

11209



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO SS.

FACTORES DE CICATRIZACION PLAQUETARIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALIDAD EN CIRUGIA GENERAL
P R E S E N T A:
DR. DIONISIO GARCIA SALAZAR

GENERACION: 1987-1991

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
DIRECCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION MEDICA



FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

	página
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	2
3. Objetivo General	4
4. Justificación	5
5. Hipótesis	5
6. Objetivos particulares	6
7. Metodología	6
8. Resultados	9
9. Análisis de resultados	10
10. Conclusión	12

INTRODUCCION

Recientemente se han descubierto los fenomenos mas intimos de los mecanismos del proceso de cicatrización en el cual, uno de los principales actores son los factores de cicatrización plaquetarios los cuales son responsables de iniciar los complejos mecanismos enzimáticos y celulares de este proceso.

En 1986 Knigton y cols. reportan el uso de los factores plaquetarios autólogos en el manejo y tratamiento de enfermos con úlceras crónicas con resultados muy atractivos. Desafortunadamente el uso de factores autólogos implica una gran infraestructura hospitalaria y grandes costos por paciente.

Una alternativa a este método es la posibilidad de utilizar factores de cicatrización plaquetarios heterólogos, con los cuales se abre un campo nuevo a la investigación.

El siguiente estudio pretende demostrar la actividad biológica de los factores plaquetarios de cicatrización heterólogos en un modelo experimental animal.

MARCO TEORICO

En la reparacion de una herida la regulacion bioquimica celular v ambiental involucra una compleja interaccion de cascadas enzimaticas sericas. factores de crecimiento de accion local. plaquetas v monocitos circulantes. macrofagos tisulares. fibroblastos. celulas endoteliales. celulas epidermicas v el microambiente celular. En estudios recientes se ha demostrado que en la cicatrizacion de las heridas el papel regulatorio se debe a las plaquetas que son la primera linea en el proceso regulatorio de la cicatrizacion y a los macrofagos tisulares que son los que toman el control de la cicatrizacion de la lesion v continuan con esta actividad hasta que la reparacion esta completa.

Al existir una lesion que interrumpa la integridad de los tejidos v conecuentemente de los capilares del area. se pone en marcha la cascada de la coagulacion; las plaquetas al ser activadas por la trombina liberan factores de cicatrizacion derivados de plaquetas (FCDP) los cuales inician la respuesta tisular conectiva al provocar la division y la migracion de los fibroblastos y la formacion de nuevos capilares. Los monocitos se convierten en

macrófagos de la herida al migrar dentro del espacio de la herida. Este medio ambiente hipóxico es un potente estímulo para la producción del factor angiogenico derivado de macrófagos (FADM), además de otras señales bioquímicas o ambientales estimulan la producción de factores de cicatrización derivados de macrófagos (FCDM). Estos dos factores continúan estimulando la migración y división de los fibroblastos y favorecen la síntesis de macromoléculas estructurales. El resultado final de esta compleja interacción es la transformación de un tejido conectivo en reposo en una área de intenso movimiento celular, división y biosíntesis los cuales dan como resultado el cierre del espacio de la herida con una malla de colágeno neovascularizado. La formación de tejido de granulación es seguida por la migración y división epidérmica la cual cubre la malla vascular de colágeno con piel nueva.

Los avances recientes en biología de los factores de cicatrización local y en la tecnología han delineado el papel de estos potentes bioquímicos en el proceso de cicatrización. En la reparación de una herida las dos fuentes de estos factores son las plaquetas y los macrófagos de la herida. Las plaquetas liberan factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor angiogénico derivado de

plaquetas (FADP), factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas (FCDP) y factor plaquetario 4. El FCDP es un potente mitógeno de fibroblastos y quimiotáxico, el FADP causa nueva formación capilar a partir de la microvasculatura existente, el FCDP ya ha sido descrito pero está todavía pobremente caracterizado, por último el factor 4 es un quimiotáxico de neutrófilos.

Recientemente el grupo de Knighton se ha avocado a aprovechar las propiedades de los FCDP en el tratamiento de heridas crónicas en diversos grupos de pacientes de alto riesgo (diabéticos, con enfermedad vascular periférica, nefropatas, etc.) obteniendo resultados satisfactorios, con cicatrización completa de las lesiones crónicas (una de ellas hasta de 1800 semanas de evolución) en un promedio de 10 semanas. Con anterioridad el mismo grupo demostró la actividad de estos factores a nivel experimental en animales, en todas las ocasiones utilizando exclusivamente FCDP Autólogos. En la literatura universal hasta el momento no existen reportes del uso de factores de FCDP Heterólogos en estudios experimentales o clínicos.

OBJETIVO GENERAL

La actividad de los FCDP autólogos ya se ha

demostrado y dadas las características de los mismos es factible reproducir estos resultados con FCDP heterólogos sobre un modelo de investigación similar al desarrollado por Knighton y su grupo para valorar su actividad y las posibles reacciones secundarias adversas en un modelo de experimentación animal.

JUSTIFICACION

Comprobar que los FCDP heterólogos poseen una actividad biológica similar a los autólogos abre la puerta a nuevos horizontes en el terreno de la investigación y aplicación clínica, ya que hasta ahora el uso de los FCDP autólogos, aunque con buenos resultados, es limitado por las dificultades técnicas y de infraestructura que se requieren para el tratamiento de heridas crónicas o en los posibles beneficios en el manejo de heridas recientes quirúrgicas o traumáticas en pacientes con riesgo elevado de presentar problemas de cicatrización incluso en aquellos que estén libres de patología de fondo. Además los FCDP heterólogos no tendrían los inconvenientes que poseen los preparados hemáticos humanos lo cual hace posible su producción en masa para la difusión de su uso.

HIPOTESIS

Los FCDP heterólogos tienen la misma actividad

biologica que los autólogos.

Dada su naturaleza glucoproteica de bajo peso molecular las posibles reacciones secundarias serán minimas o nulas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Valorar la actividad biologica de los FCDP heterologos en modelo de experimentación animal y compararla con los reportes de estudios previos de FCDP autólogos.

Valorar la aparición de reacciones secundarias derivadas de su uso.

METODOLOGIA

Para la realización del estudio se creó un modelo experimental animal similar al utilizado por Knigton et al en su reporte de 1982, en el cual se demostró la actividad biológica de los FCDP autólogos en corneas de conejos. En nuestro estudio se utilizaron FCDP procedentes de borregos.

Se estudiaron 10 conejos raza Nueva Zelandia Blancos a 8 de los cuales se les aplicó en la cornea los FCDP Heterólogos provenientes de un cordero raza Ovis Aries, los 2 conejos restantes formaron el grupo testigo a los cuales se les aplicó la sustancia buffer en que se diluyeron los FCDP de cordero.

Se valoró el grado de neovascularización producido por FCDP heterólogos en corneas en conejos utilizando el esquema de graduación propuesto por Knighton y Cols. de 0 a +4 de la siguiente manera:

- 0 = Ningún crecimiento de vasos nuevos en la córnea.
- +1 = Crecimiento de vasos de 1 mm en el estroma corneal en un arco localizado junto al implante.
- +2 = Crecimiento de vasos de 2 a 3 mm en un arco junto al implante.
- +3 = Crecimiento de 2 a 3 mm de la córnea con un amplio arco de vasos del limbo.
- +4 = Crecimiento de vasos mayor de 3 mm en la córnea asociado con un amplio arco de neovascularización hacia el implante.

Además se valoraron clínicamente durante el periodo de investigación las reacciones adversas producto del inóculo, tanto sistémicas como locales.

Los animales fueron observados diariamente por 10 días y en este momento se realizó una biopsia de cornea del área inoculada la cual se conservó en formol para su estudio microscópico histológico posterior.

Los criterios de inclusión de los animales del estudio fueron los siguientes:

- Conejos de raza pura sin evidencia clínica de

patología ocular o sistémica previa y durante el estudio.

- Cordero de raza pura sin evidencia de patología hematológica o sistémica previa y durante el estudio.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Conejos en los que se demostraron errores técnicos en la aplicación del inóculo.
- Conejos en los que se demostrara defectos técnicos en la yoma de las muestras de tejido corneal.

La obtención de los FCDP de cordero se realizó con la siguiente técnica: 500ml. de sangre total de cordero se obtuvieron en una bolsa estéril conteniendo 50ml de anticoagulantes (citrato ácido de dextrosa), se colocaron inmediatamente en hielo para su transporte al laboratorio del banco de sangre; los glóbulos rojos y blancos se removieron por medio de centrifugación (135 X gr, 20 minutos a 40C) dejando un plasma rico en plaquetas del cual se removieron por medio de centrifugación (750 X gr, 10 minutos a 40C). Las plaquetas se lavaron con una solución buffer (0.2 M HEPES, 0.03 M glucosa, 0.004 M KCl) 0.14 M NaCl, 0.35% de albúmina sérica bovina pH 6.5) y subsecuentemente resuspendidos en el buffer a concentración de

10 x 9 plaquetas/ml. Las plaquetas son tratadas después con trombina a razón de 1U/ml. para crear un sobrenadante que contiene los FCDP. por último, se separan y se remueven las plaquetas por medio de centrifugación (950 X gr. 5 minutos a 40C).

Las inyecciones corneales se llevaron a cabo con el conejo anestesiado con Ketamina(1mg/kg,subcutáneo). Las córneas se anestesiaron con 2 gotas de tetracaina oftálmica al 1%; la solución buffer conteniendo los FCDP de cordero se inyectó en la córnea utilizando una aguja hipodérmica de calibre 27, con una jeringa de 1ml.a dosis de 0.05ml., aproximadamente a 3mm del limbo de la córnea.

RESULTADOS

Los resultados fueron recolectados en hojas individuales para cada animal de experimentación con registro diario de las variables en estudio, esta hoja incluyó el reporte histológico de las muestras (ver anexo #1). En la tabla #1 se resumen los resultados de estos registros.

No se presentó evidencia clínica de neovascularización corneal en el grupo en estudio ni en el grupo control. Solamente en un animal, en el cual se infiltró el inóculo accidentalmente en la cámara corneal y posteriormente se aplicó de manera correcta, se

	GRUPO DE ESTUDIO	GRUPO DE CONTROL
OPACIDAD	NO	NO
NEOVASCULARIZACION (HISTOLOGIA)	NO	NO
REACCIONES ADVERSAS	NO	NO

presentaron formaciones de opacificación en la cámara corneal los días 5,6 y 7 del estudio para desaparecer al octavo día. Las implicaciones de este incidente se analizan en las conclusiones.

No se presentó evidencia clínica de reacciones adversas al inóculo en ninguno de los grupos.

ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados de nuestro estudio muestran de una manera objetiva que los Factores de Cicatrización Derivados de Plaquetas Heterólogos (FCDPH) no presentaron ninguna actividad biológica en nuestro modelo de experimentación. Sin embargo como se destaca

en los resultados uno de los animales del estudio si presentó evidencia clínica de actividad biológica de los FCDPH caracterizada por la aparición temporal de formaciones opacas a manera de depósitos en la cámara corneal accidentalmente infiltrada. En el estudio original de Knigton los autores no son muy específicos en relación a la técnica de aplicación del inóculo, puesto que al infiltrar la córnea a 3 mm de su limbo la mayor parte del producto tiende a permanecer de manera subconjuntival, lo cual implica una rápida resorsión del inóculo por vía linfática hacia la circulación general. En cambio la porción de inóculo que accidentalmente se infiltró en la cámara corneal, dada la lentitud de recambio de líquidos a este nivel, permitió que se presentaran fenómenos de actividad biológica de los factores a este nivel aunque solo de manera temporal.

A raíz de estas deducciones se revisó nuevamente la técnica de aplicación del inóculo, de manera que la preparación quede a nivel intracorneal, y que por la ausencia de vascularización de la córnea permanezca el producto "in situ" por un tiempo mayor que permita la actuación local de los FCDPH. Esto sin embargo es motivo para la realización de un nuevo estudio.

No se presentaron evidencias clínicas de rechazo o reacciones adversas a los FCDPH en nuestro modelo experimental lo cual comprueba una de nuestras hipótesis

planteadas al inicio de nuestro estudio, lo cual nos alenta a continuar la línea de investigación de este tipo de derivados.

CONCLUSION

Los Factores de Cicatrización Derivados de Plaquetas son hasta el momento actual un campo poco explorado en la investigación de los procesos de cicatrización tisular. Aún más los Heterólogos puesto que hasta ahora no se han publicado ningún trabajo en la literatura universal que haga referencia a ellos. Nuestro trabajo plantea una serie de interrogantes con respecto a la técnica de aplicación de estos derivados en nuestro modelo de experimentación, por lo cual consideramos que no es conveniente dejar a un lado este campo de investigación hasta que no se realicen nuevos estudios en este campo.

CICATRIZACION

CONEJO # 1

	DIA DE ESTUDIO							
FECHA	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								SI
REACCIONES ADVERBAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							

ANOTACIONES

CICATRIZACION

CONEJO # 2

	DIA DE ESTUDIO							
FECHA	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								SI
REACCIONES ADVERSAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							

ANOTACIONES

CICATRIZACION

CONEJO # 3

	DIA DE ESTUDIO							
FECHA	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								SI
REACCIONES ADVERSAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							

ANOTACIONES

CICATRIZACION

CONEJO # 4

FECHA	DIA DE ESTUDIO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								Si
REACCIONES ADVERSAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	<u>CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES</u>							

ANOTACIONES

CICATRIZACION

CONEJO # 5

	DIA DE ESTUDIO							
FECHA	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								SI
REACCIONES ADVERBAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							
ANOTACIONES	<hr/> <hr/>							

CICATRIZACION

CONEJO # 6

	DIA DE ESTUDIO							
FECHA	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								BI
REACCIONES ADVERSAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							

ANOTACIONES

CICATRIZACION

CONEJO # 7

	DIA DE ESTUDIO							
FECHA	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO*	NO*	NO*	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								SI
REACCIONES ADVERBAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							

ANOTACIONES opacificacion en cámara corneal los días 5, 6 y 7
desapareciendo el día 8

CICATRIZACION

CONEJO # __8.

	DIA DE ESTUDIO							
FECHA	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								SI
REACCIONES ADVERBAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							
ANOTACIONES	_____							

CICATRIZACION

CONEJO # ..9.

FECHA	DIA DE ESTUDIO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								SI
REACCIONES ADVERSAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							

ANOTACIONES

CICATRIZACION

CONEJO # 10

	DIA DE ESTUDIO							
FECHA	1	2	3	4	5	6	7	8
DICIEMBRE 1990	11	12	13	14	15	16	17	18
APLICACION	X							
OPACIDAD	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
GRADO	0	0	0	0	0	0	0	0
BIOPSIA								SI
REACCIONES ADVERSAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HISTOLOGIA	CORNEA (BIOPSIA DE CONEJO) SIN ALTERACIONES							

ANOTACIONES

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Knighton, DR, Vance, DF, et al. Classification and treatment of cronic nonhealing wounds Ann Surg 1986 204:322-30.
- 2.- Hunt, TK, Knighton, DR et al. Studies on inflammation and wound healing: Angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. Surgery 1984;96:48-54.
- 3.- Knighton, DR, Hunt, TK, et al. Role of platelets and fibrin in the healing sequence. Ann Surg 1982; 196: 379- 88.
- 4.- Gando, S. et al. Variation in wound healing factors in trauma patients. Nippon GGZ,1990 jan:91(1):17-22.
- 5.- Ross R, et al. Platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 1207-1210.
- 6.- Antoniodes HN, et al. Purification of human platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 1809-1813.
- 7.- Grotendorst GR, et al. Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. J Clin Invest 1985; 76: 2323-2329.

- 8.- Shimokado K. et al. A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF. Cell 1985; 43: 277-286.
- 9.- Antoniades HN. Human platelet-derived growth factor (PDGF): purification of PDGF-I and PDGF-II and separation of their reduced subunits. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7314-17.
- 10.- Deuel TF, et al. Human platelet derived growth factor. Purification and resolution into two active protein fractions. J Biol Chem 1981; 256: 8896-99.
- 11.- Seppa H, et al. Platelet derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. J Cell Biol 1982; 92: 584-88.