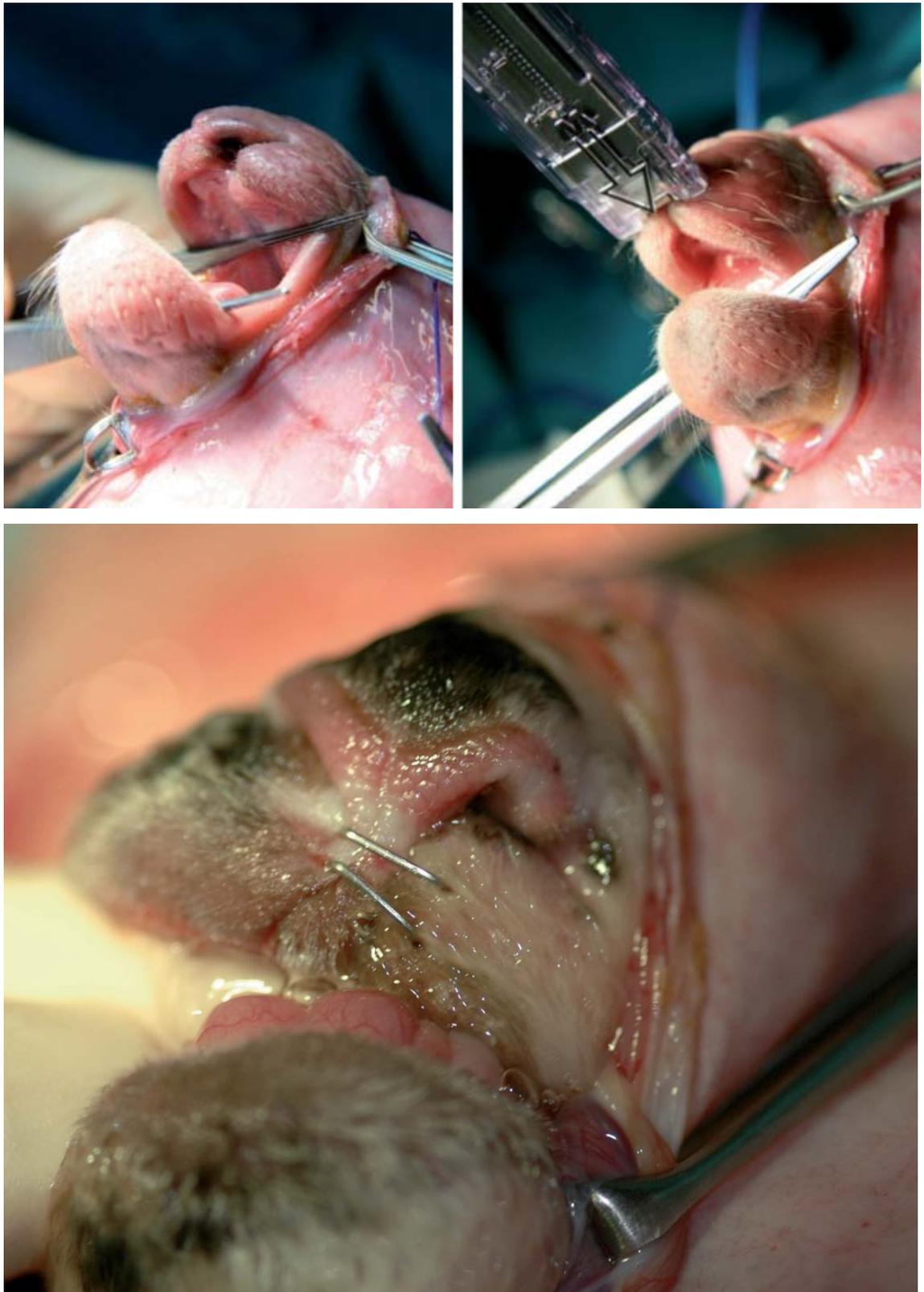


Fig. 139. Reparación tardía del defecto (E105) con cirugía fetal abierta. Grapado del defecto fetal.

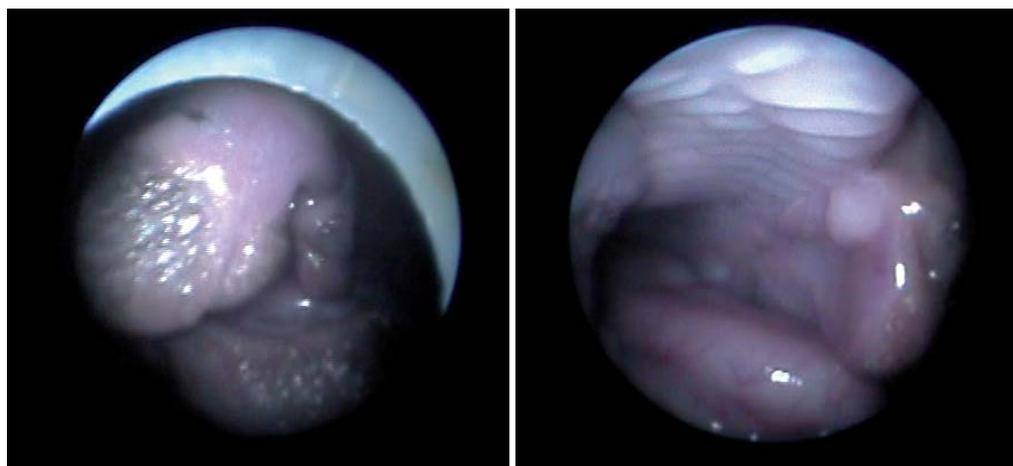


Fig. 140. Reparación tardía del defecto (E105) mediante fetoscopia. Visión del defecto fetal.

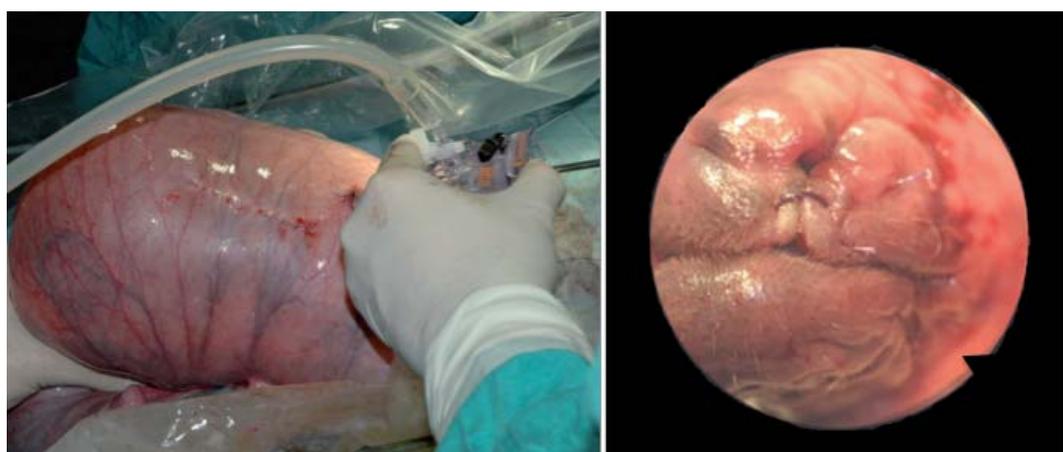


Fig. 141. Reparación tardía del defecto (E105) mediante fetoscopia. Sutura del defecto fetal.

Anestesia en las ovejas gestantes:

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron con anestesia general. Después de la premedicación sedante con una inyección intramuscular (IM) de 0,01 mg/kg de buprenorfina (Buprex[®], Schering-Plough SA) y 0,2 mg/kg de midazolam (Dormicum[®], Roche), el acceso por vía intravenosa (IV) se colocó en la vena cefálica de la pata anterior con una Abocath de 20 G. Las ovejas preñadas fueron pre-oxigenadas con mascarilla facial y se administró propofol IV 4mg/kg (Propofol[®]-Lipuro 1%, BBraun Melsungen AG) para la inducción anestésica.

Se prepara el tubo endotraqueal (9-13mm) según tamaño del animal, comprobando previamente a integridad del balón. Ayudamos a la persona que intube abriendo la boca del animal mediante dos cuerdas o gasa desplegadas. Si aparece reflejo laríngeo administrar otro bolus de propofol. Una vez introducido el tubo (Fig. 143), comprobar que esté en tráquea con buena expansión de ambos pulmones al conectar el ambu y accionar unas cuantas inspiraciones. Se hincha el balón y se fija el tubo con una venda.

Se protegen los ojos cubriéndolos con pomada Methocel 2%. Esto evita la irritación conjuntivo-corneal que el agente inhalatorio o la corriente de oxígeno al

100% puede ocasionar.

Después de la intubación endotraqueal, la anestesia general se mantiene con isoflurano 2% (Isoflo, Abbott Laboratories Ltd.) en oxígeno al 100% (1,5 L / minuto). Nosotros preferimos el mantenimiento de la anestesia con gases pero se podría hacer por TIVA (anestesia total intravenosa). Se coloca una sonda esofágica para prevenir la distensión ruminal. Se administró una infusión continua de Ringer-lactato (Ringer-Lactato, BBraun Melsungen AG) a 10ml/Kg/h durante la cirugía. La monitorización durante la cirugía consistió en electrocardiografía, oximetría de pulso, presión arterial no invasiva y capnografía.

Anestesia - Analgesia fetal:

Para evitar el dolor o sufrimiento fetal, una vez expuesto el feto, se administra una inyección IM, en deltoides o cuello, de atropina (20µg/kg), fentanilo (10µg/kg) y bromuro de vecuronio (20µg/kg). La atropina protege de la bradicardia fetal.

Analgesia de la oveja gestante:

Todos los animales recibieron analgesia para el alivio del dolor postoperatorio mediante un parche de 100 microgramos de fentanilo transdérmico (Durogesic[®], Janssen Laboratories). Se detectan concentraciones plasmáticas de fentanilo a las 2 horas tras la aplicación del parche, aunque no es hasta después de las 8 horas cuando se observan sus plenos efectos. La concentración plasmática mínima efectiva se encuentra entre 1-1,5 ng.mL-. Debido al retraso en la absorción, para conseguir concentraciones plasmáticas efectivas en el periodo postoperatorio inmediato el parche debería ser aplicado de 12 a 18 horas antes de la intervención quirúrgica. Tras la retirada del parche, el control del dolor continúa entre 12 y 24 horas.

Las limitaciones de los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) incluyen lesión renal, hipotensión grave perioperatoria y riesgo de hemorragia. No deben administrarse más de 3 dosis consecutivas. Se puede reforzar la analgesia intra y postoperatoria con con Metamizol magnésico: a 1g para 30kg y 2g para 60kg IV o IM (cada 8 horas), solo en casos aislados, ya que los AINE pueden producir lesión renal.

La **eutanasia** en la oveja se realiza cuando decidimos terminar el proyecto experimental. Para ello se tranquilizó al animal y se le aplicó una monodosis de 2 gramos de thiopental.

Profilaxis antibiótica:

Para la profilaxis de infección perioperatoria, los animales recibieron una dosis única de 22 mg/Kg IV de ceftriaxona (Ceftriaxona Normon[®], Normon Laboratories) en el tiempo de inducción y otra dosis de 15mg/kg IM de amoxicilina (Duphamox LA, Fort Dodge) en el día postoperatorio siguiente.



Fig. 142. Inducción de la anestesia en la oveja gestante con propofol y halogenados.



Fig. 143. Intubación en la oveja gestante.



Fig. 144. Oveja gestante intubada. La anestesia se mantiene con isoflurano 2%.



Fig. 145. Se rasura el abdomen en la oveja gestante.



Fig. 146. Se lava y enjabona todo el abdomen en la oveja gestante.

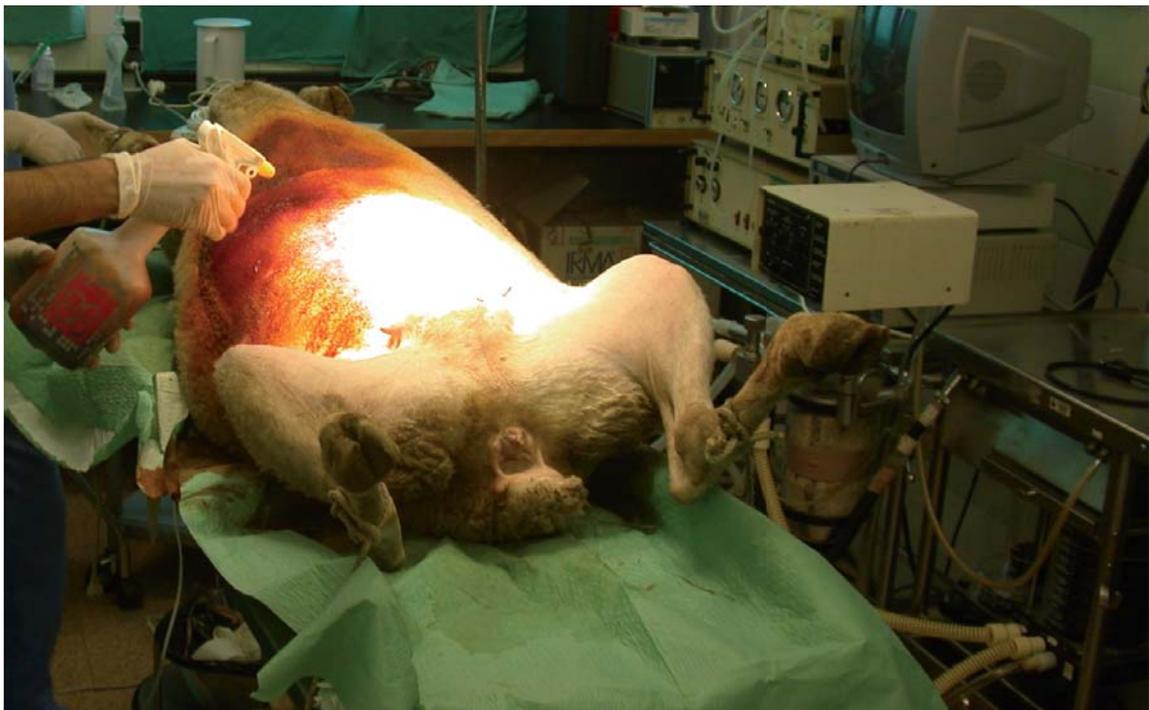


Fig. 147. Se pinta con povidona iodada todo el abdomen en la oveja gestante.

Protocolo de supervisión animal durante la estabulación y el periodo postoperatorio.

Se controlaron durante toda la gestación, mediante supervisión diaria y peso semanal, atendiendo al control de:

- Aspecto general: bueno vs postración,
- Temperatura rectal: para detectar si tiene fiebre
- Estado de la laparotomía y de las suturas: descartar infección, etc.
Se limpiaron y desinfectaron 1 vez al día
- Hemorragias: si-no (posibilidad de abortos) y control abortos.
- Postura: normal-anormal
- Tiempo de perfusión gingival: <1-2", 1-2", >1-2"
- Color de las mucosas ocular, bucal: rosadas, blanquecinas o violáceas.
- Frecuencia y tipo de respiración: taquipnea-bradipnea / distress.
- Frecuencia y valoración del latido cardiaco: taquicardia-bradicardia.
- Comportamiento no provocado: si rumia o no, movilidad, nivel de alerta.
- Vocalizaciones y comportamiento a estímulos externos.

Se controla si la oveja muestra cualquier alteración de los parámetros y en consecuencia se le aplicará una medida correctora que dependiendo del caso podrá ser un tratamiento analgésico más intenso, tratamiento antibiótico o sacrificio.

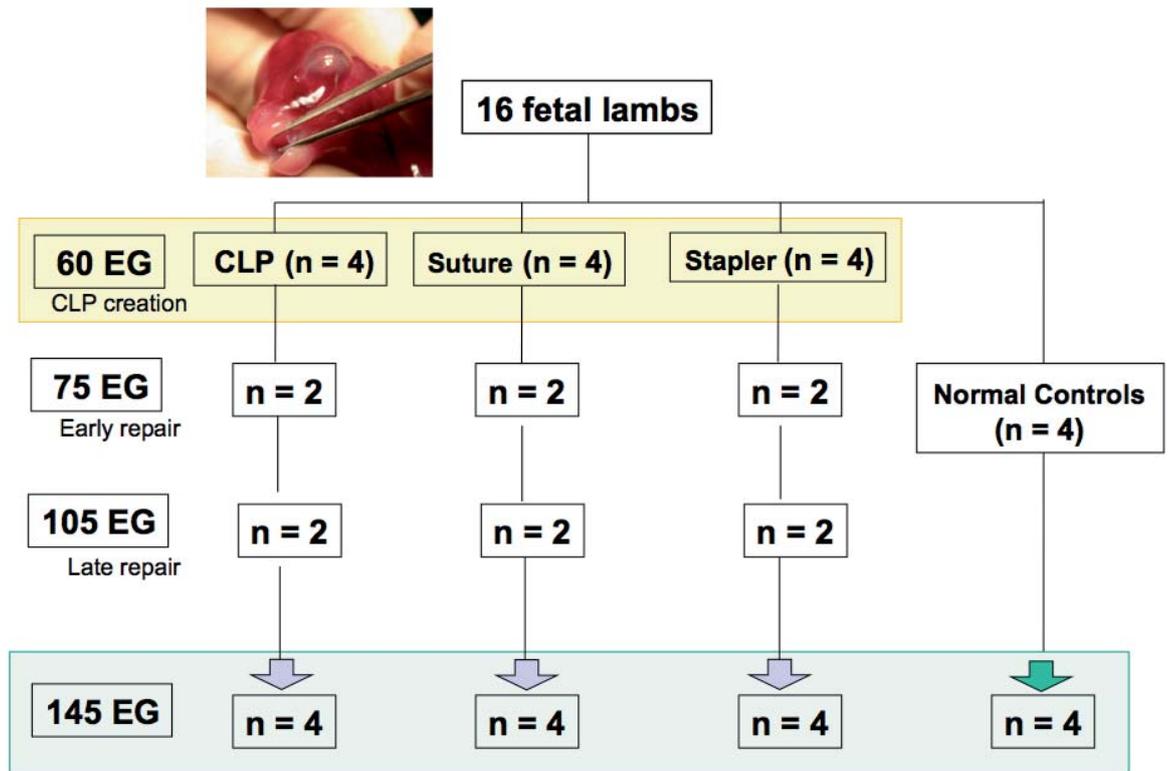
Si se hubiesen observado posturas anormales (espalda curvada o inmovilidad), taquipnea y taquicardia, entonces se pautará otra dosis de analgésico. Si la temperatura rectal sobrepasa la normalidad: 39°C se iniciaría un tratamiento antibiótico.

Se controló la posibilidad de aborto. Puede producirse una reabsorción del feto, sin ser expulsado de la cavidad uterina, adoptando un estado de momificación, o una expulsión completa del feto al exterior por vía vaginal. Como signo de sospecha se puede producir una pequeña descarga vaginal sanguinolenta. Las ovejas que aborten tras la primera o la segunda intervención serán eutanasiadas.

Además del aborto, los otros criterios de punto final son el proceso séptico que no responda a desbridamiento quirúrgico y/o antibioterapia, y el shock hipovolémico que no responda a medidas de reposición.

Parto por cesárea para obtención de los fetos a término (E145).

Se dejaron llegar a término (E145) todos fetos ovinos afectados de labio leporino inducido quirúrgicamente, reparado o no reparado. Tras el nacimiento por cesárea, los fetos se sacrificarán, mediante sobredosis de pentobarbital (200 mg/kg) por vía venosa del cordón umbilical, según las recomendaciones de la Unión Europea publicadas para la eutanasia de los animales de experimentación (Andrews et al., 1993; Close et al. 1997), para su posterior análisis y estudio.



Estudio de los resultados.

Se realizará un análisis comparativo de los resultados en los distintos grupos Normal, SUT1, SUT2, STP1, STP2, y LUT, mediante el tratamiento estadístico de los datos obtenidos (U de Mann-Whitney), para establecer diferencias significativas. Se utilizó el programa SPSS 14.0.

Existen múltiples factores que pueden conducir a la pérdida de alguno de los fetos ovinos (tasa de abortos 40-50 %). Por ello, en el caso de pérdida de alguno de los fetos sujetos a estudio en cualquiera de los grupos, se repetirá el procedimiento, con la idea de mantener el número de fetos de cada grupo.

1.- **ANÁLISIS CEFALOMETRICO.** Se practicarán fotografías (frente, axial y laterales), tomografía computarizada (reconstrucción tridimensional) y preparación en moldes de impresión con alginato y escayola. Se tomarán medidas milimétricas de los puntos maxilares y cefalométricos de referencia.

Las imágenes tomográficas (TC) axiales fueron tomadas con un plano resolución promedio de 0,15 mm² y un grosor de corte de 1 mm. Las imágenes se tomaron en tres dimensiones (3D) reconstruidas y renderizadas usando software VOXELMAN, un medio para crear y explorar modelos virtuales basados en datos de volumen.



Fig. 148. Realización de TC en las cabezas de los corderos nacidos en todos los grupos.

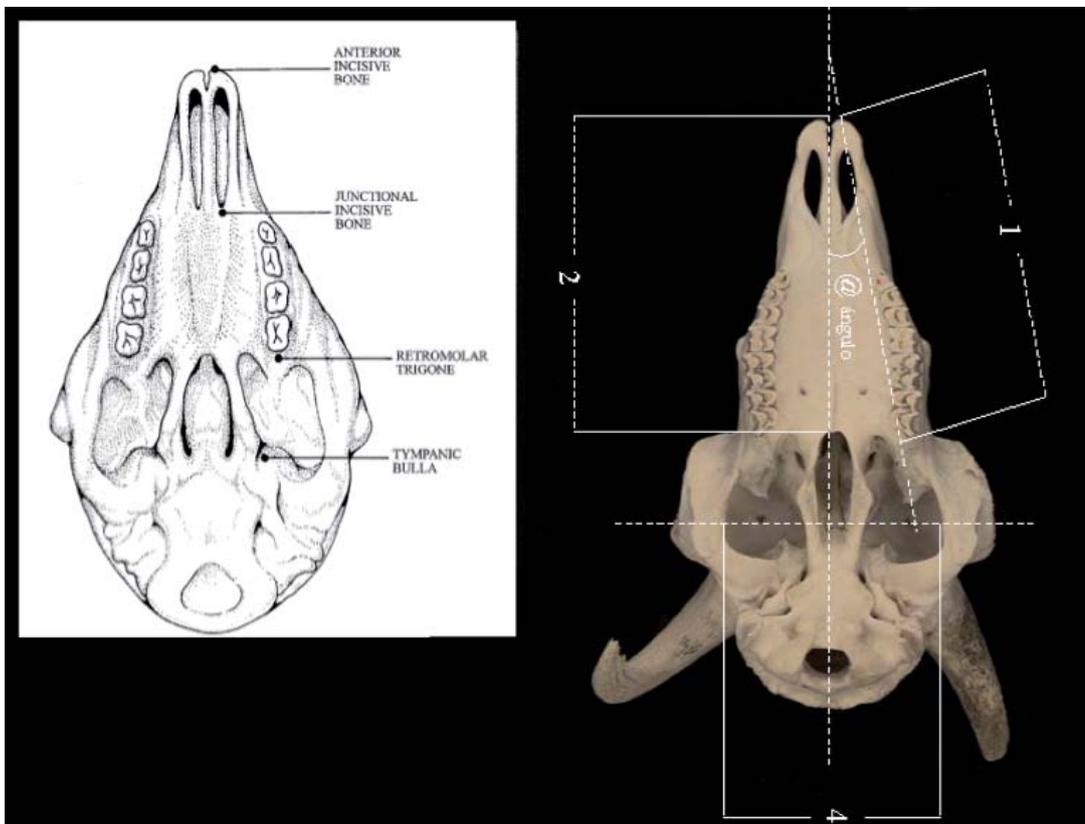


Fig. 149. Puntos de referencia anatómicos (*landmarks*) y distancias en el cráneo de la oveja.

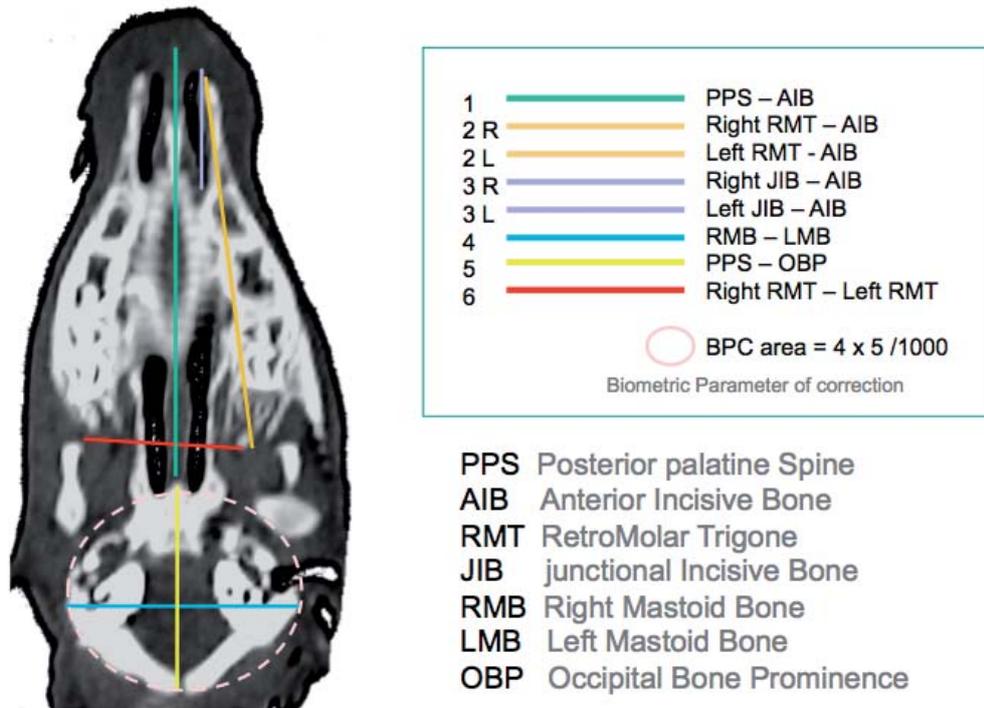


Fig. 150. Puntos de referencia anatómicos (*landmarks*) y distancias escogidas para la medición cefalométrica en la TC en el cráneo de los corderos de todos los grupos.

Los materiales de impresión (alginatos o siliconas) se preparan mezclando dos componentes, de tal forma que se obtenga una pasta homogénea.

Al polvo de alginato se le agregan 20 ml de agua y después hay que batir suavemente e incrementar la velocidad para que no entre aire. Para esto se utiliza una especie de mortero blando, llamado taza de hule, y una espátula (Fig.151). Posteriormente se pone en un vibrador por 15 segundos para sacar cualquier burbuja de aire residual.

Esta pasta, una vez colocada en las cubetas de impresión, se irá fraguando y endureciendo hasta quedar en estado completamente sólido. Existe, en este momento, un corto periodo de tiempo para su utilización. Una vez que fragua completamente y se retira de la boca del cordero, y ya se ha obtenido la impresión alveolo-palatina. Dado que el fraguado es una reacción exotérmica, se libera calor en la primera etapa, y cuando se haya enfriado el material significa que ha llegado la segunda etapa del fraguado y se puede retirar. Para mejores resultados deja secar 24 horas ya que esto aumentará sus propiedades de resistencia y dureza.

A partir de estas impresiones palatinas y mediante el proceso de vaciado o positivado de las mismas, se obtienen los modelos de escayola (Fig. 152).

Las impresiones tienen un periodo de uso, debiéndose vaciar en escayola lo antes posible, antes que se degraden.



Fig. 151. Preparación de los moldes de impresión mediante alginato en la cubeta de impresión. La mezcla del alginato en taza de hule y espátula para yeso.



Fig. 152. Alginato en la cubeta de impresión. Molde de escayola con la impresión alveolo-palatina.

2.- PREPARACIONES HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO.

Se resecaron el labio superior para su análisis microscópico con tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. Se comprobará la integridad de las distintas capas del labio ovino y la presencia o ausencia de respuesta inflamatoria y cicatrización en los distintos grupos.

Se tomaron los bloques del hocico, excluyendo lengua y mandíbula, incluyendo la mitad anterior del paladar y cavidad nasal, y por supuesto, todo el alveolo y labio superior (Fig. 153-155).

A partir de estos bloques fijados en formol al 10 % durante más de 48 horas, y de un descalcificador durante 10 minutos para ablandar las estructuras osteo-cartilaginosas, se procedió a cortar las piezas en secciones coronales y, en otros, transversales (Fig.154).



Fig. 153. bloques del hocico ovino incluyendo parte del paladar.

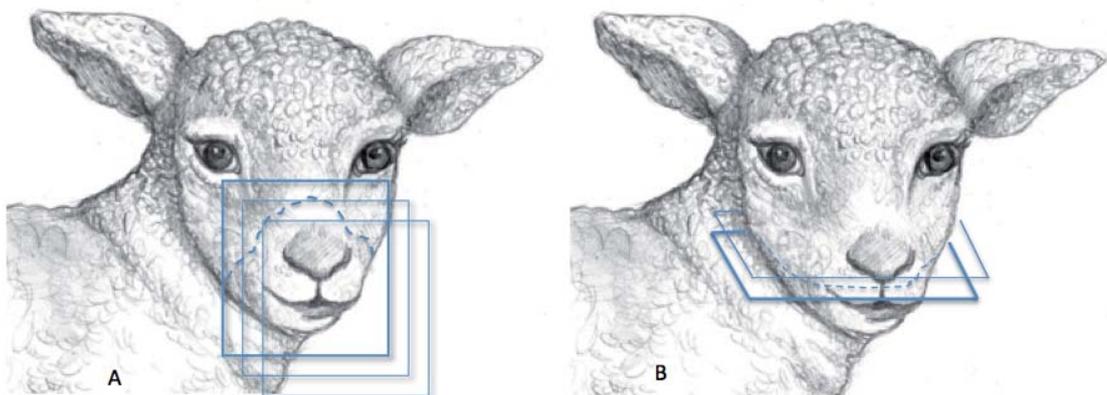


Fig. 154. Secciones coronales (A) y transversales (B) de los bloques del hocico ovino.

Las muestras de tejido palato-labial obtenidas de los cortes coronales (Fig. 156) y transversales realizados sobre un bloque de los hocicos de los corderos en

todos los grupos (Fig. 157) se fijaron en formalina (formol al 10%), previa aplicación de un agente decalcificador (Histofix, descalcificador 3DC) durante 10 minutos. Ello permitió obtener varias secciones que se separaron y protegieron en cajetillas enrejilladas o moldes de inclusión (Fig. 158), para posteriormente proceder a la parafinación, creando varios bloques de parafina. Es importante rotular debidamente todas las cajetillas con lápiz de grafito, y rotulador permanente, para evitar que se borre o enturbie por la acción del formol. Posteriormente fueron cortados por técnica de microtomía y teñidos en las láminas de vidrio (portaobjetos) que fueron etiquetadas y rotuladas de forma adecuada para identificar los distintos cortes en distintos sujetos de cada uno de los grupos. Las muestras de paladar y labio parafinadas se cortaron en el micrótopo (Leica, SM 2010R) en finas secciones de 10 μm y se recogieron en portaobjetos pre-tratados con poli-L-lisina al 0,1% (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, Spain).



Fig. 155. Bloques del hocico en corderos con FLP unilateral no reparada (grupo LUT).



Fig. 156. Sección coronal del bloque nasolabial (hocico) en el grupo LUT.

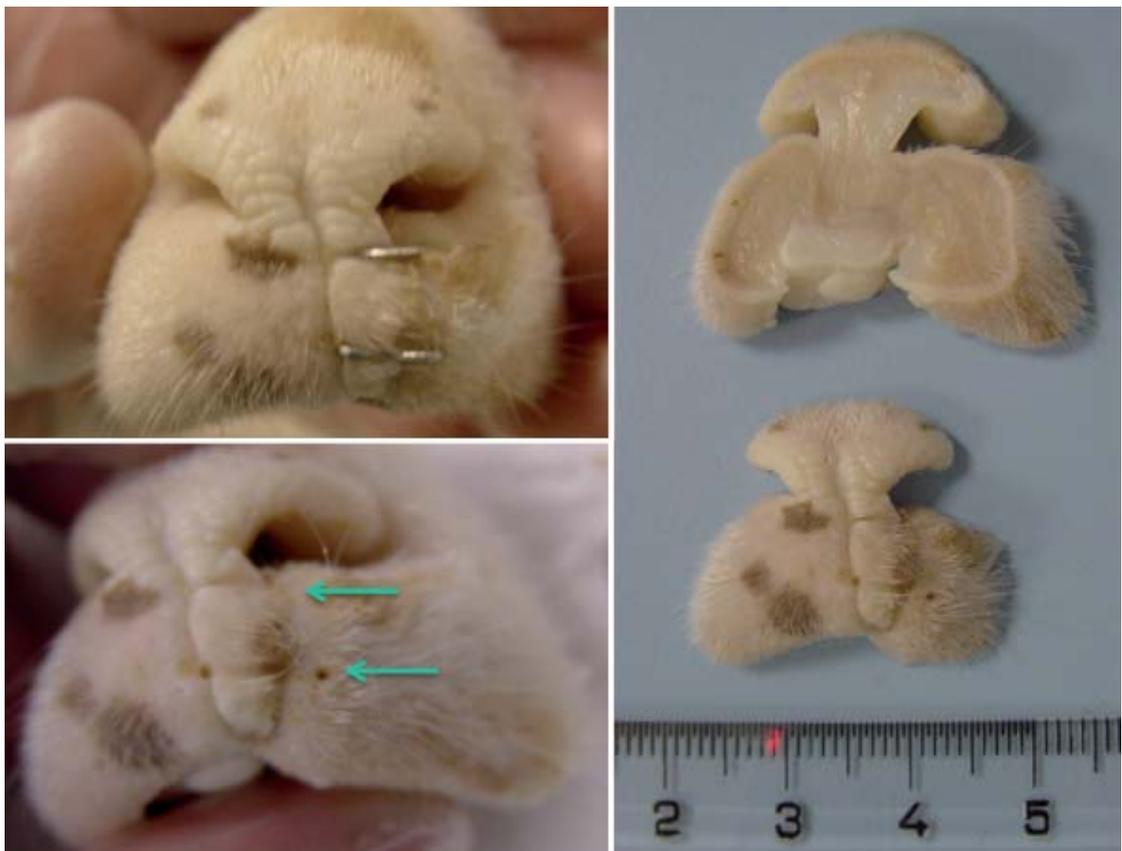


Fig. 157. Secciones labiales coronales previa extracción de las grapas en los corderos del grupo STP. Véase el detalle de los orificios del grapado y la impronta de la cicatriz de unión.



Fig. 158. Secciones labiales a distintos niveles en cajetillas enrejilladas debidamente rotuladas.

Las muestras de labio y paladar parafinadas en bloques, se cortaron en el micrótopo (Leica, SM 2010R) en secciones de 10 μm y fueron montadas en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina al 0,1% (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, Spain).



Fig. 159. Microtopo y secciones en el portaobjetos etiquetado.

TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Las secciones de paladar se tiñeron con hematoxilina-eosina; para ello fueron sumergidas durante 10 segundos en hematoxilina y lavadas con agua, después se introdujeron 5 segundos en eosina y se lavaron con agua. Seguidamente, se deshidrataron mediante un gradiente de alcoholes (70%-70%- 90%-100%- 100%) dejándolos 1 minuto en cada uno de los alcoholes, para finalizar la deshidratación se lavaron en xileno durante 15 segundos. El montaje final se realizó con medio de montaje DPX y un cubreobjetos.

La solución de Hematoxilina fue comprada en Sigma (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España). La solución de eosina fue preparada justo antes, se disolvieron 0,2 g de eosina Y (Merck, Darmstadt, Germany) en 100mL etanol RNAsa-free acidificado con 0,4mL de ácido acético glacial (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España). El etanol absoluto y el xileno fueron obtenidos de Panreac (Panreac Quimica SA, Barcelona, España).

Posteriormente, las muestras histológicas se observaron en un microscopio de luz visible (OLYMPUS) y se tomaron fotos de las diferentes zonas de interés a 40 aumentos.

TINCIÓN TRICRÓMICO DE MASSON

Para la tinción de Masson se sumergieron primeramente, en una solución de hematoxilina durante cinco minutos, después, se lavaron en agua durante cuatro minutos. Posteriormente, las muestras se introdujeron en la solución de tricrómico de Masson durante 9 minutos y se lavaron en una solución de ácido acético al 0,2%. Para continuar, las muestras se sometieron a un gradiente de deshidratación

en alcoholes (90%-100%-100%) y en xileno. La tinción se finalizó con el medio de montaje DPX sobre la muestra y un cubreobjetos.

La solución de tricrómico fue obtenida en Merck (100485, Merck, Madrid, España) y el ácido acético de la casa comercial Panreac (211008, Panreac, Madrid, España). La solución de Hematoxilina fue comprada en Sigma (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, España) . El etanol absoluto y el xileno fueron obtenidos de Panreac (Panreac Química SA, Barcelona, España).

Las muestras se observaron en un microscopio de luz visible (OLYMPUS) y se tomaron fotos de las diferentes zonas de interés a 40 aumentos.

INMUNOFLUORESCENCIA

Las secciones labio-paladatinas se desparafinaron mediante una gradiente de hidratación (xileno, xileno, 100%, 100%, 90%, 70%, 50%, agua) introduciéndose un minuto en cada solución. Después, se desenmascaró el antígeno hirviendo las secciones durante 15 minutos en tampón citrato a pH 6. Una vez las muestras estuvieron frías se bloquearon con una solución de PBS-BSA al 3% durante 10 min manteniéndolas en una cámara húmeda.

El anticuerpo primario utilizado estaba específicamente dirigido contra el **colágeno de tipo 1** (ab292, Abcam, Madrid, España) diluido 1/100 veces en solución de PBS-BSA al 3% y se incubó en la cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario se lavó con PBS 1X tres veces de 10 minutos cada lavado. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario, Alexa Fluor® 488 anti-rabbit (A-11008, Invitrogen) diluido 1/1000 veces en solución de PBS-BSA al 3%, la incubación duró 1 hora en la cámara húmeda y a temperatura ambiente.

El anticuerpo secundario también se lavó tres veces, de 10 minutos cada uno con PBS 1X. Posteriormente se secó cuidadosamente el portaobjetos, se montó con medio de montaje Fluoromount G (Southern Biotech) y se colocó un cubreobjetos sobre la muestra.

Finalmente, las muestras fueron observadas y fotografiadas en el microscopio de fluorescencia (Olympus, BX-61) a 40 aumentos.

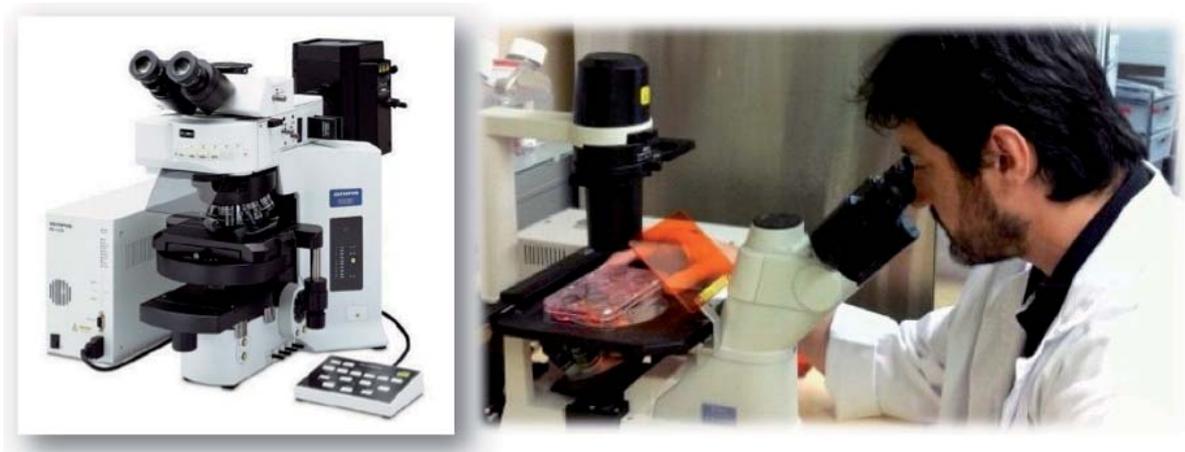


Fig. 160. Microscopio de fluorescencia Olympus BX-61.

INMUNOHISTOQUÍMICA DE ACTINA MUSCULAR TOTAL

Estas finas secciones se desparafinaron mediante un gradiente de de hidratación (xileno, xileno, 100%, 100%, 90%, 70%, 50%, agua) introduciéndose un minuto en cada solución.

Después, se desenmascaró el antígeno hirviendo las secciones durante 15 minutos en tampón citrato a pH 6. Una vez las muestras estuvieron frías se bloquearon con una solución de PBS-BSA al 3% durante 10 min manteniéndolas en una cámara húmeda.

El anticuerpo primario utilizado estaba específicamente dirigido contra la **actina del músculo esquelético** (PA1-37019, Pierce antibodies, Madrid, España) diluido 1/100 veces en solución de PBS-BSA al 3% y se incubó en la cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario se lavó con PBS 1X tres veces de 10 minutos cada lavado. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario, anti-IgG rabbit (NA 9340, GE Healthcare) diluido 1/1000 veces en solución de PBS-BSA al 3%, la incubación duró 1 hora en la cámara húmeda y a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario está unido a la enzima peroxidasa; utilizando como sustrato el sustrato 3,3' diaminobencidina se reveló el producto de la reacción que al oxidarse formó un producto marrón insoluble.

Para finalizar la inmunohistoquímica la tinción se montó con medio de montaje DPX y un cubreobjetos.

Las muestras fueron observadas en un microscopio de luz visible (OLYMPUS) y se tomaron fotos de las diferentes zonas de interés a 40 aumentos.

3.- ANALISIS ESTADÍSTICO.

Todas la medidas calculadas en las cefalometrías, tomadas en milímetros, de forma informatizada por el computador se recogieron en un archivo Excel que acumuló las mediciones cefalométricas tomadas en todas las cabezas de los corderos de todos los grupos.

Los resultados se trataron con un análisis descriptivo de la muestra y estadístico con el **programa SSPS 15.0** y con el **programa R - versión 2.15.3** (que se actualiza cada 6 meses). El programa estadístico "R" es un proyecto de software libre, resultado de la implementación del premiado lenguaje "S", que se ha desarrollado en los Laboratorios Bell (antes AT & T, ahora Lucent Technologies) por John Chambers y colaboradores.

R y S-Plus (versión comercial de S) son, probablemente, los dos lenguajes más utilizados en investigación por la comunidad estadística, siendo además muy populares en el campo de la investigación biomédica, la bioinformática y las matemáticas financieras. "R" es un lenguaje de programación estadístico-

matemático. Tiene muchas ventajas porque es muy versátil, potente,... y además es libre.

En nuestro análisis tenemos cuatro condiciones experimentales, que corresponden a los 4 grupos de estudio. En cada uno de ellos tenemos cuatro ovejas, que se muestran como independientes, es decir, todas las ovejas son diferentes, o dicho de otra manera, las ovejas del grupo A no son las que hay en el grupo B. Entonces, cuando la muestra de individuos en el grupo A es independiente de la muestra de individuos en el grupo B, y queremos ver si son diferentes estadísticamente, con una prueba no paramétrica usaremos el **test de U Mann-Whitney**. Sin embargo, si fueran dependientes (o apareados, el individuo se mide antes (grupo A) y después (grupo B) del tratamiento), deberíamos usar el test de Wilcoxon.

Dado que las ovejas siempre eran distintas, usamos la prueba de Mann-Whitney para testar todas las comparaciones dos a dos, tras **el test de Kruskal-Wallis**. Es decir, para las pruebas post-hoc (los test dos a dos) se ha usado **la U de Mann-Whitney**.

