



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.

SECRETARIA DE SALUD

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.

SECRETARIA DE SALUD

"Aplicación temprana vs. Aplicación tardía de activador tisular del plasminógeno por vía intraperitoneal como reductor de adherencias peritoneales en modelo de rata"

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: ESPECIALISTA EN MEDICINA (CIRUGÍA ONCOLÓGICA (ADULTOS))

PRESENTA: FERNANDO ULISES LARA GONZÁLEZ

ASESOR:

PULIDO CEJUDO ABRAHAM

México, D.F. 2012



DR. EDUARDO LICEAGA

V



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorización:

Vo.Bo.

Dr. César Athie Gutiérrez

*Profesor Titular del curso de la
Especialidad en Cirugía General*

Vo.Bo.

Dr. Abraham Pulido Cejudo

Tutor de tesis
Investigador Responsable

Dr. Fernando Ulises Lara González

Investigador Responsable

En Agradecimiento

Mis hermanos Luis y Adriana

Mi padre y madre los mejores médicos que he conocido

A todos los que colaboraron en esta tesis.

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

DATOS GENERALES DE INVESTIGADORES

TESIS DE INVESTIGACIÓN PARA LA ESPECIALIDAD EN CIRUGÍA GENERAL

“Aplicación temprana vs. Aplicación tardía de activador tisular del plasminógeno por vía intraperitoneal como reductor de adherencias en rata. Comparación de resultados”

COORDINADOR DE LA INVESTIGACION:

Dr. Fernando Lara González

Residente de 4to año de la Especialidad de Cirugía General

Hospital General de México

RFC: LAGF831212 TEL. 55434749 CEL: 04455-3896-8509

Email: lara_fernando_5090@yahoo.com

INVESTIGADOR RESPONSABLE

Dr. Abraham Pulido Cejudo

Jefe de Unidad Servicio Cirugía General 303

Profesor Adjunto del Curso de Especialidad

En Cirugía General Hospital General de México

RFC: PUCA660805 TEL: 27892000

INVESTIGADORES ASOCIADOS

Mario Antonio García Hernández

Residente de 3er año Cirugía General

RFC:GAGM840321 CEL:552854474

Dra. Elizmara Rodríguez

Residente de 3er año Servicio de Patología

Hospital General de México.

Dr. Raúl Rojero Vallejo

Jefe de Servicio de Cirugía Experimental

Hospital General de México.

Ing. Luis Eduardo Lara González

Ingeniero Biomédico

El siguiente trabajo fue realizado en el servicio de Cirugía Experimental del Hospital General de México

Bajo aprobación del Comité de investigación del Hospital General de México con Número de registro:

Contenido

	<i>Página</i>
I. Resumen	7
II. Introducción	
Marco teórico	8
1. Adherencias peritoneales	
1.1. Peritoneo	
1.2. Adherencias	
1.3. Importancia clínica	
2. Fisiopatología de formación de adherencias	9
2.1. Fibrina y su participación en la cicatrización peritoneal	
2.2. Fibrinolíticos	
2.3. Activadores tisulares del plasminógeno	
2.4. Tenecteplase	
3. Modelos de experimentación en formación de adherencias	14
3.1. Modelo de rata y adherencias	
3.2. Modelo de aplicación de talco estéril intraperitoneal	
3.3. Fibrinolíticos y disminución de adherencias en modelo de rata	
III. Justificación	20
5.1. Beneficio teórico de la aplicación tardía	
IV. Objetivos	21
V. Hipótesis	21
VI. Material y Métodos	22
6.1. Diseño metodológico	
6.2. Selección y definición de variables	
6.3. Criterios de inclusión	
6.4. Criterios de eliminación	
6.5. Recolección de la información	
6.6. Métodos y modelos de análisis de datos	
6.8 Aspectos de bioética y bioseguridad	
VII. Resultados	35
7.1 Tabla de resultados	
7.2 Gráficas de distribución de la muestra	
7.3 Análisis cualitativo	
7.4 Análisis cuantitativo	
7.5 Análisis estadístico	
VIII. Discusión	67
IX. Conclusiones	68
IX. Bibliografía	70
X. Glosario	74
XI. Anexos	75

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Las adherencias peritoneales son bandas de tejido fibroso con diverso grado de rigidez y firmeza, provocan la adhesión entre los órganos. Los principales problemas clínicos asociados a las adherencias peritoneales son el dolor abdominal crónico (50%), obstrucción intestinal (49% a 74%) y la infertilidad (15% a 20 %). Se ha demostrado un aumento en las concentraciones de fibrina intraperitoneal en el proceso de cicatrización de las serosas, siendo este el primer paso en la formación de adherencias rígidas. Las cirugías abdominales, los procesos infecciosos intraperitoneales favorecen el depósito de múltiples puentes de esta proteína. Se han diseñado en modelos animales estrategias para prevenir y reducir de la fibrosis intraperitoneales mediante la aplicación de fármacos. En la década de los 80's se demostró el beneficio de la aplicación intraperitoneal de fibrinolíticos en modelos de rata como reductores en la formación de adherencias. Sin embargo, aún no se ha utilizado esta terapia en el campo clínico y existe preocupación sobre su perfil de seguridad en humanos, ya que interfiere con los mecanismos de hemostasia y cicatrización de las anastomosis o rafiás; y más aún si la terapia se aplica en posoperatorios tempranos (aplicación en menos de 24 hrs posterior a cirugía) existe preocupación sobre su perfil de seguridad. Tampoco se conoce el efecto en la aplicación tardía. Es por eso que se realizó un estudio piloto experimental; en el que se compara el uso de fibrinolíticos en forma inmediata vs. aplicación tardía posquirúrgica en el modelo de rata para adherencias peritoneales.

OBJETIVO: Observar el efecto sobre las adherencias peritoneales tras administrar tenecteplase (activador tisular del plasminógeno aTP); en forma temprana (efecto inmediato a la inducción de adherencias) contra la aplicación tardía (más de 21 días post inducción); y valorar cual momento de aplicación cuenta con mejor efectividad reduciendo la rigidez de las adherencias.

MATERIAL Y MÉTODOS: Ensayo clínico controlado piloto. Lugar de estudio: Departamento de Cirugía experimental del Hospital General de México. Población: 30 ratas adulto macho (Wistar Albino del género Ratus Norvegicus). Peso rango de entre 400 a 450 grs. Se dividieron en 3 grupos de 10 ratas cada uno. Se utilizó el modelo validado para inducción de adherencias mediante la aplicación por vía intraperitoneal de talco estéril con 5ml de agua inyectable 1 al 20% (20grs/100ml). Asignando aleatoriamente el grupo 1 sólo recibe sol. salina .9% por vía intraperitoneal. Grupo 2 (grupo temprano), recibe a las 24 hrs. pos inducción de adherencias, Tenecteplasa a 5mg/kg. 1000 U por vía intraperitoneal. Grupo 3 (aplicación tardía) Tenecteplasa a 5mg/kg. 1000 U por vía intraperitoneal a los 21 días postinducción. Se mantienen vivas las ratas bajo las mismas condiciones y regímenes de alimentación y se sacrifican todos los grupos a los 31 días se midieron en el mismo sitio de la cavidad peritoneal los parámetros de firmeza utilizando el score Evans, el grado de inflamación cuantificado en el número de vasos y células gigantes multinucleadas por campo de gran aumento (40x), el grosor en milímetros de banda fibrosa depositada desde el mesotelio visceral, así como grado de colágeno depositado mediante cuantificación de colágeno por tricrómico de Masson, mediante el histograma de pixeles. Se realizaron análisis para muestras independientes mediante análisis estadístico pruebas paramétricas y no paramétricas.

RESULTADOS: 5 Ratas fueron eliminadas (grupo 1:1, grupo 2:3; grupo 3:1) Quedando los grupos con las siguiente población Gpo 1: 9; Gpo2: 7 Gpo 3: 9. Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.034$ IC del 97%), para la reducción del score de Evans y una disminución en el grosor en milímetros en el tamaño de la banda fibrosa ($p < 0.0006$ IC de 99%), entre el grupo que recibió aTP versus el grupo 1. Así como una reducción de menos del 70% de colágeno depositado medido en la cantidad de pixeles de color azul en tinciones de Tricrómico de Masson. En cuanto al número de vasos por campo como en el número de células gigantes multinucleadas no hubo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.16$ IC de 95%). La aplicación de tenecteplase entre los grupos (temprano y tardío) en que se administró muestran resultados muy similares en cuanto al score de Evans y en el grosor en milímetros de la banda fibrosa ($p < 0.056$) y en el depósito de colágeno en el histograma.

CONCLUSIÓN: En el presente estudio, los resultados obtenidos tanto en el análisis estadístico y en análisis digital mediante histograma de pixeles; demuestran una tendencia en la reducción en el número y la firmeza de las adherencias intraperitoneales entre el grupo con aplicación de fibrinolíticos. Comparando los grupos temprano vs. tardío se muestra una diferencia discreta a favor de la aplicación tardía, ya que mostraron menor grado de firmeza y grosor de banda fibrosa que se tendrá que dilucidar en estudios con muestras mayores. Los hallazgos muestran en el modelo de rata el uso de tenecteplase produce resultados similares a los producidos al fibrinolítico alteplase que es el fármaco de referencia utilizado por otros grupos. Se propone la realización en estudios con series más grandes para evaluar seguridad.

II INTRODUCCIÓN

MARCO TEÓRICO

Las adherencias peritoneales (AP) que ocasiona la unión anómala de una o varias vísceras entre sí pueden ser adquiridas (adherencias posoperatorias) o congénitas (Bridas), con la pared abdominal ó el epiplón. Las bridas en general no se relacionan con patología obstructiva, mientras en la edad adulta que las adherencias adquiridas frecuentemente están asociadas con cuadros de oclusión intestinales.

El peritoneo es una capa de células mesoteliales que están sobre de una membrana basal y a menudo hay una capa de tejido conectivo entre ambas. La unión entre las células mesoteliales y la membrana basal suele ser muy débil, por lo que cualquier traumatismo puede lesionarla.

El interés clínico de las adherencias en cirugía general se debe a que son la primera causa de obstrucción del tubo digestivo delgado superando el 50% de las causas (1,4).

Las AP se desarrollan después de cualquier cirugía abdominal como parte de un proceso de reparación que ocurre después de haberse dañado el peritoneo. En las últimas dos décadas ha habido mucha investigación para entender los procesos bioquímicos y celulares que conduce a la formación de adherencias. El balance temprano entre el depósito de fibrina y la degradación parece ser el factor crítico en la formación de adherencias (2,3,4). Aunque las adherencias tienen efecto benéfico, también causan morbilidad significativa incluyendo la obstrucción del intestino delgado (OID), infertilidad y aumento en la dificultad en las reparaciones quirúrgicas posteriores. Se han empleado varias estrategias a lo largo de los años para prevenir la formación de adherencias sin intervenir con los procesos de reparación fisiológicos.

Se ha estimado que más del 93% de los pacientes sometidos a cirugía intraperitoneal de cualquier índole desarrollarán AP (6). La extensión en la formación de estas varía de un paciente a otro, esta en relación directa con el tipo y magnitud de la cirugía realizada y la presencia o no de complicaciones posoperatorias. Otro factor quirúrgico que ha demostrado contribuir a las AP son los cuerpos extraños depositados de forma advertida o no tales como materiales protésicos, talco de guantes, tipos de sutura, cálculos biliares no extraídos (6). Afortunadamente pocos pacientes desarrollan sintomatología y solo un pequeño grupo de los pacientes que desarrollan (AI) padecerán de alguna complicación (9).

Dentro de la morbilidad las AI son la principal causa de obstrucción del intestino delgado (OID) en un 65% 75% de los casos (9). Aunque hay un amplio rango en el riesgo de debutar con OID en pacientes con antecedente de cirugía previa dependiendo de las series de pacientes y de cómo fueron evaluados los procedimientos en el hemiabdomen inferior principalmente los pélvicos cuentan con un riesgo más alto de desarrollo de OID por AI (9). Se ha estimado que el riesgo para OID es de 1 al 10% para una apendicetomía mientras que para una colecistectomía abierta es de 6.5% y del 10 al 25% para una proctocolectomía (9).

La OID es probablemente la complicación más severa de las AI pero no es la única, la morbilidad no solo se encuentra en la mecánica del intestino delgado. En la literatura ginecológica se ha demostrado que las AI son la causa más importante de infertilidad por 15 a 20% de los casos (9). Y aunque controversial hay evidencia que sugiere que puede ser una de las principales causas de dolor pélvico crónico. Para los pacientes con insuficiencia renal crónica, las adherencias pueden hacer imposible la diálisis peritoneal y su presencia puede impedir el uso de la quimioterapia intraperitoneal en aquellos pacientes que son candidatos para la misma (6,9). Para los cirujanos generales, la presencia de adherencias a menudo hace difícil la cirugía reoperativa y puede incrementar la tasa de complicaciones del procedimiento quirúrgico intentado (9). En la actual era de la cirugía laparoscópica avanzada, las adherencias han tomado una significación aún más grande, haciendo frecuentemente más difíciles los abordajes laparoscópicos y, en algunos casos, enteramente imposible (26). Aún con la cirugía reoperativa abierta, una extensa

adhesiolisis es frecuentemente necesaria para asegurar una exposición adecuada, no resultando infrecuentemente en prolongados tiempos operatorios, pérdida incrementada de sangre y otras complicaciones. La enterotomía inadvertida es probablemente la complicación mejor conocida de la adhesiolisis, con una incidencia de aproximadamente 20% en la cirugía reoperativa (9). Estos casos resultan en pobres resultados para los pacientes, con hospitalización prolongada y una más alta incidencia de admisiones a la unidad de cuidados intensivos (9).

La relación entre las adherencias postoperatorias y la obstrucción intestinal no es un concepto nuevo. En 1872, Thomas Bryant describió un caso fatal de obstrucción intestinal causado por adherencias intraabdominales que se desarrollaron después de la remoción de un tumor ovárico. Desde el reporte de Bryant, una cantidad significativa de tiempo y dinero ha sido invertida en la investigación de las adherencias intraabdominales, con un enfoque primario sobre el desarrollo de métodos para prevenir su formación. A pesar del trabajo substancial en esta área, se ha hecho poco progreso; al presente, no existe un estándar clínico para ninguna medida preventiva, sea quirúrgica o farmacológica, para controlar la formación de adherencias postoperatorias (4)

FISIOPATOLOGIA

La cicatrización de una herida peritoneal difiere de la de la piel tanto en el modo de epitelización como en las consecuencias del depósito de fibrina. Para comprender cómo responde el peritoneo a la lesión, se requiere algún conocimiento básico sobre su estructura. El peritoneo consiste en una única capa externa de células mesoteliales que están ancladas laxamente a una membrana basal y que se separa rápidamente aun con el menor trauma (1,14).

La capa submesotelial consiste en componentes de la matriz extracelular, junto con capilares y linfáticos. La reabsorción de líquidos y la difusión ocurren libremente a través de estas capas (21). El líquido en la cavidad peritoneal contiene varios tipos diferentes de células, incluyendo leucocitos y macrófagos.

Estas células, junto con el mesotelio, secretan varios mediadores celulares que tienen roles en la curación peritoneal, permitiendo la modulación de la respuesta inflamatoria sobre una gran área de superficie(21).

El proceso de formación de adherencias postoperatorias constituye una interacción compleja de eventos bioquímicos involucrados en la inflamación, reparación tisular, angiogénesis e inervación (28). La lesión peritoneal ocurre en el sitio del procedimiento actual y en áreas remotas del campo operatorio, como resultado de la retracción de órganos y tejidos durante el curso de la cirugía (1). El trauma quirúrgico del peritoneo puede ocurrir por varios mecanismos: corte, abrasión, isquemia, desecación y coagulación (4) Los últimos 2 tipos de lesiones son únicos, en el sentido de que son directamente tóxicos para las células mesoteliales que tapizan la cavidad peritoneal y el tejido conectivo subyacente. La lesión isquémica es típicamente el resultado de la retracción de los órganos y tejidos. A pesar del mecanismo, sin embargo, la respuesta del peritoneo al trauma quirúrgico es la misma (9). Inmediatamente después de la lesión existe sangrado y un aumento de la permeabilidad vascular con pérdida de líquidos en las superficies lesionadas (9). Simultáneamente, ocurre una respuesta inflamatoria postraumática con infiltración de células inflamatorias, liberación de citoquinas pro-inflamatorias y activación del complemento y de las cascadas de coagulación(25,27).

El exudado líquido liberado de las superficies peritoneales lesionadas es rico en proteínas plasmáticas – especialmente fibrinógeno (4,27). La activación de la cascada de la coagulación resulta en la formación de trombina, que es necesaria para la conversión del fibrinógeno en fibrina (27). La fibrina actúa restaurando el tejido lesionado y, una vez generada, es depositada a lo largo de las superficies peritoneales. La fibrina es una sustancia pegajosa y causa la adherencia de los órganos o de las superficies serosas lesionadas para fusionarse (27). Bajo circunstancias normales, la formación de una matriz de fibrina durante la curación de una herida es sólo temporal y la degradación de estas tenues adherencias fibrinosas por proteasas liberadas localmente por el sistema fibrinolítico ocurre dentro de las 72 horas de la lesión (1). Por lo tanto, el proceso de fibrinolisis no está confinado a la degradación de los trombos intravasculares; también tiene un papel clave en la remodelación y reparación tisular (25). La fibrinolisis permite que las células mesoteliales proliferen y que el defecto peritoneal sea restaurado dentro de los 4 a 5 días, previniendo la fijación permanente de las superficies adyacentes (2,29). El flujo sanguíneo adecuado es crítico para la fibrinolisis y dado que la injuria peritoneal resulta en isquemia, esto también interfiere con la fibrinolisis (6). Si la fibrinolisis no ocurre dentro de los 5 a 7 días de la injuria peritoneal, o si la actividad

fibrinolítica local está reducida, la matriz de fibrina persiste (25). Si esto ocurre, la matriz temporaria de fibrina gradualmente se torna más organizada a medida que los fibroblastos secretantes de colágeno y otras células reparadoras infiltran la matriz (4). La organización con el tiempo de las bandas de fibrina y su transformación en adherencias fibrosas maduras es lo que les permite persistir (2). Estas adherencias “maduras” no están compuestas simplemente de tejido conectivo; los estudios han demostrado que, con el tiempo, se vuelven estructuras celulares altamente organizadas que contienen arteriolas, vénulas, capilares y fibras nerviosas, además de colágeno (30).

Como fue descrito previamente, el sistema fibrinolítico tiene un rol clave en la cicatrización de la herida peritoneal y la disrupción de este sistema resulta en la formación de adherencias. Además de los activadores de la fibrinolisis, también hay inhibidores que existen para mantener el balance en el sistema (esto es, para prevenir el excesivo depósito y degradación de fibrina). Hay 2 activadores mayores en el sistema fibrinolítico: el activador tisular del plasminógeno (tAP) y el activador tipo uroquina del plasminógeno (uAP), ambos capaces de activar el plasminógeno a plasmina. La plasmina es una proteasa de amplio rango capaz de degradar varias moléculas en la matriz extracelular (MEC), incluyendo la fibrina (21,25). De los 2 activadores del plasminógeno, el tAP es el más importante en la curación de la herida peritoneal porque tiene una afinidad específica por la fibrina que el uAP no presenta; es responsable por el 95% de la plasmina generada en la respuesta a la injuria peritoneal (30). También hay un grupo de glucoproteínas que actúan como inhibidores de la fibrinolisis y que son colectivamente denominadas como inhibidores del activador del plasminógeno (IAP).

Existen 2 grupos de IAP: el IAP-1 y el IAP-2. Sin embargo, el IAP-1 es reconocido como el inhibidor dominante de la fibrinolisis en el plasma (25). El IAP-1 previene específicamente la formación de plasmina vinculándose directamente e inhibiendo las actividades del tAP y uAP, previniendo la degradación de la fibrina (21).

En 1983, Moore y col. (4) demostraron que el peritoneo tiene una capacidad fibrinolítica y de coagulación poderosa. Como se ha discutido arriba, bajo circunstancias normales (por ejemplo, en una cavidad abdominal no alterada), la capacidad fibrinolítica excede a la de coagulación. Estudios adicionales han demostrado que, en condiciones en las que existe una injuria peritoneal, isquemia relativa, o ambas (como, por ejemplo, cuando un paciente tiene peritonitis o es sometido a una cirugía), la capacidad fibrinolítica está deprimida (1) y la relación entre fibrinolisis y coagulación se invierte.

Además, la reducción de la fibrinolisis peritoneal después de una operación parece estar inversamente relacionada con el grado de formación de adherencias. Dado estos hallazgos, se considera que la declinación de la capacidad fibrinolítica peritoneal después de la cirugía es la vía central común que conduce a la formación de adherencias.

Tanto los estudios en animales como en humanos mostraron que 2 cambios mayores median en la declinación de la fibrinolisis: una disminución de la actividad local del tAP (25) y un aumento del IAP-1, local y sistémico (25). La razón para la disminución de la actividad del tAP parece ser doble: una reducción en la cantidad absoluta de liberación de tAP por el peritoneo lesionado y el resultado del apagamiento de cualquier actividad remanente del tAP por parte del IAP-1 (25,27). La importancia del tAP y del IAP-1 en la formación de las adherencias es adicionalmente apoyada por estudios en los que se descubrió que pacientes con las más graves adherencias tienen una actividad del IAP-1 sobreexpresada y una actividad del tAP deprimida. Además, después de la cirugía, el tAP de los ratones parece ser más susceptible a la formación de adherencias en comparación con la deficiencia de uAP de los ratones de tipo salvaje (2). Aunque los eventos moleculares y bioquímicos específicos que median el cambio de la actividad fibrinolítica no han sido aún totalmente elucidados, parece que las citoquinas, factores de crecimiento y factores de angiogénesis, todos los cuales son liberados por los macrófagos activados y otras células inflamatorias en respuesta a la injuria peritoneal, pueden tener roles importantes en la regulación de este cambio.

La elucidación del rol de los mediadores inflamatorios en la formación de adherencias se ha vuelto el foco principal de la investigación actual en esta área. Es sabido que citoquinas y factores de crecimiento específicos son responsables por la sobrerregulación de la expresión de genes cuyos productos pueden ayudar a iniciar la formación de adherencias, probablemente por medio de la coordinación de los eventos responsables por la declinación de la fibrinolisis (25). Los ejemplos incluyen genes para el receptor de la neurokinina-1 (NK-1), factor de crecimiento transformante beta (FCT- β), sustancia P (SP), molécula de adhesión intracelular (MAIC-1) y molécula de adhesión de células vasculares (MACV-1). Un incremento en los niveles del ARNm transcrito de cada uno de estos genes ha sido hallado tempranamente en el tejido peritoneal de ratas después de trauma quirúrgico [28].

El FCT- β es la citoquina más completamente estudiada en la formación de adherencias (25). La FCT- β es una potente citoquina y factor de crecimiento que inicia, modula y termina la reparación tisular y ambos, el FCT- β y su receptor están elevados en el tejido y líquido peritoneal después de una cirugía transperitoneal. Estudios in vitro sugieren que el FCT- β contribuye a la disminución en la capacidad fibrinolítica peritoneal y puede tener un papel en la prevención de la disolución temprana de las adherencias fibrinosas. La evidencia in vivo para un rol del FCT- β en la promoción de la formación de adherencias viene de estudios usando un modelo animal de adherencias quirúrgicamente inducidas, en donde a los animales se les dio ya sea FCT- β intraperitoneal recombinante o placebo, al momento de la laparotomía. Los animales que recibieron FCT- β tenían significativamente más adherencias que el grupo control cuando se reexaminaron varios días después. Similarmente, en un estudio separado, los animales tratados con anticuerpo neutralizante del FCT- β tenían una formación de adherencias reducida después de la cirugía, comparados con los controles. El mecanismo exacto a través del cual el FCT- β media esta respuesta no es conocido; sin embargo, estudios recientes sugieren que puede involucrar la regulación local del IAP-1 (40).

Varias interleuquinas pro-inflamatorias han sido estudiadas por su papel potencial en la formación de adherencias. Aunque el rol de muchas de esas interleuquinas no ha sido aún definido, el papel de la interleuquina-1 (IL-1) en la fisiopatología de la formación de adherencias se está tornando más claro. Los estudios han sugerido que, además de promover la inflamación y la coagulación primaria, la IL-1 también contribuye en la disminución global en la capacidad fibrinolítica local que es necesaria para que las adherencias se formen.

El nivel aumentado de IL-1 β que ha sido medido en el líquido peritoneal postoperatoriamente apoya una acción local para esta sustancia en la cavidad peritoneal. In vivo, se ha hallado que IL-1 β estimula la liberación de IAP-1 en las células mesoteliales humanas, sugiriendo que puede jugar un papel en la inhibición local de la degradación de la fibrina. Un apoyo adicional para este papel de promover la formación de adherencias e iniciar la reparación tisular proviene de un estudio en el cual ratas tratadas con una preparación anti-IL-1 desarrollaron significativamente menos adherencias quirúrgicamente inducidas que lo que hicieron los controles (25).

Recientemente, la sustancia P (SP) ha recibido atención con respecto a su rol en la formación de adherencias. La SP es un neuropéptido que pertenece a la familia de péptidos de las taquiquininas a la que también pertenecen los receptores NK. La SP puede ser hallada en distintas localizaciones, incluyendo el líquido peritoneal, y tiene muchos efectos biológicos – la mayoría de los cuales involucra la mediación de la reacción inflamatoria (28). Mediante un enlace de alta afinidad con el receptor NK-1, se ha demostrado que la SP afecta la expresión de las moléculas de adherencia intracelular (MAIC-1 y MACV-1) y de FCT- β en varios tipos de células, todos los cuales también han mostrado tener un rol en la formación de adherencias (28). Apoyo adicional para el papel de SP en la formación de adherencias proviene de la presencia de neuronas conteniendo sensores SP en las adherencias peritoneales [19,28] y estudios animales con endopeptidasa neural en ratones. La endopeptidasa neural es una enzima celular de superficie que degrada a la SP y los ratones que carecen de esta enzima desarrollan adherencias intraabdominales más rápidamente que su contraparte de tipo salvaje. Dado estos hallazgos, es probable que la SP juegue un papel central en la coordinación de la patogénesis de la formación de adherencias; ulterior investigación es requerida.

En relación con el papel para el receptor NK-1 (NK-1R) en la formación de adherencias, los experimentos iniciales de Reed y col. (28) demostraron que hay un aumento significativo en los niveles del ARNm tanto para el NK-1R como para la SP en el tejido de adherencias peritoneales a los 3 días después de la cirugía. Experimentos adicionales mostraron que la administración de un antagonista del NK-1R (NK-1RA) bloquea la unión de SP con NK-1, dando apoyo adicional al papel tanto de SP como de NK-1 en la formación de adherencias. La evidencia de que SP y NK-1 afectan específicamente la fibrinólisis proviene del mismo estudio, en donde las muestras peritoneales fueron recogidas de controles no operados y de grupos de animales de experimento (aquellos que recibieron NK-1RA o placebo) 24 horas después de la cirugía. Estos investigadores hallaron que la administración de NK-1RA conduce a un aumento significativo en la expresión del ARNm para el tAP tanto en tejido como líquido peritoneal, en comparación con los controles operados y no operados. Con el uso de la zimografía, los investigadores encontraron que la actividad fibrinolítica también estaba aumentada en las muestras correspondientes tisulares.

Estrategias_preventivas

El objetivo en la prevención de las adherencias es abolir o disminuir la incidencia, severidad, extensión y consecuencias de las mismas mientras se mantiene la cicatrización normal y se previene la infección (4).

A través de los años, varias estrategias para prevenir la formación de adherencias postoperatorias han sido propuestas, basado en lo que se había aprendido sobre la fisiopatología subyacente. Desafortunadamente, aunque numerosas estrategias diferentes han sido evaluadas, pocas han sido exitosas y algunas incluso han sido perjudiciales. En la actualidad, no hay medios para prevenir completamente la formación de adherencias postoperatorias. El único método disponible para tratar las adherencias que ya se han formado es la adherenciólisis quirúrgica.

La lisis de las adherencias típicamente es realizada sólo en los pacientes que desarrollan complicaciones por las mismas, tales como un OID, dolor o infertilidad, dado que la mayoría de las adherencias que son removidas quirúrgicamente simplemente se volverán a formar (12,24). La adhesión estricta a una técnica quirúrgica meticulosa ha sido invocada por muchos años por los cirujanos y los textos de cirugía como una manera de reducir la formación de adherencias después de la cirugía transperitoneal (4). Aunque tales esfuerzos raramente previenen las adherencias en la mayoría de los pacientes, el principio de una buena técnica quirúrgica para disminuir la lesión del peritoneo no debería ser descontado, debido a que dichas prácticas podrían también influir sobre el riesgo de desarrollar complicaciones asociadas con los procedimientos quirúrgicos (6).

Las medidas que han sido descritas e invocadas para disminuir la formación de adherencias incluyen minimizar la exposición del peritoneo a cuerpos extraños (por ejemplo, utilizando material de sutura sólo cuando sea necesario, eliminando el talco de los guantes mediante lavado de los mismos antes de la cirugía), manejo cuidadoso de los tejidos, del uso del electrobisturí y de los separadores, asegurar una hemostasia cuidadosa evitando la desecación y la isquemia, administración de profilaxis contra la infección y evitar el uso de líquidos de lavado muy calientes.

Dado que la adhesión estricta a una cirugía cuidadosa no elimina o previene la formación de adherencias, hay algunos adyuvantes quirúrgicos que han sido desarrollados y evaluados con el propósito de disminuir la formación de adherencias postquirúrgicas. Una discusión en profundidad de cada uno de esos agentes está más allá de la mira de esta revisión; por lo tanto, se brindará una visión general de los mismos.

Hay 6 mecanismos principales que interfieren con la formación de adherencias:

a) aquellos que disminuyen el daño peritoneal; b) aquellos que disminuyen la respuesta inflamatoria inicial; c) aquellos que previenen la formación de fibrina; d) aquellos que aumentan la fibrinólisis; e) aquellos que previenen el depósito de colágeno y f) aquellos que actúan como barreras para la formación de adherencias.

Los agentes que mayormente actúan directamente en la reducción de las adherencias lo hacen disminuyendo la deposición de fibrina, que es absolutamente necesaria para que ocurra la formación de adherencias. Estos agentes incluyen drogas antiinflamatorias no esteroides (AINEs), que interfieren con la síntesis de prostaglandinas y disminuyen la respuesta inflamatoria inicial y los anticoagulantes tales como la heparina. Los resultados de los estudios usando AINEs han sido conflictivos en términos de su efectividad en reducir las adherencias (12,13) y su uso es controvertido debido al riesgo de sangrado. Los inmunomoduladores, tales como los corticosteroides, también han sido probados para su habilidad en prevenir las adherencias (4), pero se ha hallado que su efectividad es equívoca (4) o incluso deletérea en algunos estudios (4).

Una vez que la fibrina es formada, otro método para prevenir las adherencias es eliminar la fibrina, usualmente mediante degradación enzimática (6). Ejemplos de agentes que degradan la fibrina son la estreptoquinasa y los activadores sintéticos del plasminógeno tisular.

Desafortunadamente, aunque en los modelos animales ha sido exitoso en la reducción de la formación de adherencias, el uso de activador recombinante del plasminógeno tisular (rtAP) es limitado, no sólo por el costo significativo y la administración intraperitoneal que es requerida, sino también por el riesgo que existe de hemorragia.

El grupo más promisorio de agentes a ser evaluados para su efectividad en disminuir las adherencias inducidas quirúrgicamente, es conocido como barreras. Las barreras existen en la forma de una membrana o un gel y actúan para separar las superficies peritoneales dañadas o lesionadas que pueden ser un riesgo para las adherencias. Estos agentes ejercen sus efectos localmente, en el sitio específico en donde son aplicados y no tienen efecto en áreas remotas en la cavidad peritoneal. Una barrera ideal aún no existe; sin embargo, en la creación de la misma debe tenerse presente las siguientes características: antiadhesiva, biocompatible, reabsorbible, adherente a la superficie traumatizada, efectiva sobre una superficie rezumante, aplicable a través del laparoscópio y barata.

La primera barrera en demostrar eficacia en los humanos está compuesta de celulosa oxidada regenerada modificada y es conocida como Interceed (Jonson & Jonson, New Brunswick, NJ (23). Aunque los estudios han hallado que es exitosa en reducir la formación de adherencias en procedimientos ginecológicos, su uso en procedimientos de cirugía general no es conocido. Además, se ha sugerido que la eficacia del Interceed está reducida significativamente en presencia de sangre. En efecto, se ha observado que la formación de adherencias puede, de hecho, aumentar, si la barrera de Interceed es colocada en áreas en donde la acumulación de sangre no puede prevenirse (por ejemplo, la pelvis), haciendo menos aceptable su uso.

El estudio de la fisiopatología de las adherencias peritoneales es aún campo abierto, no se ha desarrollado suficiente investigación que permita una adecuada comprensión de todos los fenómenos biológicos que se producen como respuesta a la agresión del peritoneo.

Durante la reparación normal la fibrina es degradada principalmente por la proteasa fibrinolítica plasmina, que se deriva del plasminógeno activada por la acción de dos activadores del plasminógeno el activador del plasminógeno de tipo tisular y el activador del plasminógeno tipo urocinasa. El efecto de la actividad quirúrgica, la peritonitis, así y la reacción a cuerpo extraño reduce las concentraciones intraperitoneales del plasminogeno peritoneal y generan así como incrementos subsecuentes de él inhibidor del activador del plasminógeno 1(IAP-1), de diversas citocinas IL-1 e IL 6 así como TNF alfa (5).

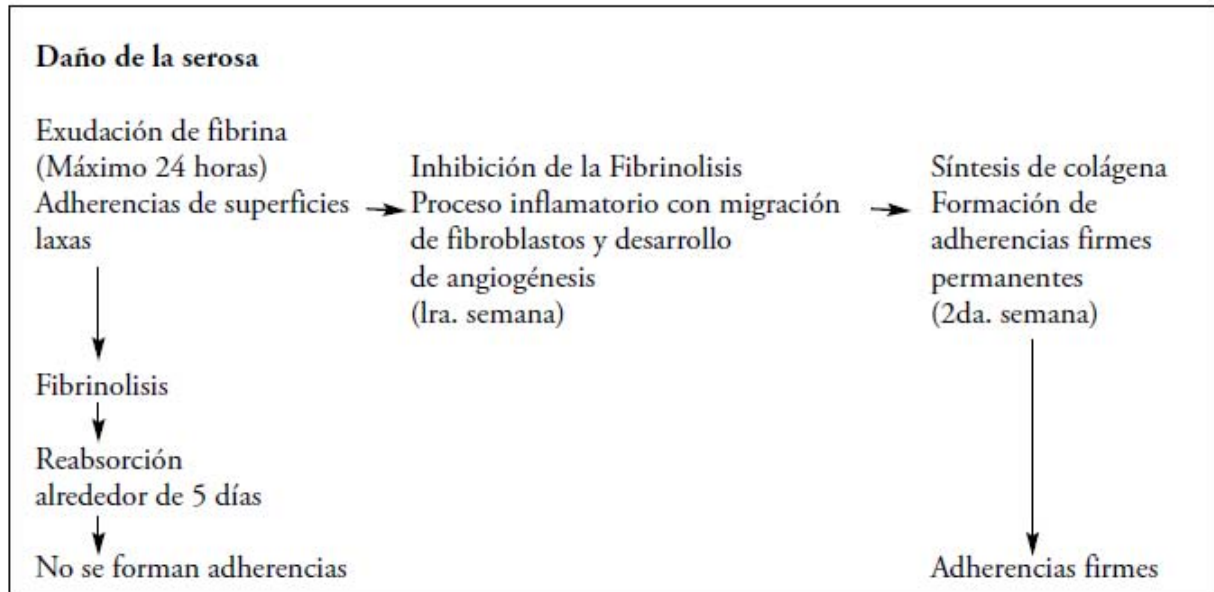


Fig: 1.1 Fisiopatología Formación de adherencias. Tomada y traducida de Luisa ; *Methods in Molecular Medicine*, vol. 78: *Wound Healing: Methods and Protocols*

Holmdahl e Ivarsson (25) han sugerido que la inhabilidad para descubrir maneras efectivas de reducir o abolir la formación de adherencias a través de los años ha sido debida a la falta de entendimiento de los principios básicos de la reparación del tejido peritoneal. Sólo en los últimos 15 a 20 años los investigadores han comenzado a desenmarañar las complejidades de estos procesos, que involucran varios tipos diferentes de células, citoquinas, factores de la coagulación y proteasas, actuando todos juntos para restaurar la integridad del tejido (25). Aunque nuestro entendimiento está lejos de ser completo, los estudios sobre la formación de adherencias han determinado, hasta el momento, lo que se considera el mecanismo fisiopatológico central que conduce al desarrollo de las adherencias (24,26). Esto será discutido más abajo. Si las estrategias efectivas de prevención y tratamiento van a ser desarrolladas, un entendimiento más comprensivo de este proceso, tanto a nivel celular como molecular, así como la identificación de los mediadores inflamatorios involucrados, es esencial. La clave para la prevención de las adherencias postoperatorias muy probablemente se basará en la inhibición selectiva de uno o más de los factores críticos requeridos para su formación.

3. MODELOS DE ADHERENCIAS EN RATA

Existen diferentes modelos de adherencia en rata para valorar la efectividad de las terapias que reduzcan la formación de conexiones fibrosis rígidas entre estas se encuentran descritas (30,31):

- 1- Escisión peritoneal.
- 2- Abrasión de la serosa mediante despolimamiento mecánico del peritoneo. Útil para evaluar en segmentos localizados de áreas expuestas al retiro de la serosa.
- 3- Electrofulguración de la serosa. Mismas características que la abrasión mecánica, se ha demostrado que es menor la inducción de tejido conectivo.
- 4- Modelo de ligadura y cribado del ciego. Modelo que simula el fenómeno de sepsis peritoneal mediante ligadura del ciego a unos centímetros adyacente a la válvula de la rata con la consecuente cribado con jeringa de insulina en 6 distintos sitios en el borde antimesentérico, simula una sepsis peritoneal al presentar fuga de material intestinal y potente formación de adherencias

- 5- Aplicación de cuerpos extraños (talco, Escresantes etc.). Modelo empleado en nuestro estudio el silicato de magnesio (talco), es capaz de producir una potente reacción inflamatoria con el consecuente depósito de tejido conectivo, este modelo es fácil de reproducir con resultados muy similares en los modelos de implementación de adherencias, puede realizarse mediante punción con aguja o con laparotomía mediana y aplicación directa sobre la serosa. 30. El uso de talco estéril como potente inductor de adherencias el pico máximo tanto de depósito de colágeno es a partir de los 14 y los 28 días postexposición a la aplicación (30). En nuestro estudio piloto se llevó a cabo la aplicación más allá de los 21 y se medirá su efecto así como compararlo con el grupo estándar (temprano), por el momento no existe efecto reportado en la literatura en la disminución de adherencias en rata a más de 21 días de exposición al talco.(20)

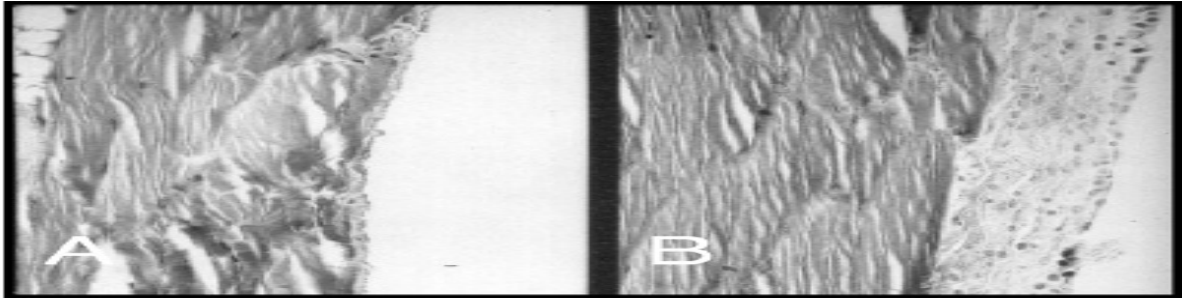


Fig. 2. Histological assessment of peritoneal connective-tissue deposition. Representative Masson's trichrome-stained abdominal wall tissue obtained 14 d after treatment is shown. The lumen of the peritoneal cavity is on the right. (A) Saline (as a control). Note the thin layer of connective tissue (collagen) beneath the mesothelium. (B) Talc (to induce adhesions). Note the thick band of connective tissue at the luminal surface (magnification: $\times 400$).

Murine Model of Peritoneal Adhesion Formation

Andrew E. Jahoda, Mary Kay Olson, and Elizabeth J. Kovacs

Fig. 1.2 Esquema de medición utilizada para cuantificar depósito de adherencias corte transversal sobre pared abdominal y banda fibrosa elevada sobre la capa mesotelia extraída de Andrew E. Methods and protocols Vol. 11 pag 147.

CLASIFICACIÓN DE EVANS

Table I

Macroscopic classification of adhesions described by
EVANS *et al.* (15)

0	No adhesions
1	Smooth adhesions splitting spontaneously or with weak traction
2	Firm adhesions splitting by traction
3	Dense adhesions requiring sharp dissection

EVANS D. M., McAREE K., DANIEL P. *et al.* Dose dependency and wound healing aspects of the use of tissue plasminogen activator in the prevention of intra-abdominal adhesions. *Am J Surg*, 1993, 165 : 229-232.

Fig. 1.3 del texto original Escala propuesta por Evans 1993

ESTUDIOS CLINICOS EN LOS CUALES SE DEMOSTRO EL USO DE FIBRINOLITICOS EN LA REDUCCION DE ADHERENCIAS

Se encuentra demostrado el beneficio en la reducción de adherencias mediante la aplicación de fibrinolíticos en estudios experimentales (2,3,4,5,10,12,13,14).de los cuales se utiliza alteplasa como principal fibrinolítico del tipo activador tisular del plasminógeno. En la mayoría de estos estudios utilizan diferentes modelos en rata ya sea mediante la aplicación de talco estéril (10), o mediante la técnica de ligadura y abrasión del ciego (4). En todos estos autores tales *Topal et al (p:0.01)* *Vipond et al (p=0.001)*, *Risberg et al (p=0.04)* y *Dunn et al* han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la reducción de adherencias medidas de forma distintas las múltiples variables que conforman el fenómeno de la cicatrización peritoneal y formación de adherencias.

MECANISMO DE ACCION DE TENECTEPLASE

Activador tisular del plasminógeno recombinante humano, una glucoproteína que activa el plasminógeno directamente a plasmina. Cuando se administra por vía endovenosa, el alteplasa permanece relativamente inactivo en el sistema circulatorio. Una vez unido a la fibrina, se activa induciendo la conversión de plasminógeno a plasmina, conduciendo a la disolución del coágulo de fibrina.

FORMA FARMACÉUTICA Y FORMULACIÓN DE TENECTEPLASE

Cada frasco ampula con liofilizado contiene:

Tenecteplasa50 mg (10,000 U)

Excipiente, c.s.

Cada jeringa con diluyente contiene:

Agua inyectable 10 ml. La solución reconstituida contiene 1,000 unidades (5 mg) de tenecteplasa por ml.

La potencia de tenecteplasa se expresa en unidades (U) utilizando un estándar de referencia, el cual es específico para tenecteplasa y no es comparable con las unidades utilizadas para otros agentes trombolíticos.

FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

Tenecteplasa es una glucoproteína recombinante activadora del plasminógeno.

Administrada vía intravenosa y tras su catabolismo a pequeños péptidos, es aclarada de la circulación general por su unión a receptores específicos hepáticos.

En comparación con el Activador tisular del plasminógeno (t-PA) endógeno, su unión a éstos es escasa, dando como resultado una prolongada vida media. El hígado es el principal órgano donde se distribuye. La vida media inicial es de 24 +/- 5.5 min (promedio +/- desviación estándar), la que es 5 veces más prolongada que la del t-PA endógeno. La vida media terminal es de 129 +/- 87 minutos y su aclaramiento plasmático es de 119 +/- 49 ml/min.

(tenecteplasa) es un activador del plasminógeno recombinante específico de la fibrina y es derivado del t-PA endógeno por modificación de tres sitios de su estructura proteica. Se une a los componentes de fibrina en los trombos y convierte selectivamente al plasminógeno en plasmina, la cual degrada la matriz de fibrina de dichos trombos. Respecto al t-PA endógeno METALYSE* (tenecteplasa) posee alta especificidad por la fibrina así como gran resistencia a la inactivación por los inhibidores endógenos (PAI-1).

Después de su administración, se puede observar un consumo dosis-dependiente de alfa-2-antiplasmina y un incremento de los niveles sistémicos de plasmina debido a la activación del plasminógeno.

-Métodos para evaluación de adherencias peritoneales.

Distintos métodos han sido usados para la evaluación en la formación de adherencias en cavidad peritoneal. De los cuales el modelo de experimentación en rata es el más ampliamente usado así como la respuesta biológica a las distintas terapias con la finalidad de disminuir la formación de estas adherencias (19)

Dos formas importantes de evaluación de las adherencias las cuales son la inspección macroscópica y puntaje el grado de adherencias presentes, la cuantificación de el grosor de tejido conectivo depositado en la superficie luminal de la pared abdominal, el último método es más preciso en la evaluación y objetivo en la medición ya que puede introducir métodos más reproducibles, adicionalmente métodos histológicos ofrecen al investigador la oportunidad de evaluar otros parámetros como la celularidad la cual es un reflejo de la infiltración como resultado de la respuesta inflamatoria montada y el segundo es la vascularidad resultado del proceso de neovascularización presente en la respuesta a el trauma.

Los modelos más representativos y usados en la evaluación de adherencias y respuesta a la terapia in vivo corresponde a el modelo de animal de rata. En este modelo se pueden reproducir usando la técnica de inyección intraperitoneal de talco estéril (silicato de magnesio anhidroso) en forma intraperitoneal, ya que ha demostrado induce inflamación y depósito de tejido conectivo (17).

Inflamación granulomatosa

Es un patrón característico de inflamación crónica que sólo se encuentra en algunos casos bien definidos de inflamación crónica. Un granuloma es un intento celular de aislar un cuerpo extraño que no puede ser fagocitado. Normalmente se produce una fuerte activación de linfocitos T, que induce a su vez la activación intensa de los macrófagos. Como resultado de esta activación, se producen los granulomas, que son focos de inflamación crónica, en los que el agente patógeno está en el centro, rodeado por macrófagos transformados en células pseudo-epiteliales, rodeados por leucocitos mononucleares, sobre todo linfocitos y en ocasiones células plasmáticas.

CONOCIMIENTO Y CAMPOS DE INVESTIGACIÓN EN ADERENCIAS PERITONEALES.

-Existe beneficio en la aplicación intraperitoneal de los fibrinolíticos en modelos de experimentación como profilaxis en la adherenciogénesis, tanto macroscópico como microscópico.

-La mayoría de los estudios no mostraron aumento en el índice de hemorragias o complicaciones en la cicatrización de la pared abdominal.

-No se ha establecido un consenso en la dosis en modelos de experimentación así como la cuantificación exacta de su beneficio a y su comprobación a nivel histológico.

- **El beneficio terapéutico con fibrinolíticos se ha demostrado con el uso de alteplase sin embargo no hay estudios con el uso de tenecteplase el cual es de la misma familia que alteplase, posee el mismo mecanismo de acción sin embargo cuenta con bioequivalencia distinta.**

-**Hasta el momento es controversial si el tiempo de aplicación del fibrinolítico (si es en postquirúrgico inmediato como profiláctico o el beneficio en adherencias ya formadas o aplicación tardía) y el tiempo de duración de la terapia. Por lo tanto hay falta de estudios usando el tiempo como variable.**

-Falta de estudios en animales en los que se compare los beneficios de la terapia con otros modelos de experimentación de adherencias (ya que la mayoría han sido realizados en el modelo de abrasión y lesión térmica y no en otros modelos como en el de sepsis con ligadura y punción de el ciego o aplicación de cuerpo extraño en los que se fuerza una mayor respuesta inflamatoria y cicatrizal).

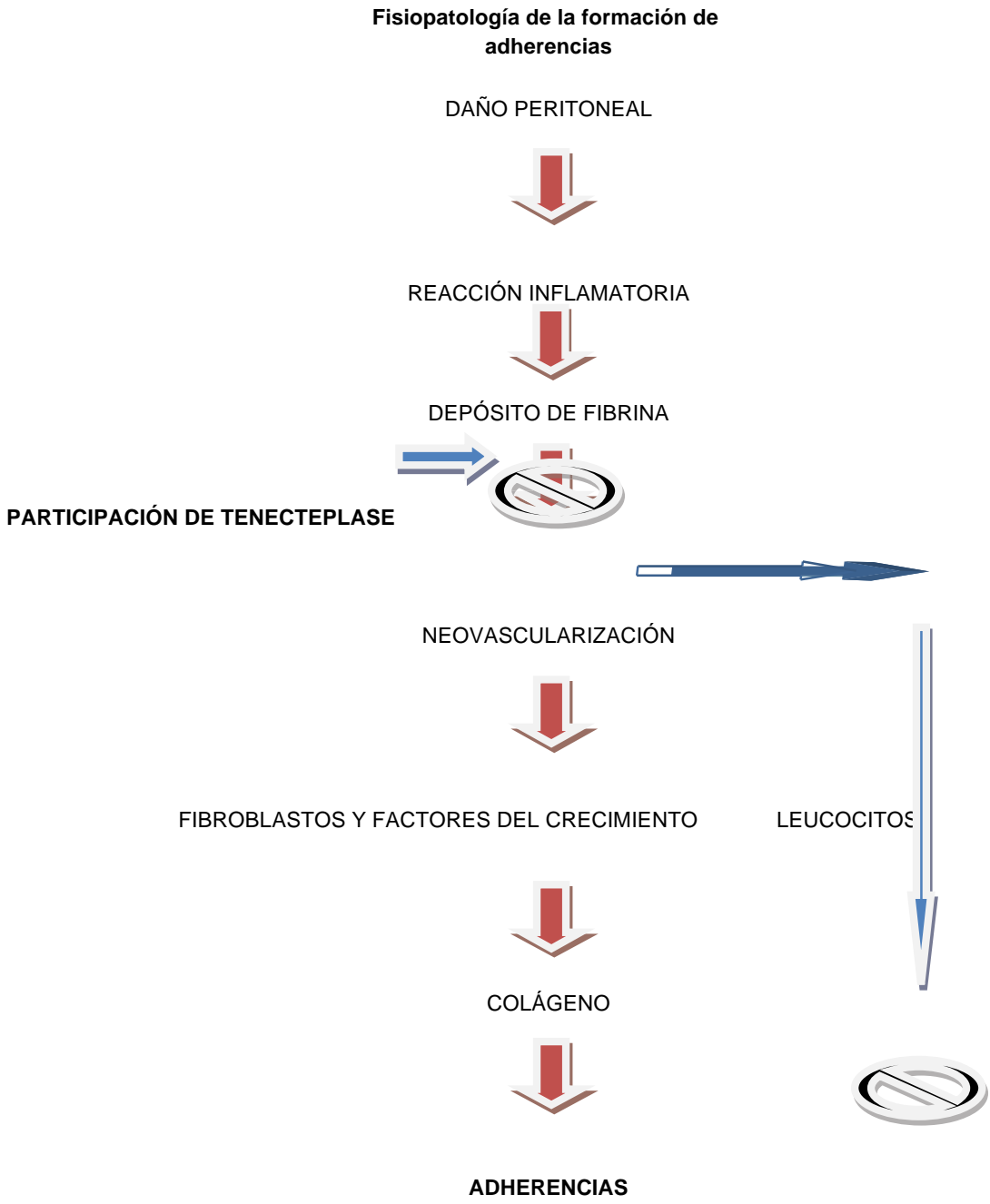


Fig1.4 Se muestra la cascada de eventos en formación de adherencias y el paso limitante con el uso de fibrinolíticos para inhibición de adherencias.

V. JUSTIFICACION

Por lo revisado en la literatura con respecto al tema y los resultados reportados por distintos autores se presenta las siguientes cuestiones las cuales justifican el desarrollo de nuestro estudio:

-Falta de estudios que comparen el uso específico de tenecteplase como reductor en la formación de adherencias.

-No existen estudios que usen tenecteplasa en su lugar alteplasa (de la misma familia y con el mismo mecanismo de acción pero diferente bioequivalencia); por los antecedentes previos antes referidos en los cuales alteplasa (que es de la misma familia de medicamento que tenecteplase con el mismo principio activo y mecanismo de acción) ha demostrado beneficio. Se estima que tenecteplasa también reducirá la formación de adherencias con la misma intensidad que alteplasa (Score de Evans y variables dependientes microscópicas).

- No hay estudios experimentales que comparen el uso en diferentes momentos en el tiempo, como la aplicación temprana y la tardía que se muestran en el siguiente estudio piloto.

INVESTIGACION

Las adherencias posoperatorias son un problema clínico importante se realizó un estudio para comparar el efecto de tenecteplase con aplicación intraperitoneal a las 24 hrs. y 21 días tras generar el estímulo inflamatorio para la formación de adherencias intraperitoneales, mediante el modelo de aplicación de aplicación intraperitoneal de talco estéril para la producción de adherencias el cual es bien conocido su efecto como formador de adherencias se evaluará los resultados en modelo animal en rata.

IV. OBJETIVO

· General:

Observar el efecto de tenecteplase (activador tisular del plasminógeno aTP) aplicado por vía intraperitoneal a las 24 horas y 21 días en el modelo de roedor de producción de adherencias mediante la aplicación intraperitoneal de talco estéril.

· Específicos:

-Observar el efecto que tiene tenecteplasa como fibrinolítico aplicado intraperitoneal en la inhibición de formación de adherencias intrabdominales vs. Resultados obtenidos en la literatura con el uso de alteplase.

-Observar el efecto de tenecteplasa intraperitoneal sobre la disminución del score de Evans en cada uno de los grupos de estudio en los que se uso esta terapia.

-Observar el efecto de tenecteplasa intraperitoneal sobre la disminución en milímetros del tamaño de la banda fibrosa.

-Observar el efecto de tenecteplasa por vía intraperitoneal sobre la disminución en la vascularidad de la fibrosis en cada uno de los grupos de estudio.

-Observar el efecto que tendrá tenecteplasa intraperitoneal sobre la disminución en el número de macrófagos contenidos en la fibrosis peritoneal.

-Describir efectos adversos de estos medicamentos sobre el grupo biológico en estudio.

V. HIPOTESIS

Si la aplicación intraperitoneal de tenecteplasa aplicada a las 24 del estímulo formador de adherencias intraperitoneales, afectando las características macroscópicas e histológicas demostradas en la reducción del score de Evans, grosor en milímetros de la banda fibrosa, celularidad y numero de vasos por campo. Entonces observaremos que la aplicación intraperitoneal de tenecteplasa a mas de 21 del mismo estimulo, también podrá disminuir la formación de adherencias afectando las características macroscópicas y microscópicas de la banda fibrosa y reduciendo el score de Evans, grosor en milímetros de la banda fibrosa, celularidad y vascularidad.

Además de la demostración de el efecto de tenecteplasa se comprobó los efectos obtenidos con aplicación temprana versus los efectos obtenidos con la aplicación tardía, de esta manera los autores presuponen que el tiempo de aplicación en un rango de dos días (aplicación temprana) vs. Aplicación tardía a las dos semanas pos inducción de adherencias) no cambian los hallazgos en el score de Evans y las variables microscópicas. En ambos estudios no hay reportes en la literatura y se puede sentar precedente como un modelo para estudios próximos con mayor número de muestra así como establecimiento de la dosis

Es por eso que la aplicación tardía tiene el beneficio teórico que una aplicación terapéutica diferida a una adherenciolisis convencional o cualquier otro procedimiento quirúrgico de disminuir el potencial de complicaciones de una aplicación inmediata, ya que una administración de más de 21 días del inicio de la cicatrización peritoneal deja un periodo libre del medicamento el cual no interfiera con los mecanismos naturales de reparación así como de hemostasia los cuales son muy importantes en el Posoperatorio inmediato. Esto es dando un adecuado tiempo para un cierre de anastomosis, cierre primario y un óptimo control hemostático.

Es por eso que es de vital importancia para los investigadores resolver este cuestionamiento, que una aplicación diferida, o el efecto que se demuestra sobre las adherencias parcialmente formadas. Sin necesidad de tener que aplicarlo de forma inmediata a un agente formador de las mismas.

VI. METODOLOGÍA

Se respetaron los lineamientos de seguridad, así como de bioética en cuanto al manejo de animales de experimentación, tanto en el cuidado, régimen de alimentación aplicación del medicamento mediante sedación y sacrificio de animal mediante uso de cloroformo, sin presentar tortura o sufrimiento en los animales de experimentación.

Estudio piloto Se tomo una muestra de 30 sujetos para una distribución normal.

Tipo de estudio ensayo experimental controlado con modelo animal con rata; seguimiento a 30 días a partir del inicio del estudio.

Lugar de estudio: Departamento de Cirugía experimental del Hospital General de México y servicio de Patología del Hospital General de México.

Universo

Población: 30 ratas adultas macho (Wistar Albino del género Ratus Norvegicus) proporcionadas por el servicio de cirugía experimental en el Hospital General de México. Con peso de rango de entre 400 a 450 grs.

Modelo de formación de adherencia: Se tomara como base la metodología para inducción de adherencias en rata tomando en cuenta la inducción mediante la técnica de punción intraperitoneal de 5ml de agua inyectable mas talco estéril al 20% (20grs/100ml al 20% diluido en agua inyectable. (30).

Se dividió aleatoriamente en 3 grupos con las siguientes características:

- Grupo control placebo: 10 ratas
- Grupo control tenecteplasa aplicación inmediata: 10 ratas.
- Grupo experimental tenecteplasa aplicación tardía: 10 ratas.

Criterios de inclusión:

- Raza Ratus Norvegicus, variedad albina. Edades entre 4 a 11 meses.
- Sanas.
- Peso de entre 400 a 450 gramos.
- Ratas Macho.
- Provenientes de el bioterio de el servicio de cirugía experimental del Hospital general de México.

Se eliminaron de nuestro estudio las ratas que tuvieran las siguientes características:

- Edad menor a 4 meses.
- Que fallecieran durante el estudio.
- Que enfermaron durante el estudio.
- Que fueran lesionadas durante el estudio (lesión intestinal o vascular postpunción).
- FALTA DE DEPÓSITO DE CRISTALES DE TALCO ESTO E LAPAROTOMIA NORMAL, O HALLAZGOS COMPATIBLES CON PUNCIÓN Y APLICACIÓN DE TALCO O FARMACO FUERA DEL CAMPO DE APLICACIÓN O INTRAPERITONEAL.

Material:

3 frascos de (tenecteplase, activador tisular del plasminógeno) Cada frasco ampula con liofilizado contiene:

METALYSE®10ml.

Cada frasco ampula con liofilizado contiene:

Tenecteplasa 50 mg (10,000 U)

Excipiente, c.s.

Cada jeringa con diluyente contiene:

Agua inyectable 10 ml.

La	solución	reconstituida	contiene	1,000	unidades
(5 mg) de tenecteplasa por ml					

Justificación del uso y la dosis de tenecteplasa:

El estudio se realiza con tenecteplasa, sin embargo el planteamiento inicial fue con alteplasa con el mismo mecanismo de acción y aplicado por la misma vía intraperitoneal, ya que existen estudios en donde se demostró beneficio al aplicarlos en modelo de adherencias en rata y valides en la dosis aplicada. Por cuestiones logísticas y de recursos disponibles los autores solo cuentan con tenecteplasa para realización del estudio, del cual a pesar de tener el mismo mecanismo de acción y en cuestión de farmacocinética contar con mejor perfil en cuanto duración y potencia se presupone que por fundamentos teóricos tenecteplase será cuando menos igual de efectivo que alteplasa en cuanto a su uso como reductor de adherencias.

Por lo tanto no hay reportes en la literatura en los cuales se use específicamente tenecteplase como reductor de adherencias ni tampoco ni se cuenta con una dosis estándar de aplicación en rata a diferencia de alteplasa. La bioequivalencia no es la misma para alteplasa que de tenecteplasa (de hecho es más potente que alteplasa por unidad de fármaco al ser una molécula más estable en cuanto a su degradación); Por lo que la dosis aplicada es empírica se obtiene como justificación la aplicación de 5mg/kg. De peso de animal vivo equivalente a 1000 U o dosis por gramo de 0,005 mg – equivalente a 1 U por gramo de tejido, correspondientes a la dosis medida diluidas en 10 ml de agua inyectable, como forma de racionalizar el medicamento (esto es al fraccionarse en más de 40 aplicaciones distintas) y al hacer comparación proporcional estimando el volumen del fármaco de tenecteplase vs. Alteplase es mayor la proporción de medicamento tanto en unidad, proporcionado al volumen del frasco que con alteplase. Aunque se toma en cuenta por parte de los autores que puede ser una dosis insuficiente y que puede no mostrar ningún cambio con respecto al grupo de inducción o no mostrar efecto alguno, por lo que se reportará como modelo fallido con las dosis establecidas y la técnica antes mencionada.

Talco estéril 25 gr.

30 Ámpulas de 2.5 ml con Agua inyectable.

30 ratas Winstar albino de entre 400 a 450 gramos.

30 frascos estériles.

- formol 1000 cc.

Tinciones para tricómico de Masson y hematoxilina eosina.

Definición de variables

Variable independiente: Es la aplicación del medicamento y el tiempo en que se administra (1er día vs 21 días.)

Variables dependientes: Es la formación de adherencias cuantificadas según los parámetros expuestos a continuación.

Medición macroscópica: Solo es una y es de tipo ordinal, se utilizara la escala de medición propuesta por Evans et al.(3) (1993). Y se evaluara como leve, moderado a severo.



Fig 2.1 Imagen macroscópica de adherencia firme representativa catalogada como Evans 3. asa- asa y asa pared así como el depósito de partículas de talco en forma de granulación organizada con mayor predominancia en superficie serosa del hígado, con adherencia de epiplón a hígado creando banda fibrosa, es una muestra representativa para análisis histológico se cataloga como Score de Evans 3 requiere de corte firme para sección de la adherencia.



Fig. 2.2 Imagen representativa de Rata Grupo 2 Compatible con Score de Evans 2 Adherencias que requieren tracción firme para su lisis, sin requerir disección cortante.



Fig. 2.3 Imagen representativa de nuestro estudio compatible con Score de Evans 1 adherencias laxas que puede eviscerarse sin problemas el contenido de la pared abdominal.



Depósito de talco, con formación mínima de adherencia. Score Evans asignado 1 se lisan con tracción fina. Obsérvese el desplazamiento de las asas de forma espontánea y la poca formación de adherencias.

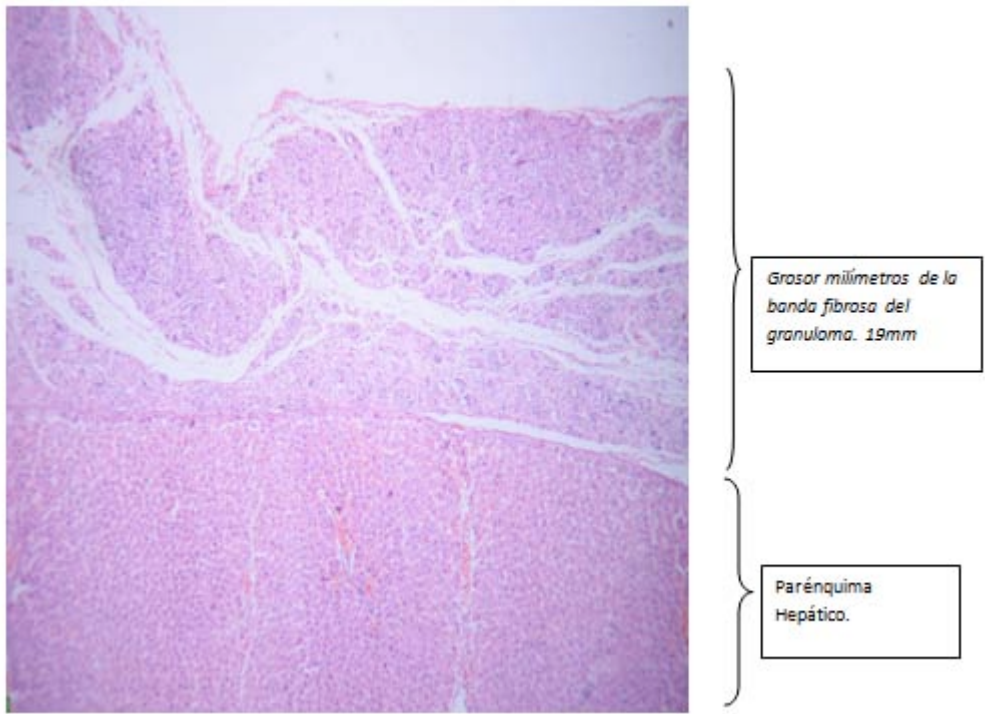
Fig. 2.4 Imagen Evans 1 solo llegando a verse depósito de partículas de talco sin formación de adherencias asa asa o asa pared firmes.

Medición Histológica: histológica para la valoración de modelos antiaherencias de rata como:

La medición de las variables microscópicas son el grosor en milímetros de la banda fibrosa compuesta por la formación de granulomas como otros autores realizaron (16), así como la medición de número de vasos por campo y número de macrófago por campos (células gigantes multinucleadas, como marcadores histológicos de inflamación que se relacionan con el grado de formación de adherencias maduras y firmes como visto por otros autores. (16)

Variables microscópicas: Son tres variables de tipo continuo con expresión numérica y fraccionada; medidas de forma ciega y aleatoria por el servicio de patología del Hospital General de México. Se enviarán muestras en frascos estériles con formol de cada una de las 30 ratas que conforman el estudio con resección de bloques de 5x5x5 mm, del tejido sobre la línea media de espesor total de la pared abdominal peritoneo parietal. Serán revisadas a microscopio de luz con 40 x de campo visión con tinción de hematoxilina Eosina así como tinción de tricromico de Masson para cuantificar la densidad de fibras de colágena presentes en las bandas fibrosas firmes; los parámetros a evaluar son:

-El Grosor en milímetros del depósito de colágeno de la banda inflamatoria teñido con Hematoxilina Eosina; esta se determina desde el fin de la membrana serosa visceral o parietal, hasta el límite de la banda fibrosa o granuloma.



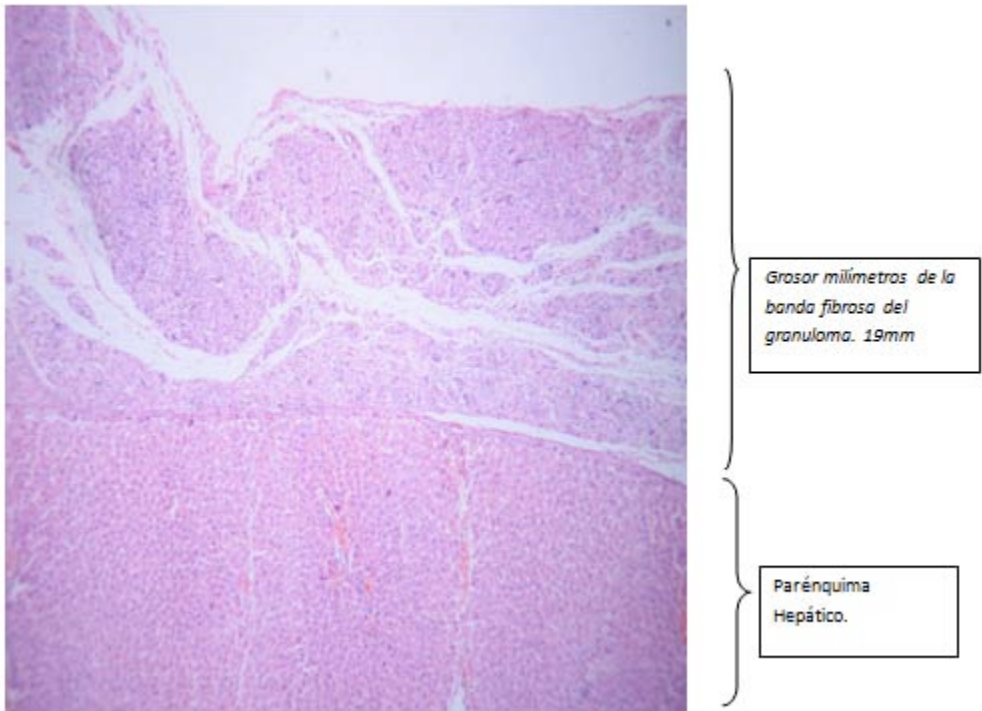


Fig. 2.5 Corte transversal sobre parénquima hepático en el cual se encuentra depósito de banda fibrosa por arriba de la capa del mesotelio que recubre al parénquima hepático así como medición en milímetros desde el mesotelio hasta el límite integro de la banda fibrosa.

-El Grado de inflamación: Se puede expresar en el número de leucocitos/ macrófagos por campo en este caso neutrófilos presentes durante la fase aguda o macrófagos durante la consolidación de la inflamación por campo de 40.

Pared abdominal, peritoneo y musculo	Depósito inflamatorio de banda de adherencia, asa pared.
--------------------------------------	--

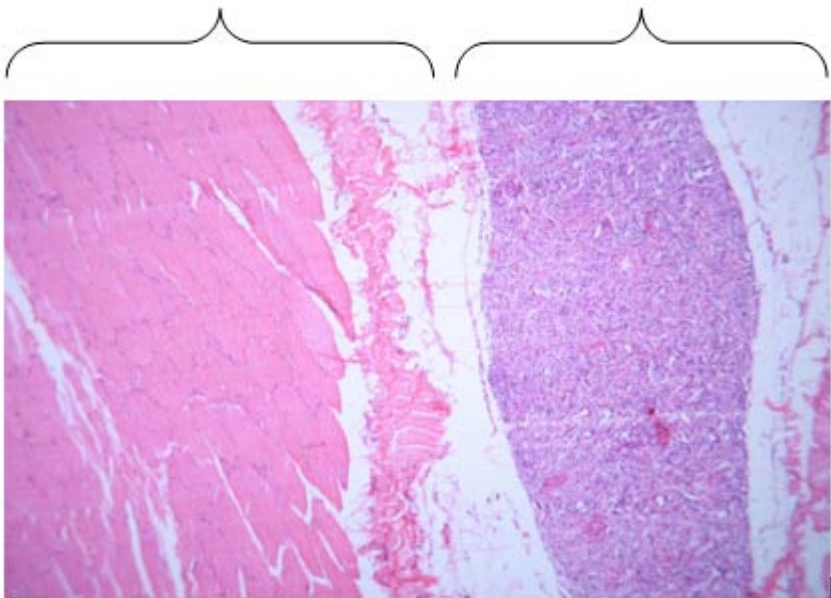


Fig. 2.5 Otra imagen representativa del grosor de banda fibrosa medido desde el corte histológico transversal desde la pared abdominal observese el musculo de la pared abdominal asi como peritoneo y deposito de banda fibrosa.

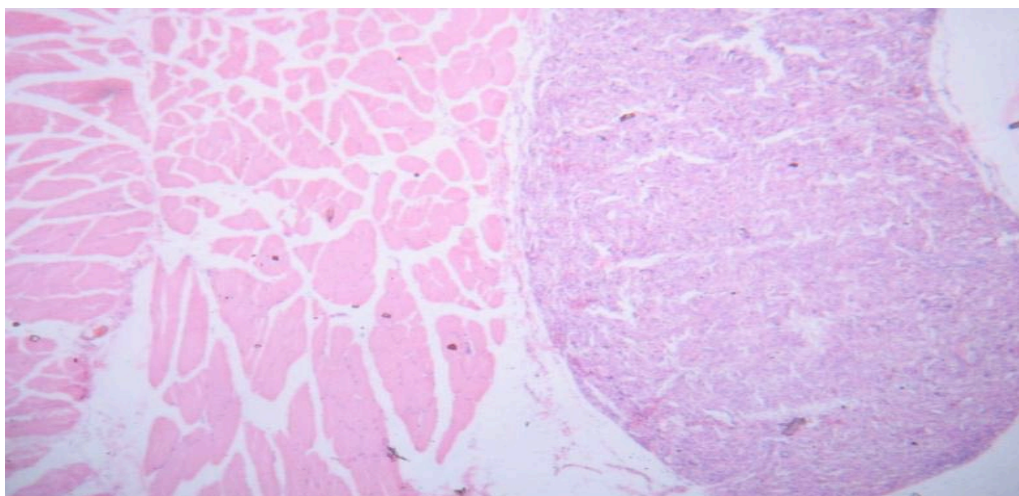


Fig. 2.6 Otra imagen de corte transversal desde la pared abdominal en la cual se muestra depósito de banda fibrosa.

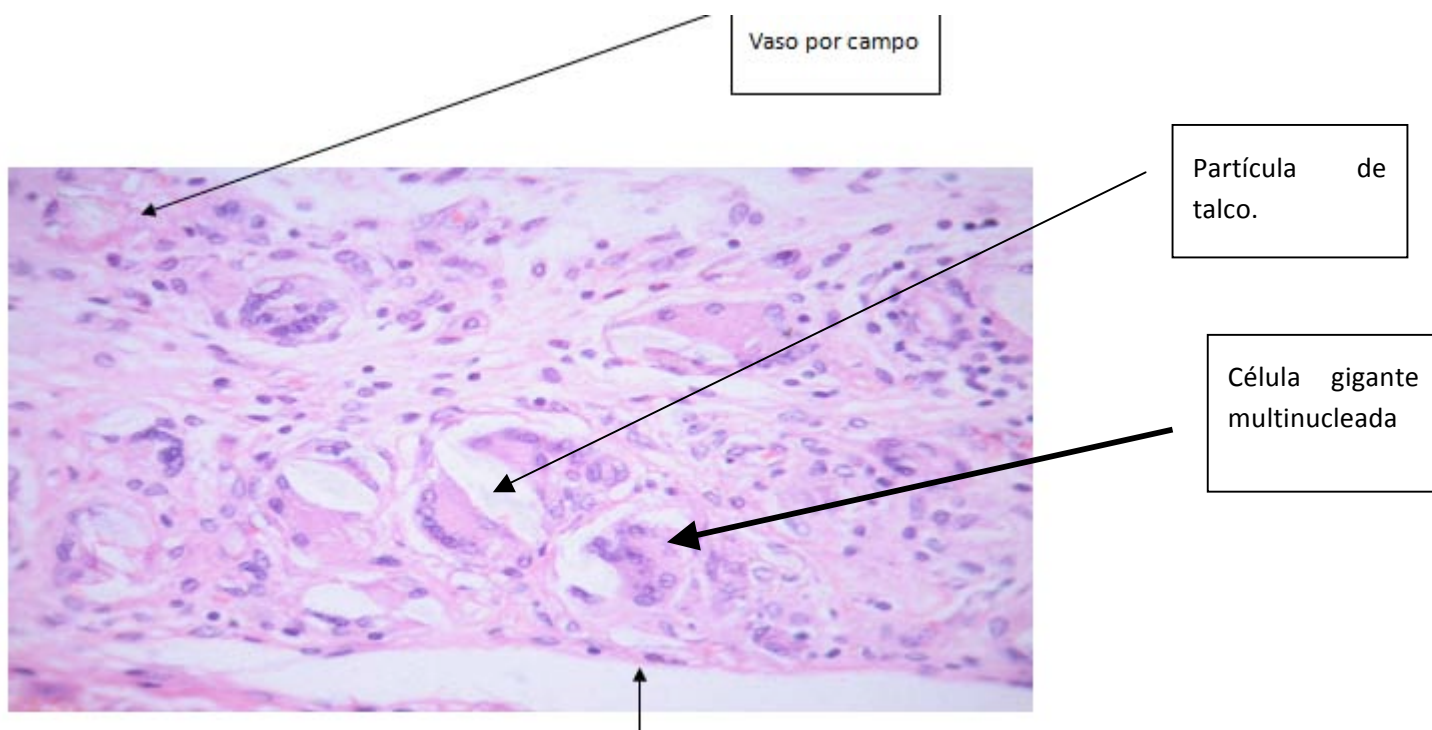


Fig. 2.7 Corte Histológico a gran aumento sobre la banda fibrosa en segmento de 1x1 mm en el cual se evidencian loscomponentes de la banda fibrosa, los cuales se aprecia reacción inflamatoria, partículas de talco asi como células gigantes multinucleadas, y microcapilaridad.

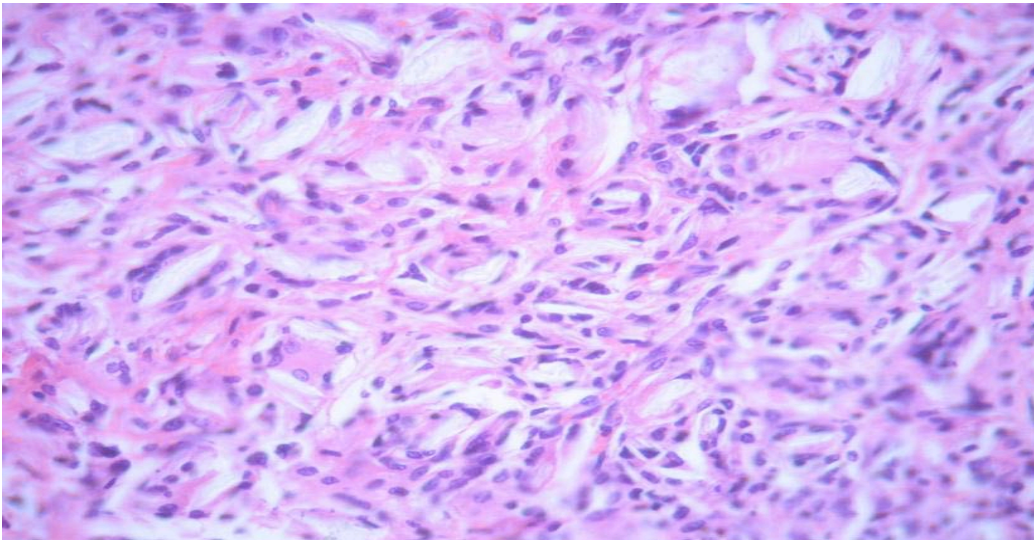


Fig 2.8 Corte histológico donde se muestra otra imagen de reacción inflamatoria de tipo granulomatosa a cuerpo extraño.

Donde el depósito de partículas de talco alrededor de halos fibrosos englobados en formación de granulomas con presentación de células gigantes multinucleadas. Se toman muestras representativas y se exponen con cortes transversales del parénquima hepático donde se presenta la mayor cantidad de reacción fibrosa y se puede demostrar la celularidad, depósito de material representado sobre la línea de serosa con

-El Grado de vascularidad: Se expresa en el número de vasos de neo formación por camp de 40 o de 100x.

La tinción se llevo a cabo bajo la misma técnica, con el mismo tiempo de preparación de la misma muestra y del mismo sitio y por el mismo equipo de patología para medición de depósito de colágeno.

Medición cualitativa del grado de depósito de colágeno medida por histograma de pixeles mediante software de interpretación digital del número de pixeles.

En esta técnica de medición se recolectaran las muestras significativas y se teñirán con tricromico de Masson, bajo la misma técnica y con el mismo patólogo y bajo las mismas características y se obtendrá una fotomicrografía representativa de cada uno de los tres grupos. Recordarse que el tricómico de Masson es una técnica usada en patología para tinción y muestra la cantidad de colágena presente en un tejido la cual se tiñe de color azul implicando la presencia o ausencia de bandas de colágena, mediante esta técnica las muestras representativas serán procesadas en fotomicrografías y procesadas mediante un software que cuantifica la densidad de pixeles de color azul y de manera directa se medirá la cantidad de color azul (equivalente indirecto de presencia de colágena) y se cuantificara la cantidad de color azul mediante numero de pixeles por campo para comparar entre cada uno de los grupos y evidenciar si existió y la cantidad de colágeno que se deposito en cada grupo y evaluar si existe o no algún cambio.

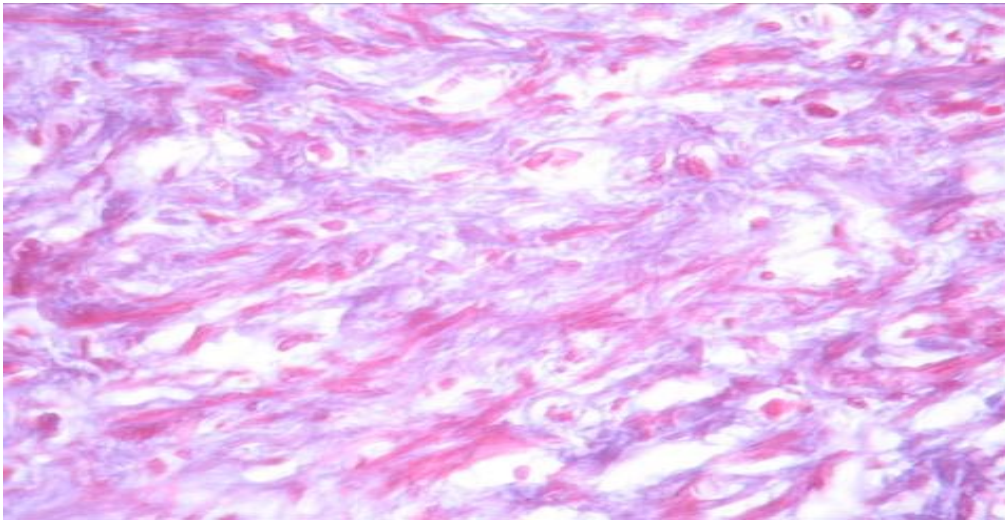


Fig 2.9 Imagen de Tricrómico de Masson sobre el mismo segmento de banda fibrosa en el cual se evidencia de color azul la presencia de bandas de colágeno.

Y en la figura 2.2 se muestra cortes a gran aumento 40x en la cual se toma como referencia para la medición del número de vasos sanguíneos por campo. Se toman así tinciones con tricrómico de Masson en las cuales de forma apreciativa se representa la tinción en azul violeta dada por depósito de colágeno sobre la pieza.

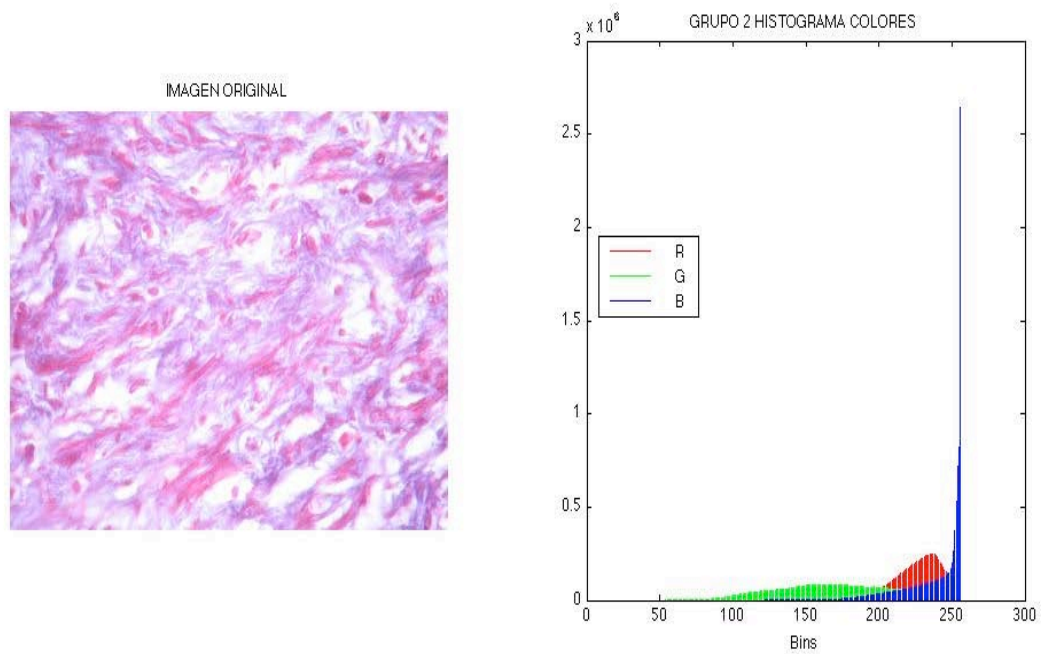


Fig 2.10 Histograma de pixeles. En el cual se toma una imagen representativa y mediante programa se separan los pixeles contenidos en color azul de fotomicrografía y se ordenan según la densidad de la imagen total y como se distribuyen.

Antes de empezar todas las ratas se revisaron los criterios de inclusión y exclusión y serán pesadas asignadas un número de identificación con folio y divididas al azar en tres grupos.

Todas las variables fueron evaluadas por los mismos observadores que no conocían que grupo pertenecían las muestras.

Se prepararon las siguientes diluciones de los siguientes fármacos:

Dilución de talco estéril en una solución de 500 ml con 50 gramos de talco estéril (colocado en autoclave) con esto se forma una solución salina con talco estéril al 10%. En donde la aplicación individual por rata es a 1 ml de talco estéril al 10%.

Dosis individual de tenecteplase: Como presente estudio piloto, se propone dosis inicial de tenecteplasa a

-5mg/kg. De peso de animal vivo equivalente a 1000 U.

-Dosis por gramo de 0,005 mg – equivalente a 1 U por gramo de tejido.

El peso promedio de las ratas en nuestro estudio es de 450 gr. En promedio por lo que una dosis promedio usual corresponde a:

- 450 U.
- 2.25 mg. De tenecteplasa.
- Correspondientes a: 0.45 ml de medicamento.

La siguiente administración fue de 0.45 ml aforados en 10 ml de solución salina para su aplicación intraperitoneal.

La dosis administrada es empírica y se fundamenta al racionalizar el producto de tenecteplase por su elevado costo de tal manera que la siguiente dosis puede ser aplicada a más de 40 aplicaciones.

El medicamento no puede ser guardado, después de su apertura se cuenta con 24 horas para la aplicación del mismo.

Con base al mismo se conformaran 3 grupos divididos al azar para formar un estudio de estudio de 10 ratas en cada grupo; todas recibirán en un mismo tiempo y a la misma dosis y dilución la inducción con talco estéril como inductor en la formación de adherencias por vía intraperitoneal, después se catalogan en tres grupos:

Grupo 1 control con placebo solo recibió solución Hartmann. 10 ml por vía intraperitoneal (probará la veracidad del talco estéril como inductor de adherencia.

Grupo 2 control con aplicación inmediata la inducción de tenecteplase inmediatamente a la inducción con talco estéril. A razón de -5mg/kg. De peso de animal vivo equivalente a 1000 U.

-Dosis por gramo de 0,005 mg – equivalente a 1 U por gramo de tejido, correspondientes a la dosis medida

Diluidas en 10 ml de agua inyectable.

Grupo 3 experimental aplicación tardía de tenecteplase por vía intraperitoneal (aplicación tardía se refiere a tres semanas después de la inducción de talco estéril como formador de adherencias). Durante la fase inicial las dos primeras semanas postinducción recibirá aplicación de 10 ml de Sol. Hartmann.

DESCRIPCION POR FASES

Primera Fase

INDUCCION DE ADHERENCIAS Y APLICACIÓN TEMPRANA

Se comienza con inducción anestésica de las 30 ratas previa rotulación del el folio en la cola de las mismas y rasurado de la cara anterior del abdomen.

Se administrara por rata a los tres grupos a razón de 1 ml de talco estéril en solución salina al 10% por vía intraperitoneal a los tres grupos.

Posteriormente los siguientes grupos se realizarán los siguientes cambios:

Grupo 1 (ratas foliadas del 1 al 10) o control con placebo solo recibirá posterior a la inducción sol. Hartmann 5 ml, diariamente 2 ml por vía intraperitoneal por una semana de tratamiento.

Grupo 2 (ratas foliadas de 11 a 20) Grupo control con aplicación inmediata a la inducción de talco estéril por vía intraperitoneal a razón de 5mg/kg. De peso de animal vivo equivalente a 1000 U.

-Dosis por gramo de 0,005 mg – equivalente a 1 U por gramo de tejido. Diluidas en 5ml de agua inyectable se realizarán dos aplicaciones la primera a las primeras 24hrs postinducción y la segunda dosis a las 48 hrs post inducción por vía intraperitoneal.

Grupo 3 (ratas foliadas de 21 a 30) Solo recibirá solución salina en la primera semana de tratamiento posterior a la inducción.

Segunda Fase APLICACIÓN TARDIA 21 días postexposición de talco estéril.

Grupo 1 solo recibirá solución Hartmann, diariamente 2 ml por vía intraperitoneal por una semana más de tratamiento.

Grupo 2 Grupo control con aplicación inmediata la inducción, suspende el tratamiento con tenecteplasa.

Grupo 3 Grupo experimental Se comienza con la terapia de tenecteplasa a razón de Dosis por gramo de 0,005 mg – equivalente a 1 U por gramo de tejido.

Diluidas en 5ml de agua inyectable se realizarán dos aplicaciones la primera a los 21 días postinducción y la segunda 48 hrs después de la primera dosis.

Tercera fase RECOLECCION DE LA MUESTRA

A los 21 días posteriores a la inducción los tres grupos serán sacrificados y se comenzará con el análisis individual por espécimen se comenzara con la evaluación macroscópica con documentación en digital midiendo los parámetros de el Score de Evans asignando el grado de el score más significativo a cada rata de cada grupo.

Se obtendrán muestras para análisis histológico se tomará un segmento de la pared abdominal anterior de la rata con las siguientes dimensiones 1x1 cm. De dimensiones con espesor total de la pared abdominal y se enviara a revisión histológica en frascos individuales con formol.

Se medirán las variables dependientes con los siguientes datos:

Vascularidad: Numero de vasos por campo de gran aumento.

Celularidad: reflejo de inflamación numero de leucocitos por campo de gran aumento.

Grosor en micras del depósito de colágena teñida con tricromico de Masson sobre la monocapa mesotelial de banda fibrosa.

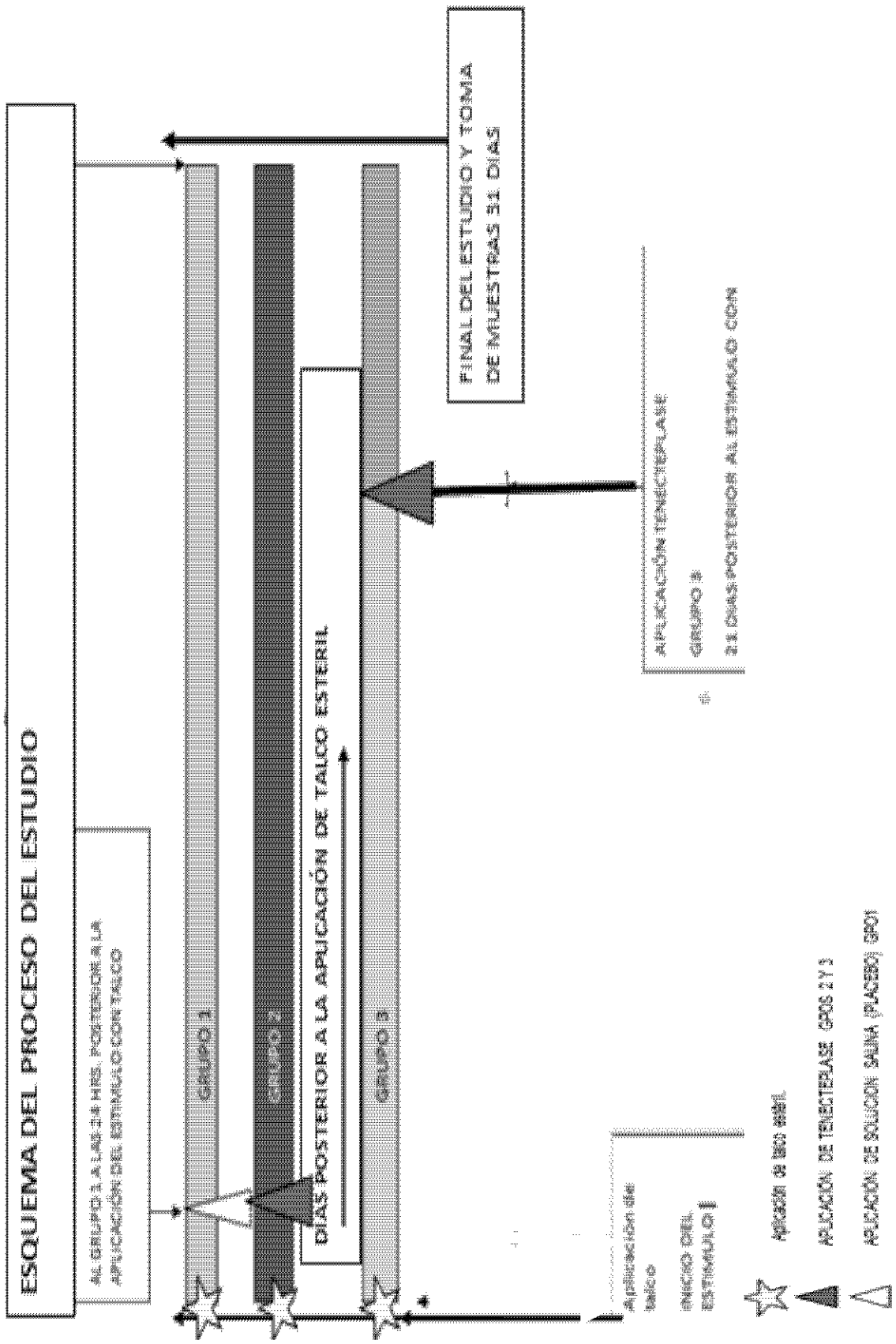


Fig. 2.11

Fig. 1.3 Esquema del Proceso del estudio

ANÁLISIS ESTADÍSTICO EMPLEADO

Se usaron pruebas paramétricas y no paramétricas como ANOVA en dos dimensiones, curva de Friedman y como KruskalWallis.

Aspectos éticos y de bioseguridad

Se realizaran todos los procedimientos bajo estricto control antiséptico y protección del personal que participa en el proyecto.

Las ratas serán anestesiadas con cloroformo, así como sacrificio de los roedores durante la recolección de muestras.

Se reportarán datos de morbilidad y mortalidad con las dosis establecidas de los medicamentos.

Las ratas serán cuidadas por parte del servicio de de Cirugía Experimental Hospital General de México.

Se respetaron todos los principios de bioética en el manejo de los modelos vivos animales.

RESULTADOS


Se procesaron 30 ratas; ninguna falleció durante la realización del experimento.

Un universo total de 25 muestras fueron representativas (83% del tamaño de la muestra), ya que se eliminó el 16% (5 ratas) (tabla 1.1). Debido a que no se visualizó ningún depósito de talco en la superficie peritoneal compatible con punción fuera del área a estudiar y por lo tanto no se mostraron hallazgos patológicos tanto macro o microscópicos, de inflamación se encuentran marcadas en negro en la tabla 1.1.


En la Tabla 1.2 se muestra la tabla de recolección de datos. Se encuentran en color de fondo cada uno de los diferentes grupos y se desglosa el concentrado de variables por cada número de rata. El score macroscópico obtenido así como el grosor de la banda fibrosa en milímetros sobre la serosa, número de vasos y de células gigantes multinucleadas por campo aumento 40x

Tabla 1.1


FOLIO RATA	DE	SCORE DE EVANS	VASOS POR CAMPO	NO DE CEL. GIGANTES X CAMPO	GROSOR EN MILIMETROS DE GRANULOMA
1		3	9	3	5
2		2	7	9	10
3		3	5	6	12
4		3	7	9	17
5		0	0	0	0
6		3	6	7	7
7		3	3	6	5
8		2	7	7	5
9		1	11	8	9
10		2	5	3	19
11		2	4	4	7
12		2	2	7	4
13		1	6	13	25
14		0	0	0	0
15		0	0	0	0
16		1	7	5	5
17		0	0	0	0
18		2	4	7	7
19		2	8	12	10
20		3	10	7	8
21		0	0	0	0
22		1	2	3	3
23		1	3	3	2
24		1	5	3	1
25		1	4	5	2
26		2	1	4	1
27		2	5	4	2
28		2	5	9	1
29		2	3	4	7
30		1	11	7	6




Grupo 1



Grupo 2



Grupo 3



Sujetos eliminados

Descripción General GRUPO 1

Dentro de la tabla 1.2 ratas del grupo 1 con unapoblación de 9/10 ratas total de 90% , una rata se elimina del estudio por no mostrar depósito de cristales de talco intraperitoneales, probable punción retroperitoneal, una media de presentación del score de Evans de 2.4 (escala nominal de 0 a 3) con una media de 9.8 mm en milímetros del grosor que presenta la banda fibrosa sobre la superficie de serosa, hepática, con media de 6.6 vasos por campo así como de 6.4 células gigantes multinucleadas. En las imágenes () se muestran imágenes representativas de los cortes de ratas del grupo 1 macro y microscópico.

	NUMERO DE RATAS(N/%)	SCORE DE EVANS MEDIA DE GRUPO	MEDIA MILIMETROS BANDA FIBROSA	NUMERO DE VASOS POR CAMPO MEDIA DE GRUPO	NUMERO DE CELULAS GIGANTES POR CAMPO.
GRUPO 1	9/90%	2.4	.98 mm	6.6 vasos x campo	6.4 cels gigantes
GRUPO 2	7/70%	1.85	.94 mm	5.8 vasos x campo	7.8 cels. Gigantes
GRUPO 3	9/90%	1.4	.27 mm	4.3 vasos x campo	4.6 cel. Gigantes

Tabla 1.2

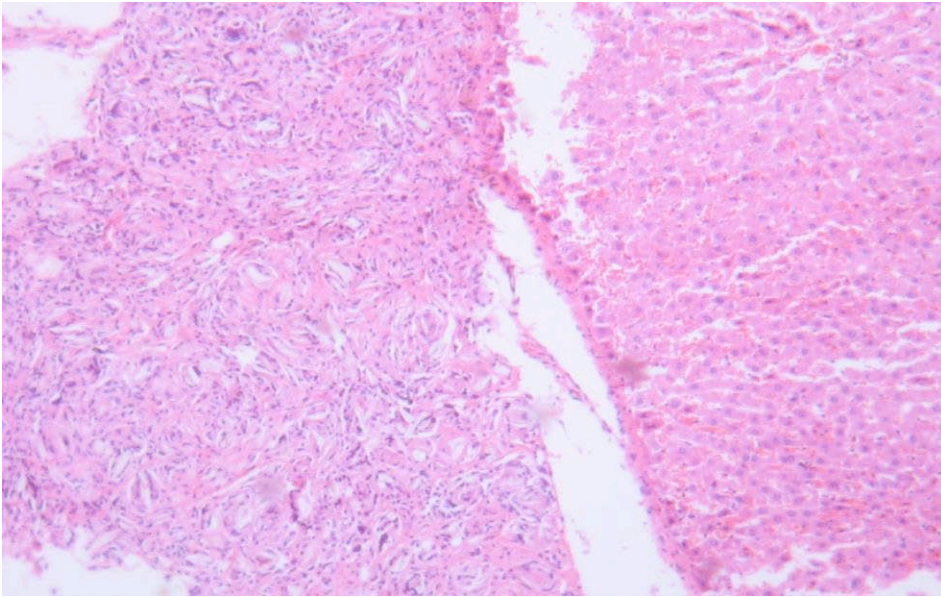


Fig 2.11 *Banda fibrosa compuesta por inflamación granulomatosa a cuerpo extraño sobre la superficie de la serosa del hígado, se muestra corte transversal histológico sobre parénquima hepático y mesotelio de rata del grupo 1 con medición de hasta 1.7mm*

Descripción general GRUPO 2

Se presentan 7 reportes de laparotomía en rata positivos para aplicación de talco intraperitoneal compatible con el 70% de la población, se excluyen 3 casos, El grupo con aplicación temprana se muestra media de el score de Evans de 1.85 , en el corte histológico se aprecia el grosor del banda fibrosa en milímetros del borde de la serosa con media de 9.4 mm ,de media de células gigantes es de 7.8 células por campo y número de 5.8 vasos por campo.

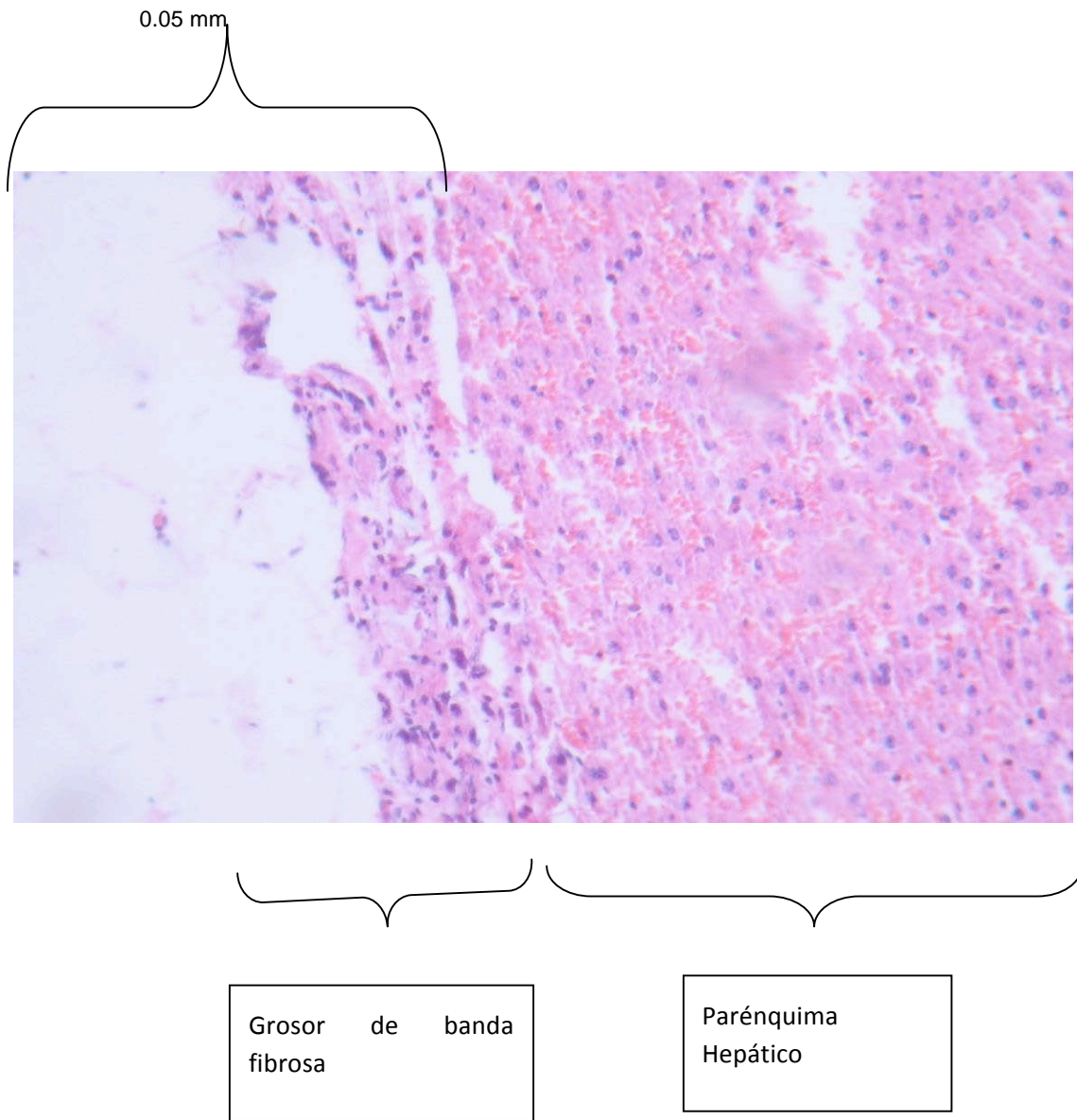
Se muestran en figuras 2.12 imágenes representativas del grupo 2



Fig 2.12 Imagen macroscópico Adherencia típica Evans tipo 2 observase en el mismo sujeto como pueden liberarse mediante tracción firme sin utilización de corte.

GROSOR DE LA BANDA FIBROSA

Fig. 2.13 *DISMINUCIÓN EN MILIMETROS DE GROSOR de la banda fibrosa a menos de 0.5mm que se muestra en rata del grupo 2 comparandola con*



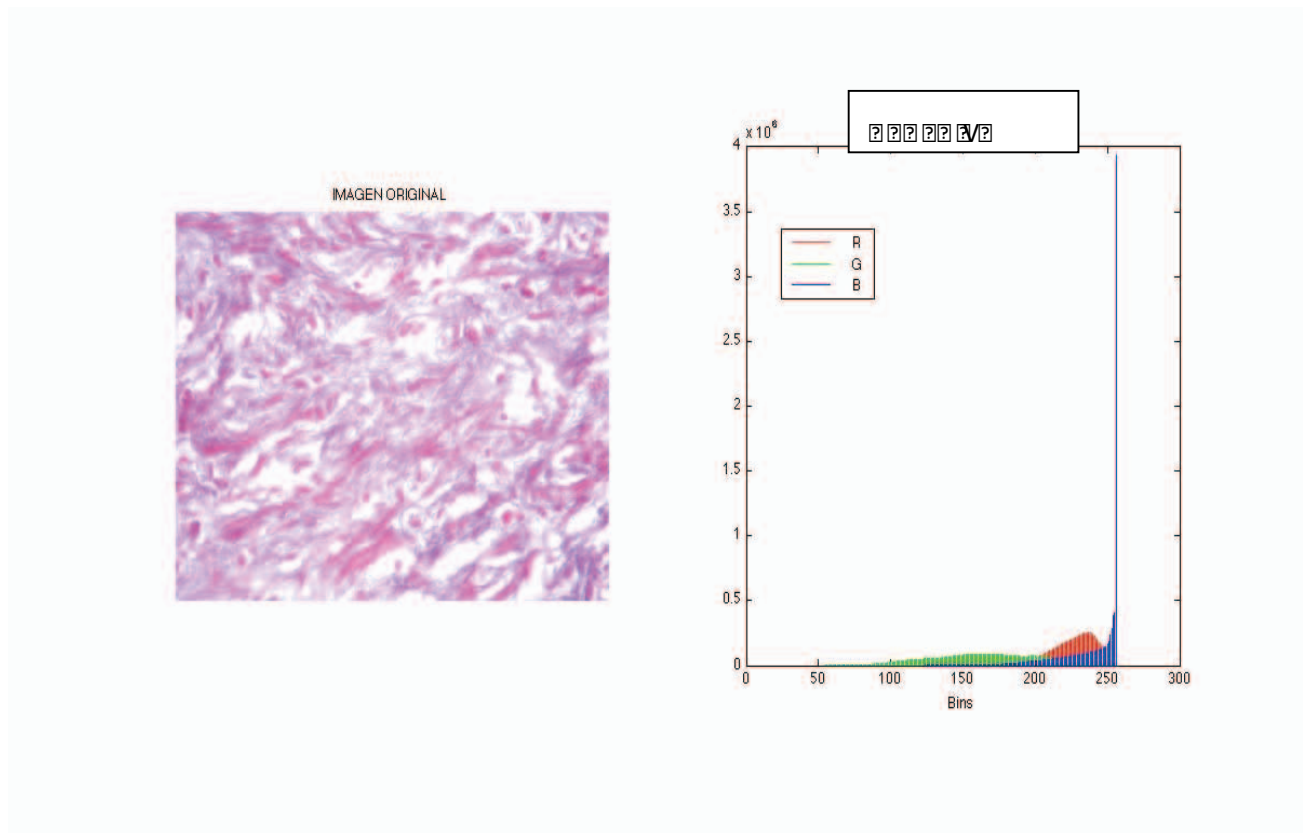


Fig.2.13 Fotomicrografía de tricómico de Masson en azul se expresan las bandas de colágeno, histograma que muestra la proporción de color azul con respecto del resto de los colores, se aprecia espiga en $.8 \times 10(4)$

Descripción General GRUPO 3

En el grupo 3 solo se excluye 1 rata por falta de demostración de depósito de talco, solo con 9 casos 90% del grupo con una una media de Score de Evans de 1.4, media de grosor de banda de fibrosis de 2.7 mm. Se expone en la imagen () el tamaño de menor dimensión del grosor de la banda fibrosa de la misma, así como tinción con tricómico de masson en la muestra del grupo control tardío apreciativamente menor depósito de colágeno con respecto a los grupos previos, así mismo en la muestra 4.6 media de número de células gigantes por campo y número de vasos sanguíneos por campo de 4.3 vasos por campo de gran aumento.

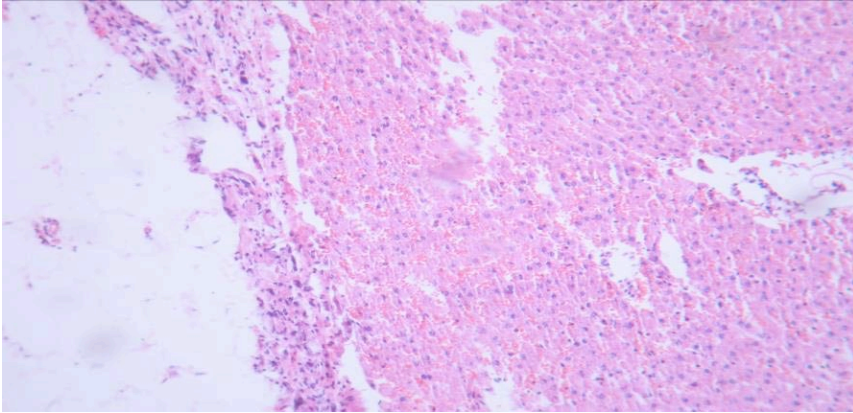


Fig.2.14 Imagen macroscópica rata tipo de grupo 3, arriba se muestra evisceración total de contenido abdominal sin complicaciones, en la imagen subsecuente se muestra el depósito de cristales de talco sin formación de adherencias firmes, compatibles con Evans 0.

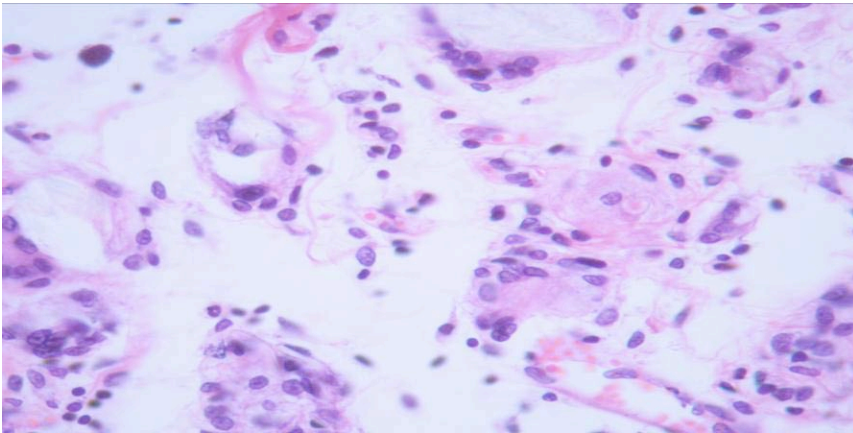


Fig 2.15 Fotomicrografías con Hematoxilina y eosina, a gran aumento, se aprecia la reacción granulomatosa, los cristales de talco y la celularidad y vascularidad discretamente disminuida en el estudio

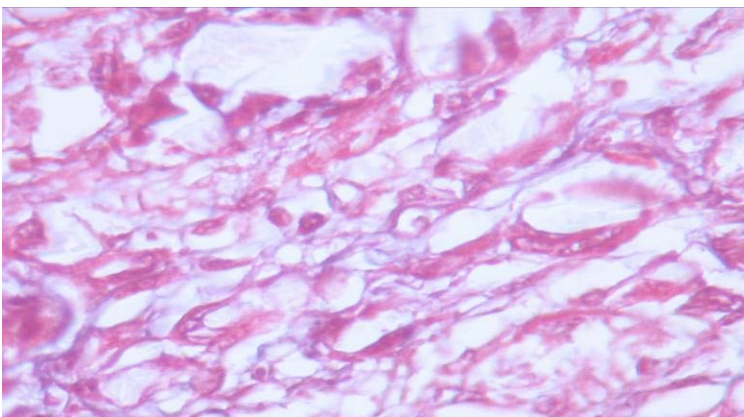


Fig. 2.16 Fotomicrografía Masson se aprecia los cristales de talco y la tinción en color azul del depósito de colágena.

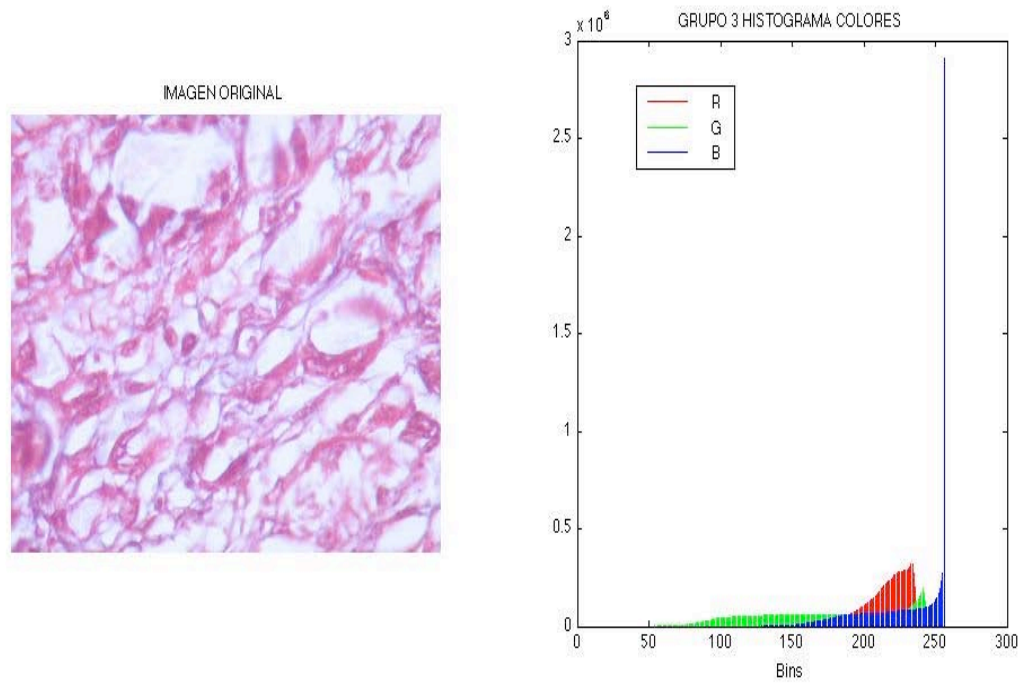
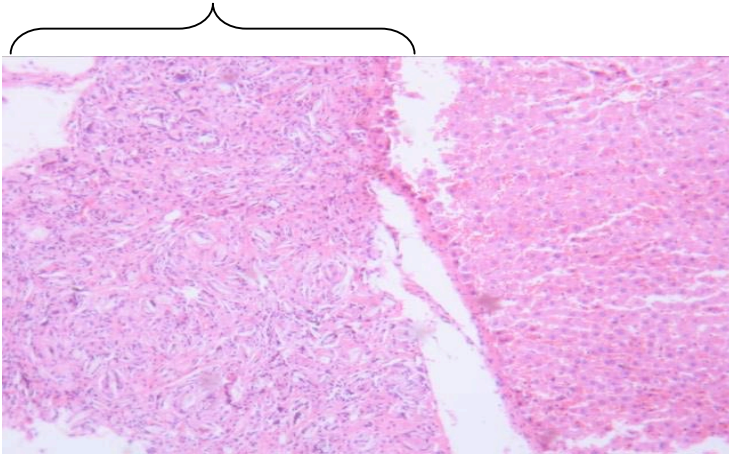


Fig. 2.17

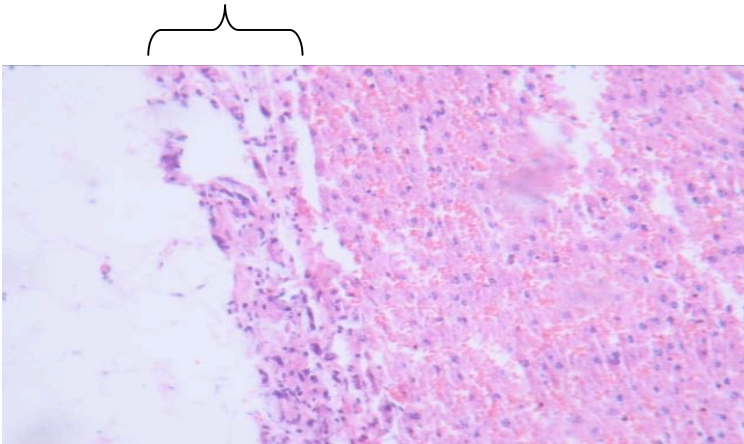
Espiga en el histograma de color azul de $.25 \times 10^4$ pixeles reducción en 70% con respecto a grupo 1.

Medición de .17 mm de grosor de banda fibrosa



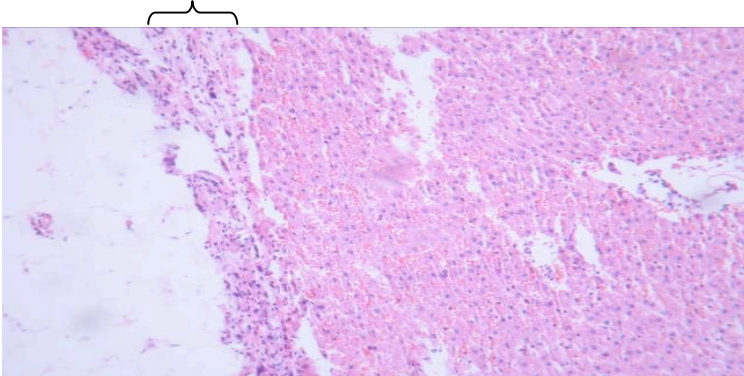
GRUPO 1

Medición de 0.04 mm de grosor de banda fibrosa.



GRUPO 2

Medición de 0.02 mm grosor de la banda fibrosa.



GRUPO 3

Fig 2.18 Esquemas comparativos de los cortes transversales sobre la serosa hepático notese la disminución en la formación de la banda fibrosa en cada uno de los apartados

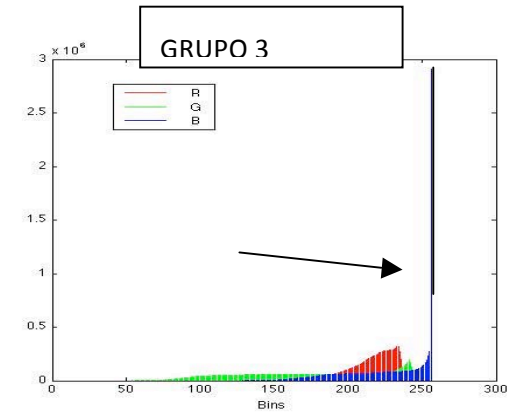
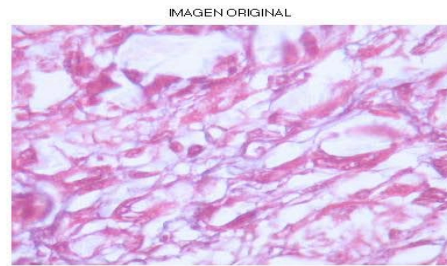
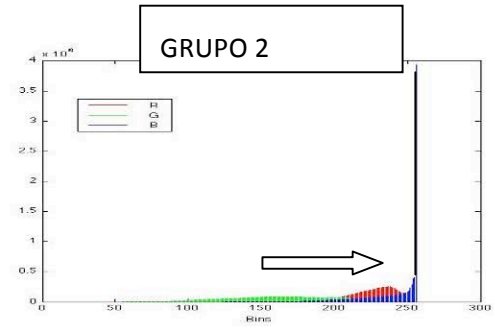
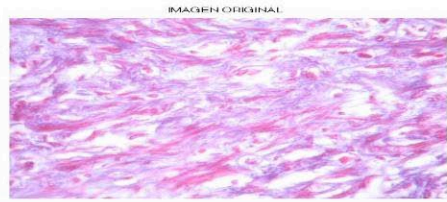
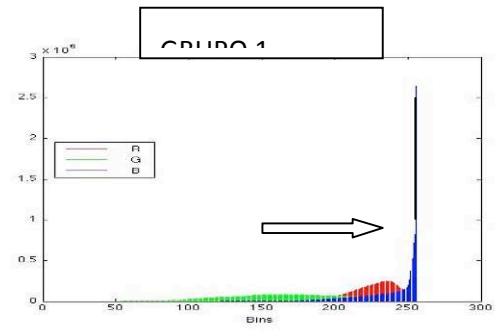


Fig 2.19 Se esquematiza la reducción en el depósito de colágeno desde un 48% entre el grupo 1 frente al grupo 2 y de 70% en imagen azul entre grupo 1 y grupo 3.



GRUPO 1

EVANS de 3



GRUPO 2

EVANS 2

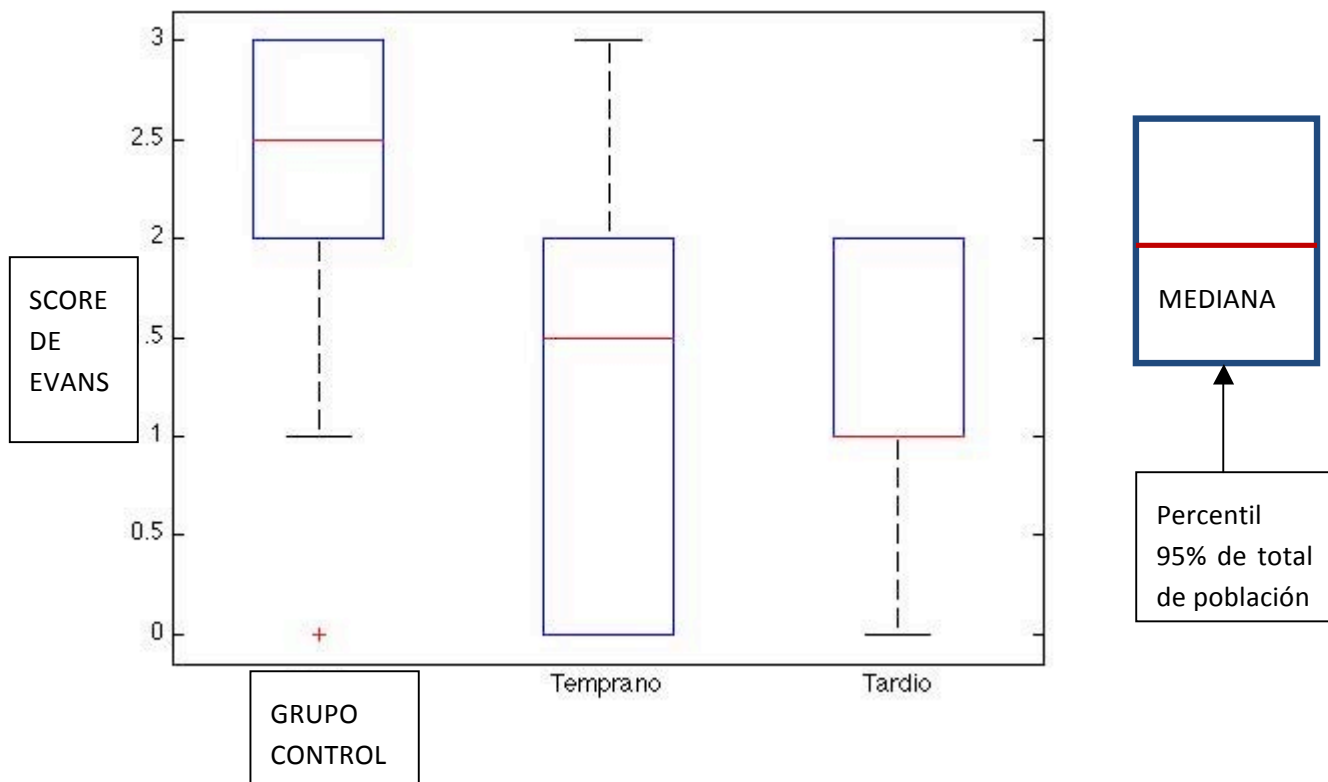


GRUPO 3

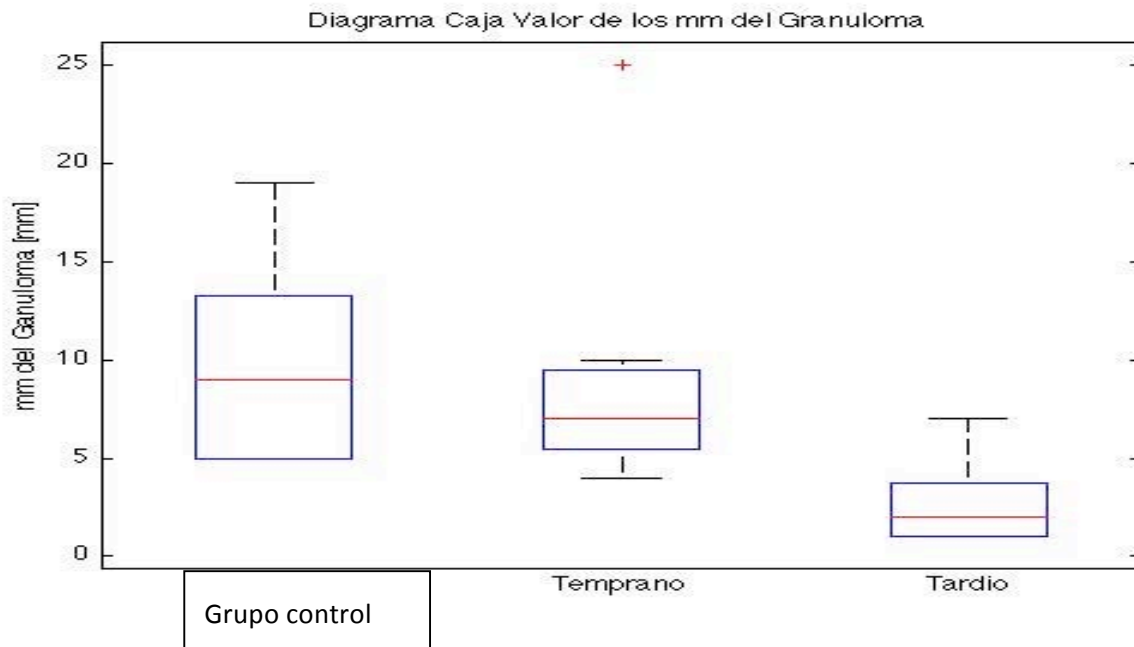
EVANS 1

Fig 2.20 Fotos comparativas de los resultados obtenidos entre cada una de los grupos en sus imágenes mas representativas.

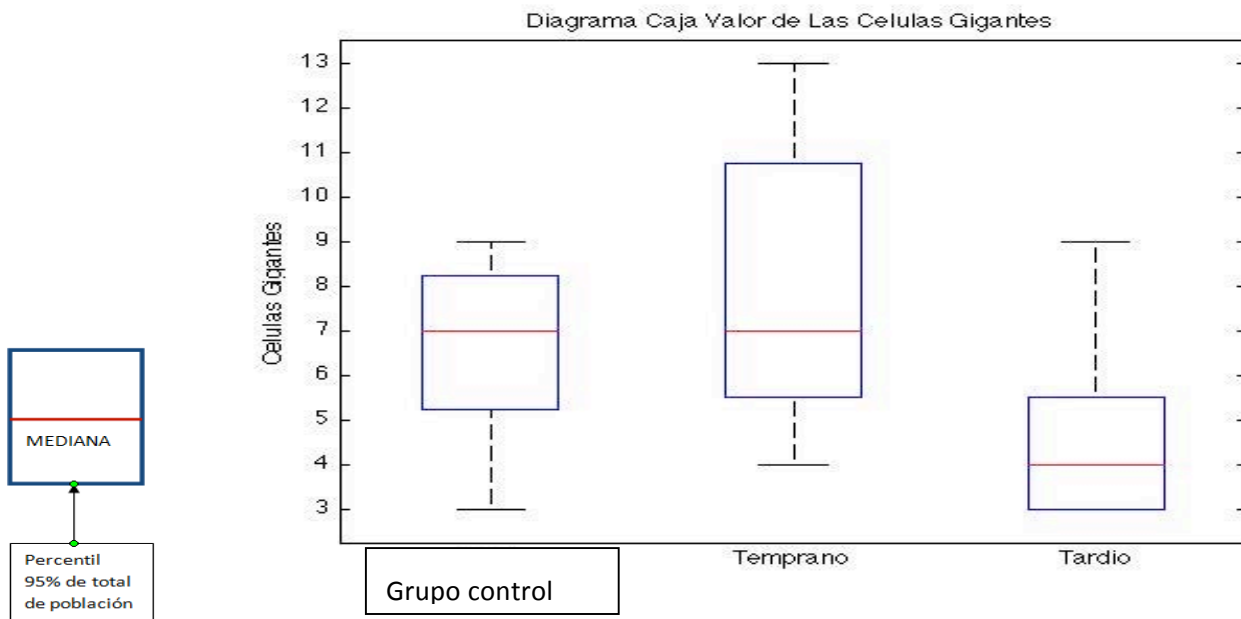
ANALISIS CUANTITATIVO



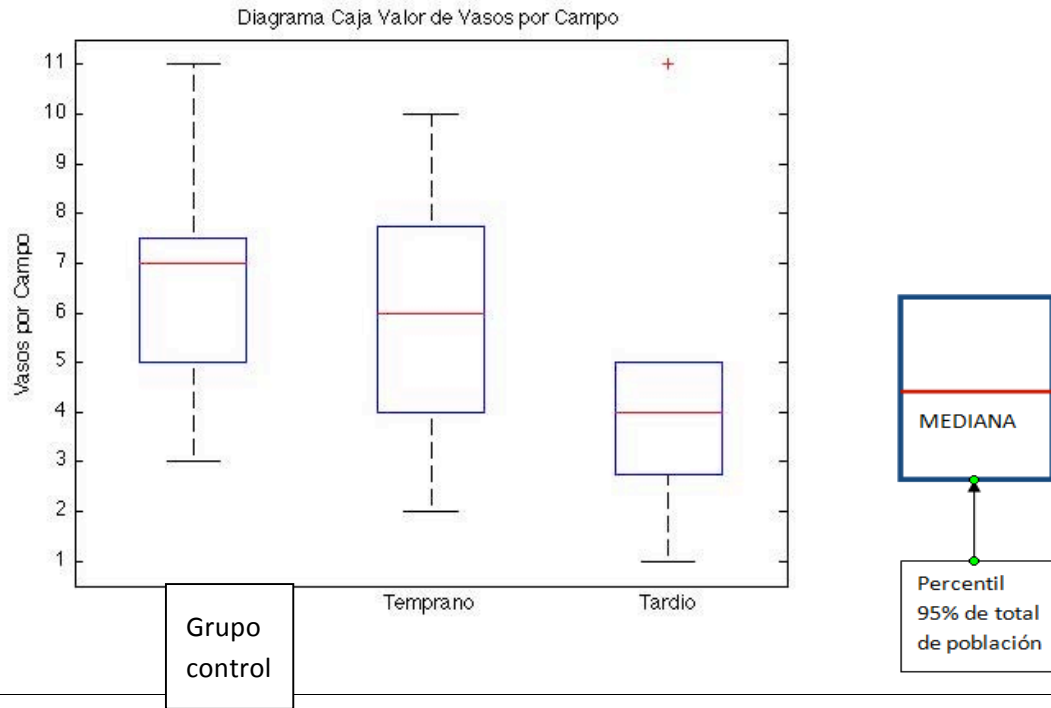
En Grafica 1.1 Caja y Bigote en donde se grafica el comportamiento de la población de los tres grupos estudiados según la aplicación del medicamento y el Score macroscópico de adherencias Evans., en el caso de Score de Evans. En donde la mediana y la media parecen concordar sus datos. Talco expresa el comportamiento de la población del grupo 1 mientras que temprano y tardío corresponden a grupos 2 y 3 respectivamente, Observe que el percentil 95 para el grupo 1 corresponde en algún punto superior a la media de 2 de la escala de Evans, mientras que para los grupos 2 y 3 su percentil 95 corresponden son por debajo de medida 2 de la escala de Evans. Nótese la variación intercuartil entre los tres distintos grupos. Existe una caída en la variación intercuartil mostrando un menor score de Evans entre los grupos que se administro tencetepase en contra de los que no se administro. Parece no encontrarse diferencias en la población entre grupo 2 y 3, por lo tanto la suposición es que el efecto como inhibidor de adherencias es similar entre ambos grupos y su eficacia muy parecida.



Grafica 1.2 Representación de la dispersión de la población según el grosor de la banda fibrosa reportada sobre la pieza tomada, comparándola entre los tres distintos grupos en gráfica de caja y bigote; Se presenta una mediana para 9.6 del grupo 1 (expresado como talco); de 7.25 para grupo 2; y de 2.3 para el tercer grupo, con patrones de distribución no Gausiana. Se aprecia de forma importante la diferencia de percentiles 95 así como como la variación intercuartilar y el estrechamiento de los valores extremos en los grupos 2 y 3 como resultado se aprecia disminución en el grosor en milímetros de granuloma con una estimación de 10 milímetros por lo tanto en el grupo 1 más del 50% de su población cuenta con valores por arriba de 10 mm. Mientras que en los grupos 2 y 3 más del 95% y prácticamente el 100% de la población del grupo de aplicación tardía muestra valores por debajo de 10mm.



Grafica 1.3 Distribución de la población en cuanto a número de células gigantes. Se muestran medias, rangos y medianas. En la grafica 1.3 la gráfica de barras y bigotes la población estudiada en cuanto al número de células gigantes y su relación con los tres grupos, muestra resultados inconsistentes, las medias de el grupo de talco con el grupo temprano se mantienen constantes y los valores extremos del grupo placebo con tardío son muy similares, solo se aprecia discreta disminución en la variación intercuartilar del grupo 1 vs. 3, pero no es significativa y parece no tener una correlación.



En la Gráfica 1.4 de caja y bigote donde se muestra el comportamiento de las poblaciones según el número de vasos por campo de gran aumento sobre los tres diferentes grupos de estudio; se muestra que las poblaciones tanto del grupo 1 y 2 muestran prácticamente el mismo patrón de dispersión con medianas muy cercanas entre sí, tanto la variación intercuartil y el percentil 95, sin embargo el grupo tardío muestra una discreta disminución en el número de vasos por campo en cuanto a percentil se refiere así como distribución de población con límites máximos de hasta 6 vasos sanguíneos por campo mientras que en los grupos previos pueden encontrarse valores mucho más altos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

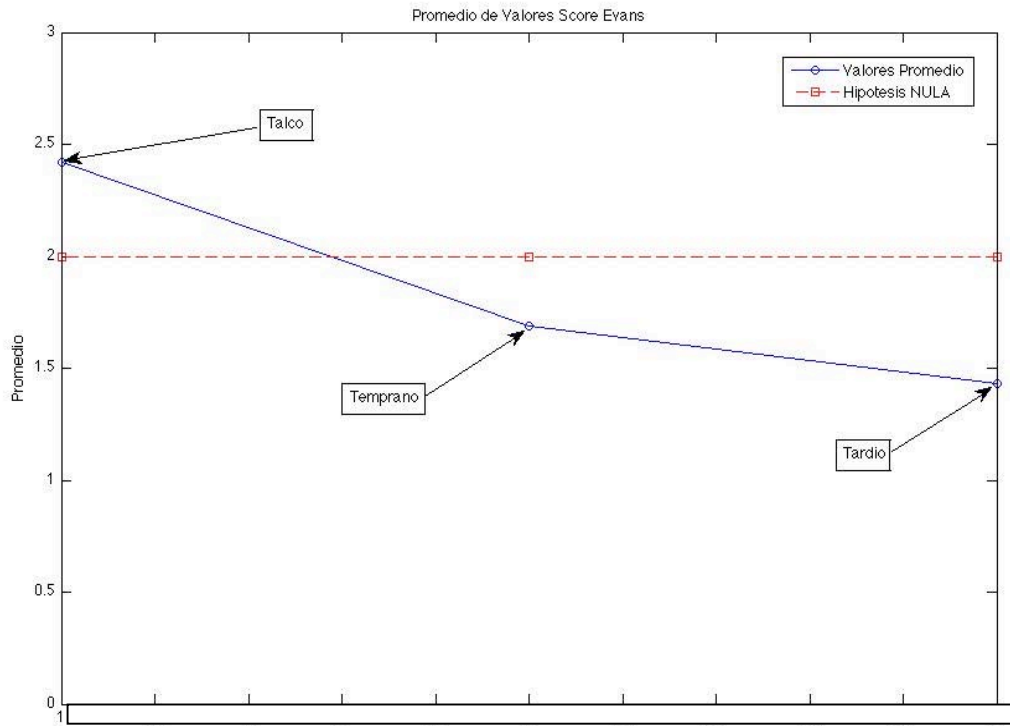
Con los valores anteriores se aplica la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comparar los valores obtenidos a una distribución estadística normal. Esto con la finalidad de evidenciar si el tamaño de los grupos es estadísticamente significativo para analizarlos de forma para-métrica. En todos los grupos se encontró que las distribuciones de los grupos no obedecen a una distribución normal ($h = 1$).

Por lo tanto para poder analizar la información se requiere de estadística no para-métricas Curva de Friedman y Kruskal Wallis las cuales utilizan Chi Cuadrada como método de comparación. Así como una estimación mediante análisis de varianza cuyo método de comparación es la prueba F.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MEDICION CUALITATIVA FIRMEZA DE LAS ADHERENCIAS SCORE DE EVANS

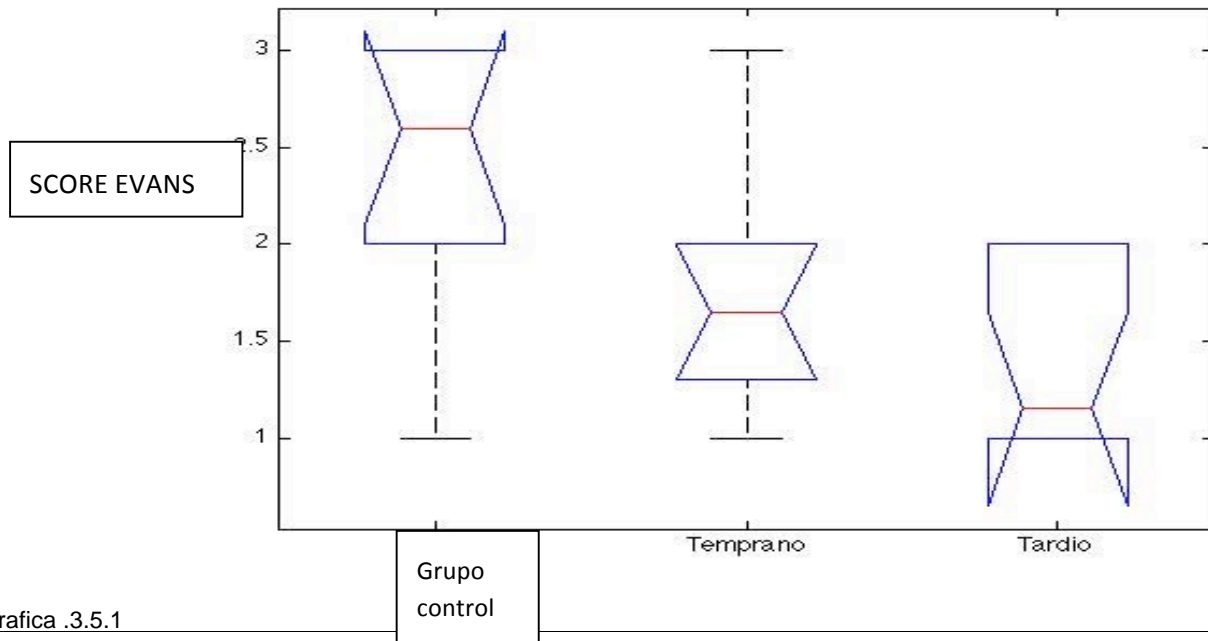
En la fig 3.5 Aquí se muestra la comparación de las medias según el score de firmeza Evans de los valores bajo la hipótesis experimental (que si existe efecto vs. Hipótesis nula (que no existe ningún efecto))

Se puede apreciar una tendencia a la baja en cuanto la firmeza de las adherencias en cuanto a la media del score de Evans reportado, entre el grupo control sin aplicación de medicamento vs. Los grupos que recibieron la administración del medicamento, e inferirse un probable efecto del medicamento. En la fig 3.6 Se ilustra los resultados de la prueba de Friedman en cuanto a la comparación de la firmeza de las adherencias mediante el score de Evans de los tres diferentes grupos, tanto de manera gráfica y el rotulo se puede ver una diferencia estadísticamente significativa debido a que el valor de p es menor 0.034 diferencia marcada entre los tres grupos. Con un intervalo de confianza 97%



Gráfica. 3.5 Comportamiento de las medias de los diferentes grupos en cuanto a los resultados obtenidos en todas las poblaciones para Score de Evans. Se aprecia una pendiente a favor de la reducción en las medias de los grupos temprano (2) tardío (3) con respecto al grupo control.

RESULTADOS DE CRUVA DE FRIEDMAN



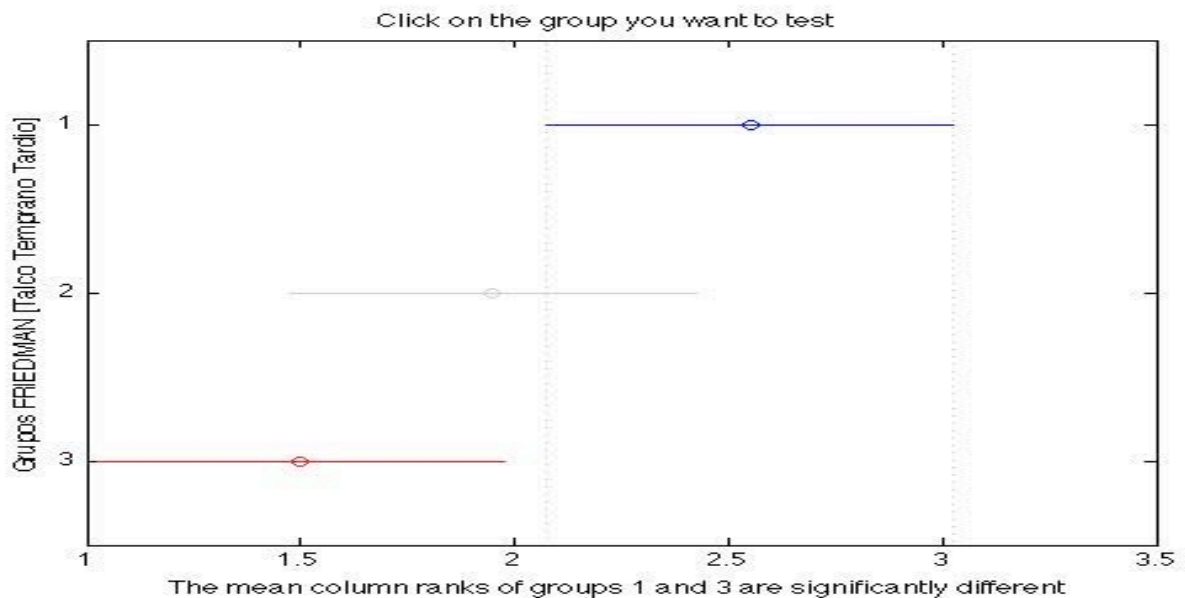
Gráfica .3.5.1

Friedman's ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	5.55	2	2.775	6.73	0.0346
Error	10.95	18	0.60833		
Total	16.5	29			

Tabla 4.1 Diferencia estadísticamente significativa p:0.0346 IC 97%.

Kruskal-Wallis ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	695	2	347.5	9.72	0.0077
Error	1378	27	51.037		
Total	2073	29			

Tabla 4.2 Diferencia estadísticamente significativa p=0.007 IC de 97% Grafica 3.5.1 y Tabla .4.2 Se expresan el análisis estadístico de la Chi cuadrada mediante la prueba de Kruskal- Wallis obtenida en la comparación de las curvas del score de Evans Mostrando nuevamente una diferencia estadísticamente significativa en la reducción en la firmeza de las adherencias con un valor de p de 0.007 con un intervalo de confianza de más del 97%



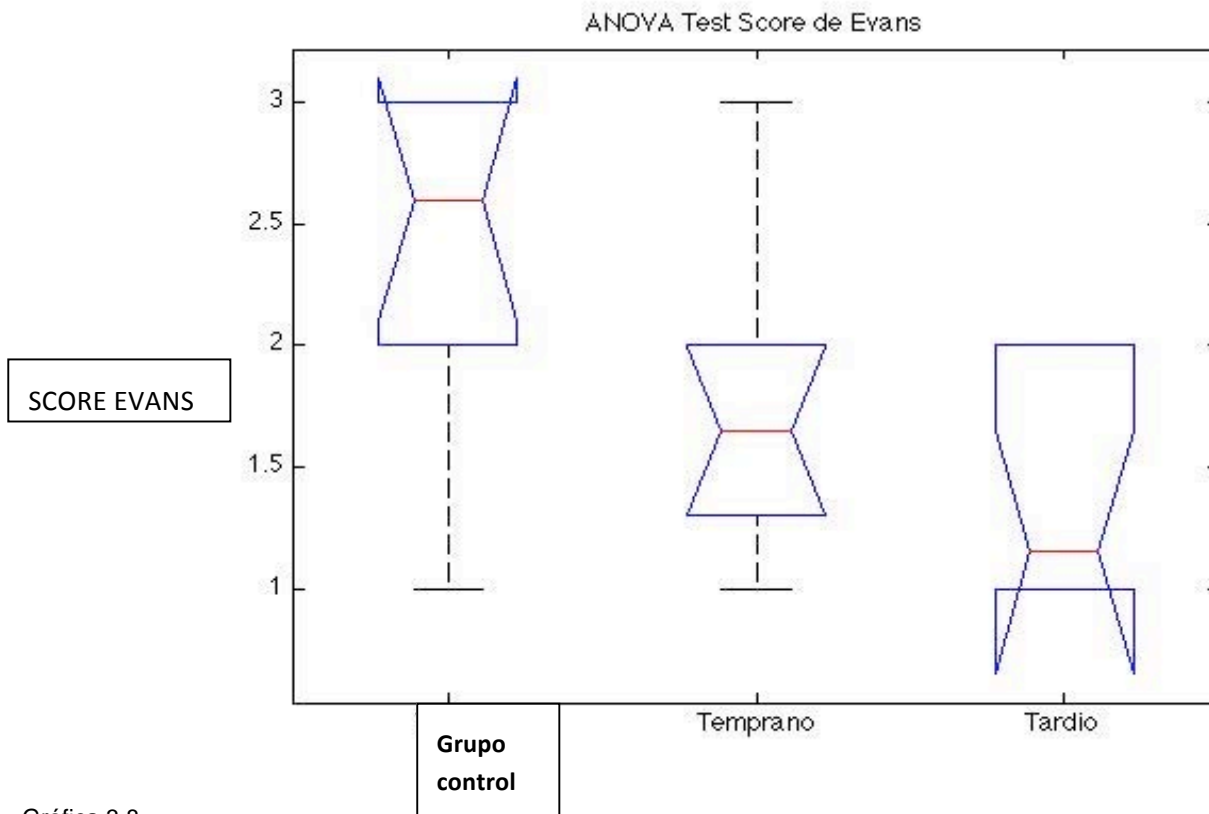
Gráfica. 3.7 Se ilustra gráficamente la diferencia estadística de la prueba de Friedman.

En la cual se demuestra que los rangos entre grupo 1 y grupo 3 muestran diferencia significativa así como intervalos de confianza jamás se juntan.

Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de 0.6 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.3520, 1.5520]

Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 1.05 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [0.098, 2.0020]

Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 0.45 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.502, 1.4020]

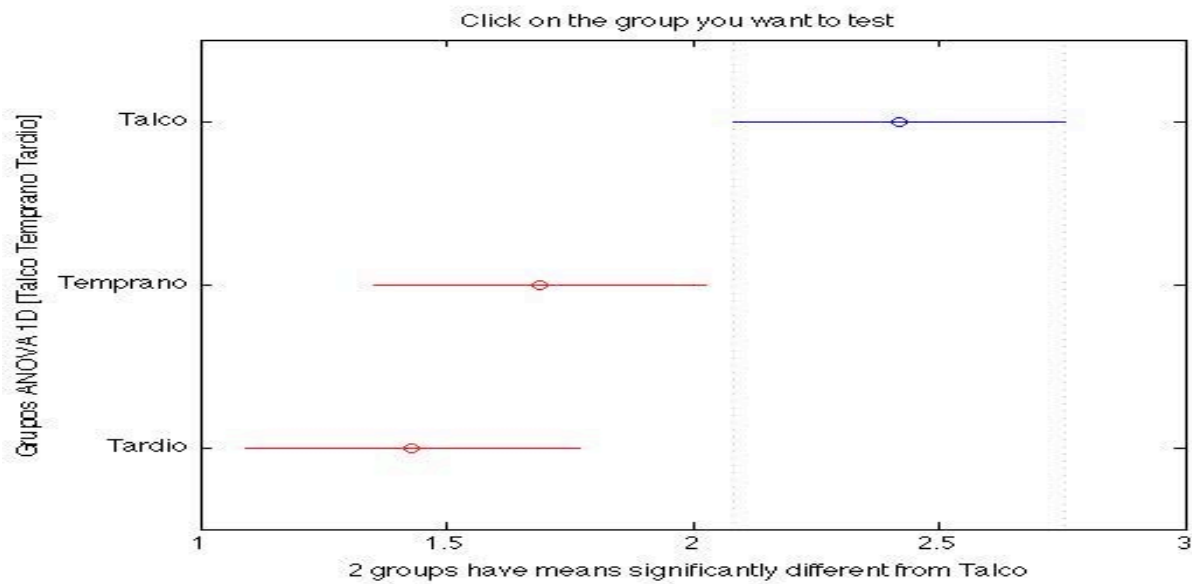


Gráfica 3.8

ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	5.2687	2	2.63433	7.09	0.0033
Error	10.026	27	0.37133		
Total	15.2947	29			

Tabla 4.3

En la gráfica 3.8 y tabla 4.3 Resultados obtenidos en la comparación de las curvas de score de Evans mediante el análisis de varianza. Se expresa diferencia estadísticamente significativo con valor de p.0033 con intervalo de confianza por arriba de 97% entre los resultados obtenidos entre los grupos 2 y 3 versus el grupo que no se administro tratamiento. Además de mostrarse una diferencia entre mejor respuesta en la reducción de la firmeza si se aplica de forma tardía el medicamento versus la aplicación simultanea o temprana. En cuanto a la comparación del Score de Evans.



Grafica. 3.9 Representación gráfica del ANOVA comparando la aplicación de talco, y su diferencia contra el grupo 1

Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de 0.73 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [0.0543, 1.4057]

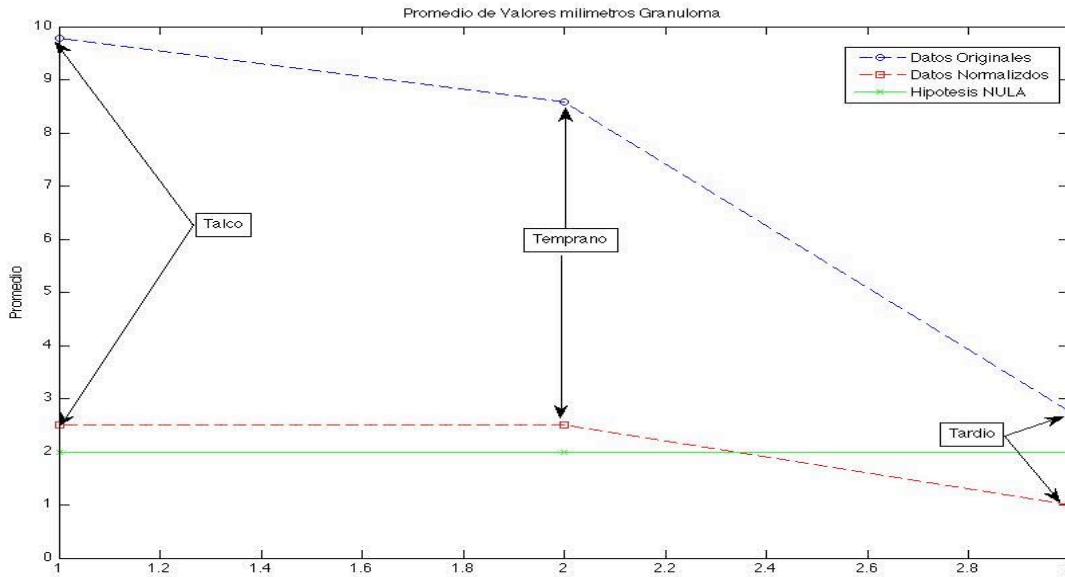
Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 0.99 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [0.3143, 1.6657]

Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 0.26 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.4157, 0.9357]

Realización de prueba de ANOVA en la cual los intervalos de confianza entre los grupos 1 y 3 muestran diferencia estadísticamente significativa y jamás se juntan. En cuanto el análisis estadístico en los grupos comparando el Score de Evans.

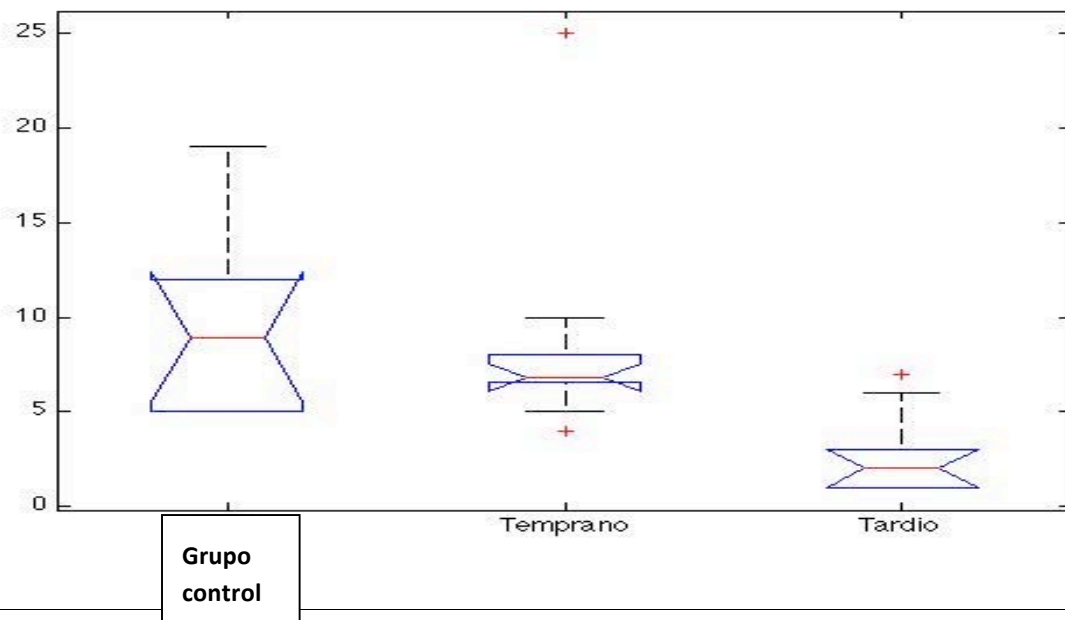
ANALISIS ESTADISTICO DEL GROSOR EN MILIMETROS DEL GRANULOMA

En la fig. 3.10 Se grafica la comparación de medianas en cuanto el grosor en milímetros de granuloma de los tres diferentes grupos; se aprecia una tendencia entre los grupos con aplicación del medicamento a reducción en el tamaño en milímetros de los granulomas formados en las bandas fibrosas depositadas en la superficie hepática, se reportan datos normalizados. Amabas con una reducción en el tamaño microscópico medible de la banda



Grafica.3.10 Se ilustra comparación de medias y se aprecia tendencia a la reducción en los milímetros de granuloma con respecto entre el grupo 3 vs. Los grupos control y temprano con una reducción en el tamaño microscópico medible de la banda fibrosa.

CRUVA DE FRIEDMAN EN EL ANÁLISIS ESTADISTICO SOBRE EL GROSOR EN MILIMETROS DE LA BANDA FIBROSA CON RESPECTO A LOS DEMAS GRUPOS.

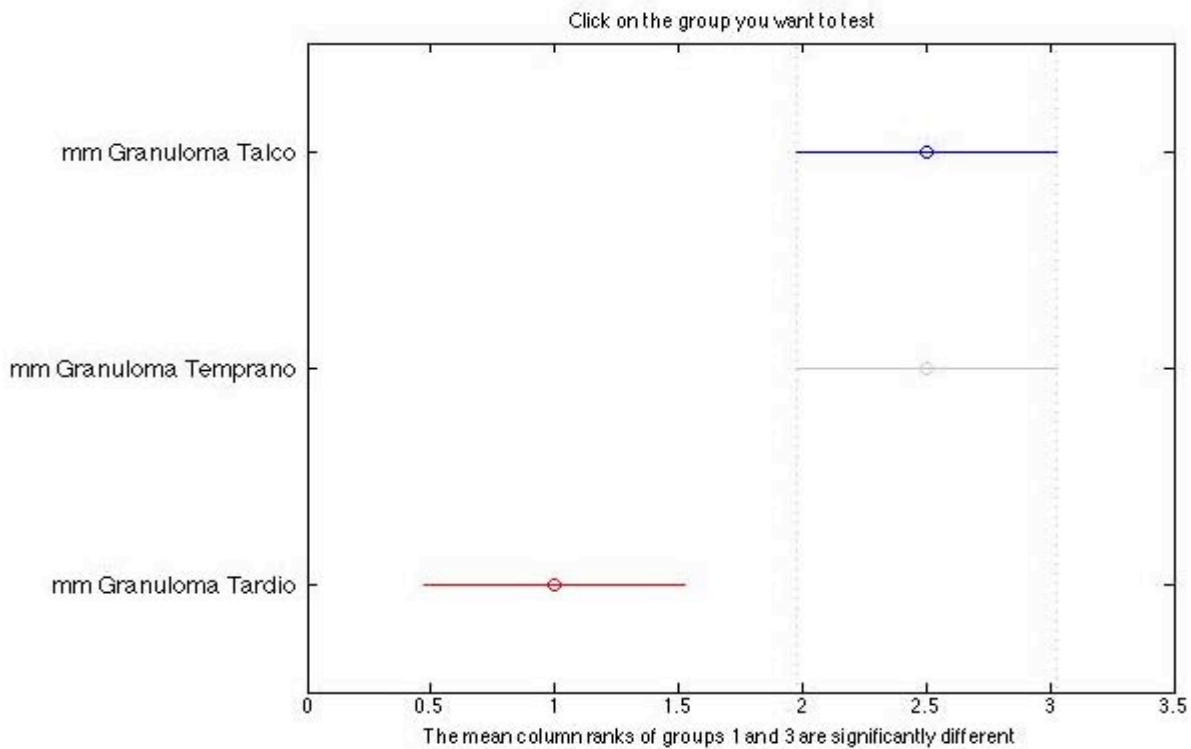


Friedman's ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	15	2	7.5	15	0.0006
Error	5	18	0.27778		
Total	20	29			

Grafica. 3.11 y tabla 4.3 $p=0.0006$ IC 99% de diferencia estadísticamente significativa entre el grosor en milímetros de la banda fibrosa mucho menor a los grupos control y de aplicación temprana de tenecteplase.

En la Gráfica. 3.11 la prueba de Friedman sobre el grosor en milímetros del granuloma con valor de p de 0.0006 diferencia estadísticamente significativa la en la disminución del tamaño de banda fibrosa con un intervalo de confianza de 99% mostrada en la tabla 4.3 , medida entre los grupos 2 y 3 versus los que no se administro fibrinolítico. En la parte superior se ilustra gráficamente las curvas de cada uno de los grupos, en el aparatado inferior se ilustran los valores en grados de libertad y valor de p así como chi sq.

Parece mostrarse una mejor respuesta en el rango obtenido con un menor grosor de banda fibrosa entre el grupo 3 vs. El grupo 2.

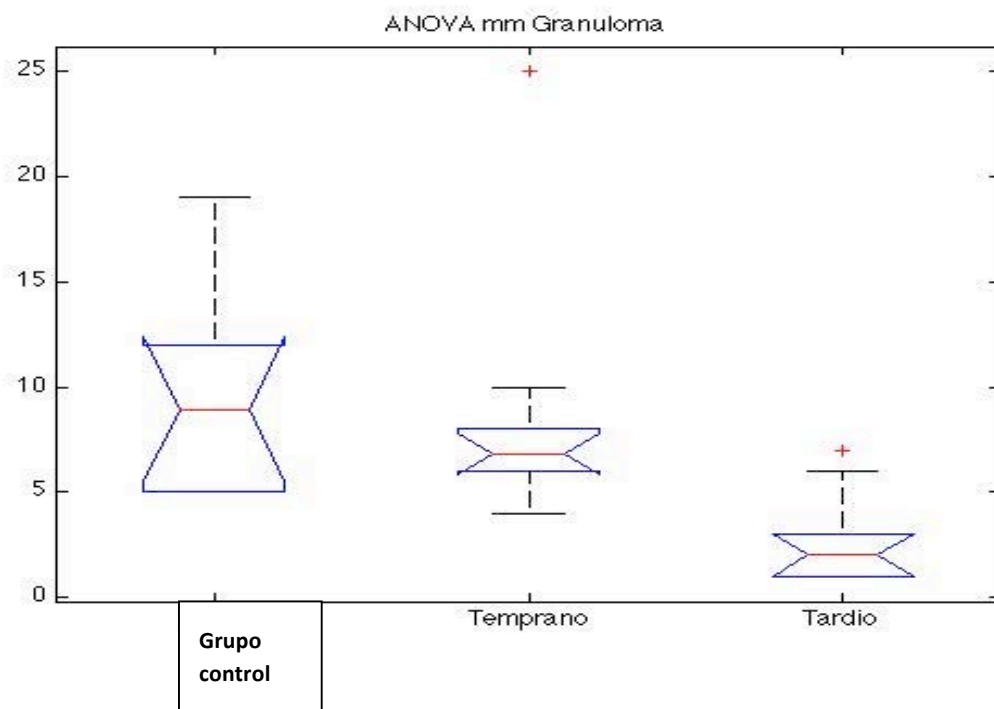


Grafica. 3.12 Representación gráfica de la curva de Friedman en cuanto al grosor en milímetros del granuloma.

Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de 0 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-1.0481, 1.0481]

Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 1.5 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [0.4519, 2.5481]

Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 1.5 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [0.4519, 2.5481]



Gráfica.3.13

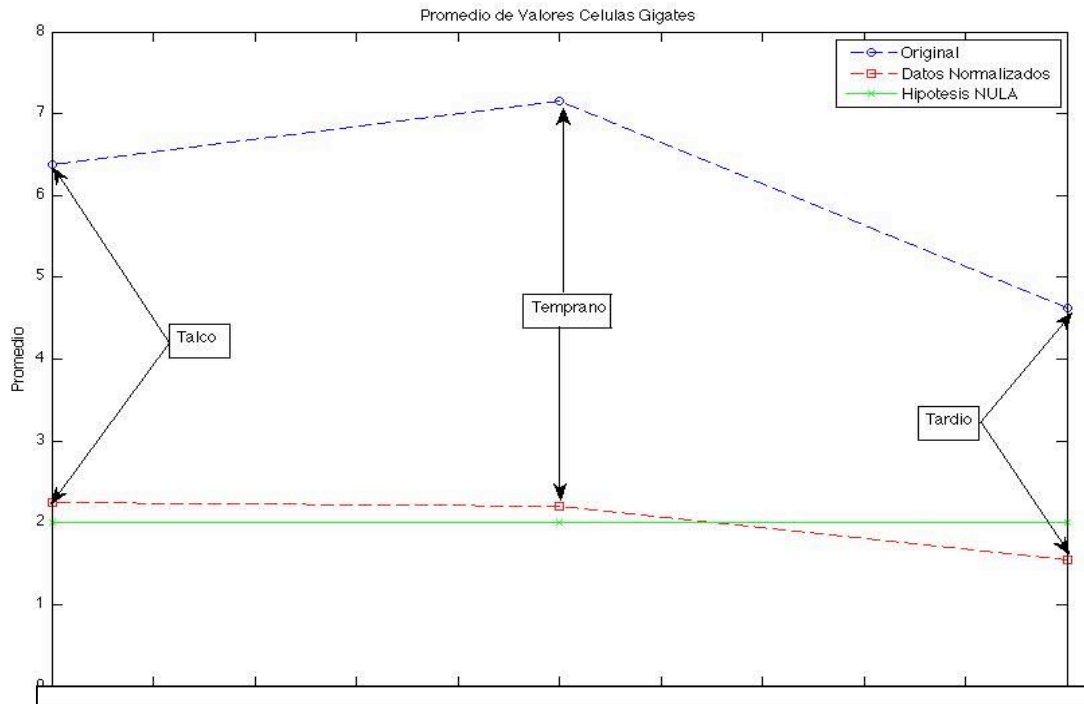
ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	281.558	2	140.779	6.5	0.005
Error	584.61	27	21.652		
Total	866.168	29			

Tabla 4.4

Gráfica. 3.13 y la tabla 4.4 Representación de prueba de ANOVA de los resultados obtenidos en valor fe F con un valor de p de 0.005, IC de 95% con diferencia estadísticamente significativa, en cuanto a la reducción de la banda fibrosa medida en milímetros.

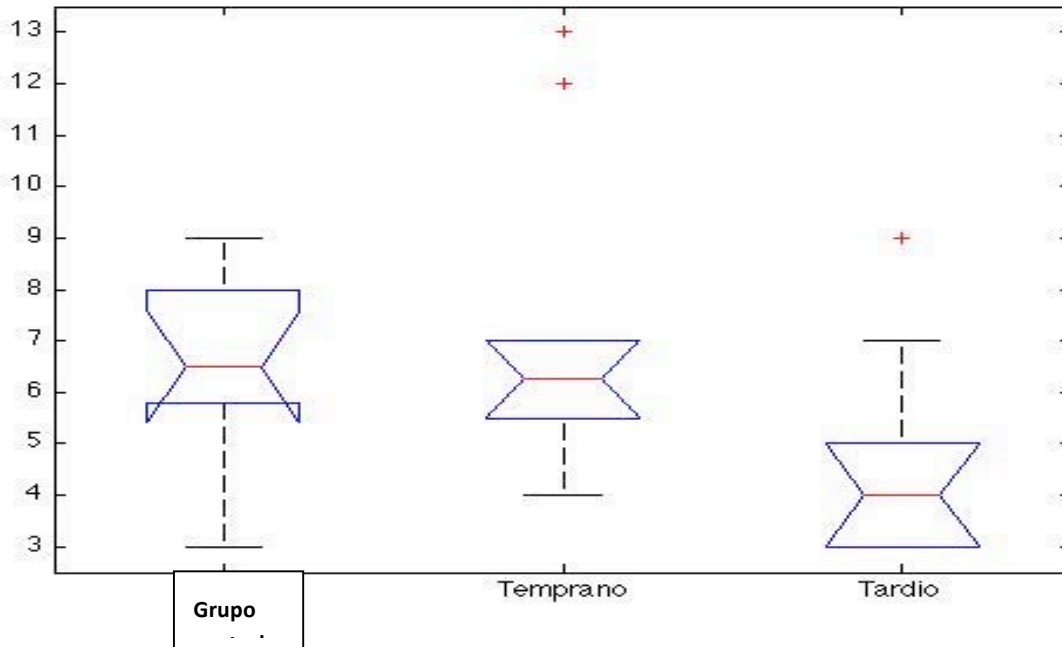
ANALISIS ESTADISTICO NUMERO DE VASOS SANGUINEOS POR CAMPO

En la grafica 3.15 de comparación de medias en cuanto a los resultados obtenidos en el número de células gigantes x campo, en la cual solo se aprecia una discreta tendencia en la reducción en el número de vasos por campo obtenidos entre el grupo 1 vs. El grupo 3; se muestran datos crudos y normalizados.



Gráfica 3.15 Comparación de medias con respecto al número de células gigantes multinucleadas encontradas a campo de gran aumento

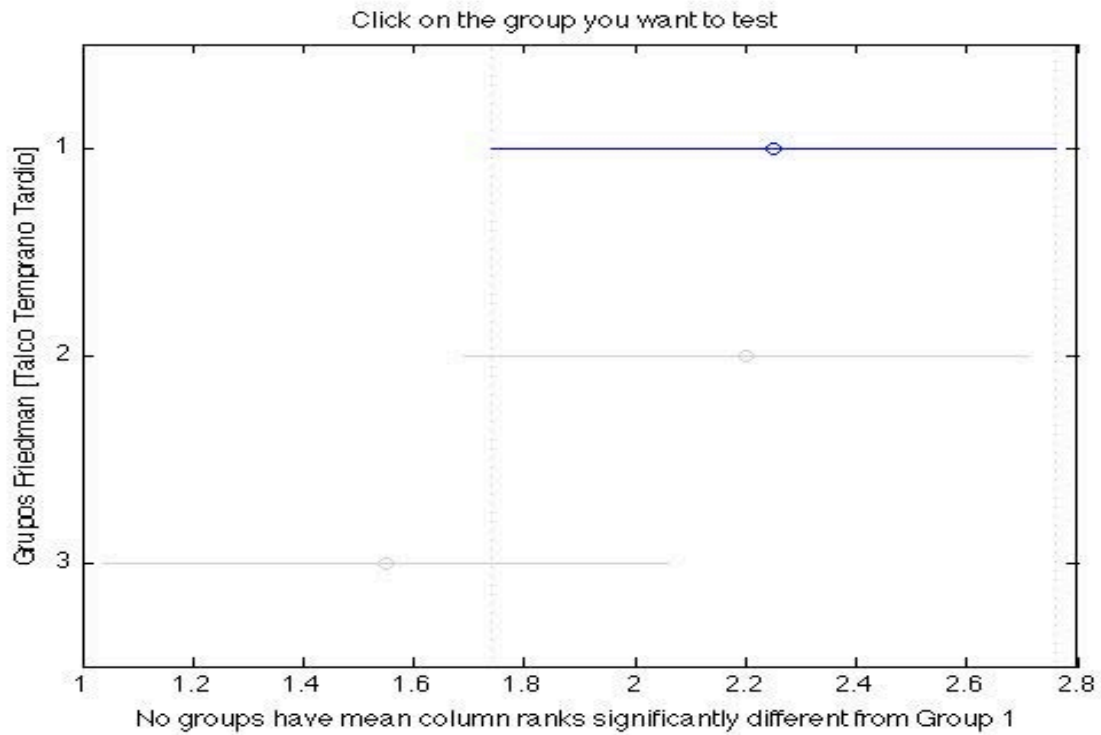
PRUEBA DE FRIEDMAN EN CUANTO A LA RELACIÓN EN CUANTO A NUMERO DE CELULAS GIGANTES POR CAMPO ENTRE CADA UNO DE LOS GRUPOS



Gráfica. 3.16 GRAFICA SOBRE LA PRUEBA DE FRIEDMAN APLICADA EN RELACIÓN AL NUMERO DE CELULAS GIGANTES POR CAMPO DE GRAN AUMENTO.

Friedman's ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	3.05	2	1.525	3.21	0.2008
Error	15.95	18	0.88611		
Total	19	29			

Tabla 4.5 Se coloca el análisis mediante el uso de la prueba de Friedman, con un valor de p de .2 no se muestra diferencia estadísticamente significativa entre los tres diferentes grupos en cuanto a la relación del número de células gigantes x campo con la aplicación de fibrinolíticos.



Gráfica. 3.17 Representación de los grupos en la curva de Friedman, no se muestra diferencia significativa entre los diferentes grupos

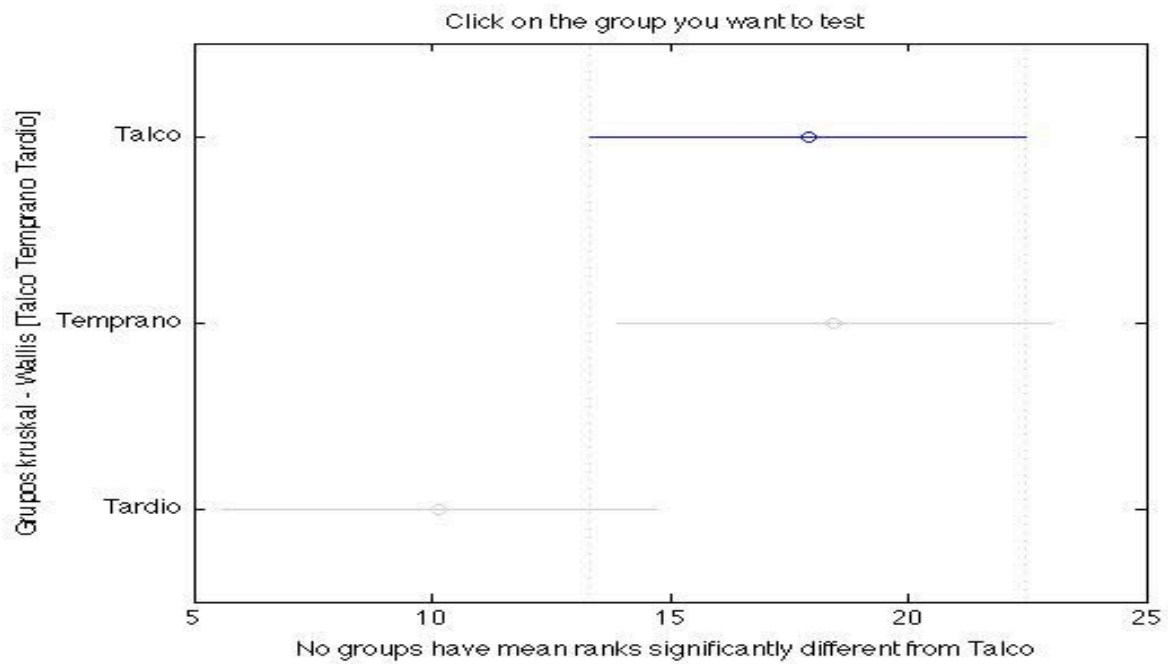
Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de 0.5 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.9716, 1.0716]

Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 0.7 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.3216, 1.7216]

Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 0.65 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.3716, 1.6716]

Kruskal-Wallis ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	430.85	2	215.425	5.65	0.0592
Error	1779.15	27	65.894		
Total	2210	29			

Tabla 4.6 Resultados obtenidos sobre la Prueba de Kruskal- Wallis en relación al número de células gigantes de gran aumento $p=0.0592$ IC 95% no estadísticamente significativo establecer una relación causal.

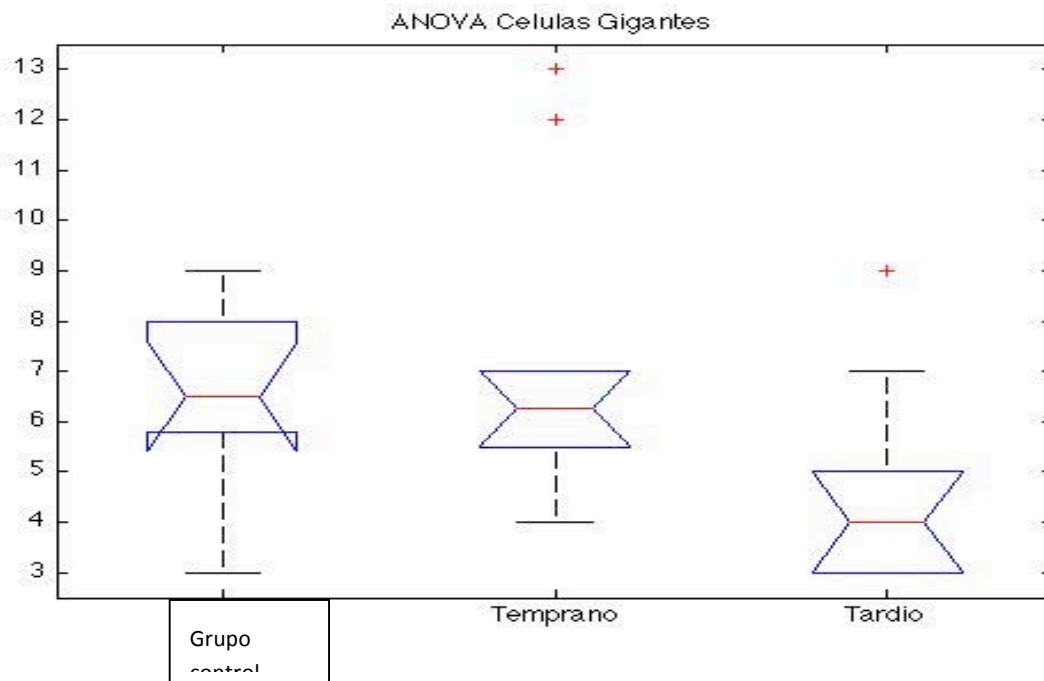


Gráfica. 3.18 Prueba de Kruzkal- Wallis en cuanto el número de células gigantes por campo de gran aumento entre los tres grupos, en la parte superior se observan los valores de p y los grados de libertad, así como en la comparación gráfica.

Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de -0.55 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-9.6999, 8.5999]

Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 7.75 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-1.3999, 16.8999]

Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 8.3 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.8499, 17.4499]

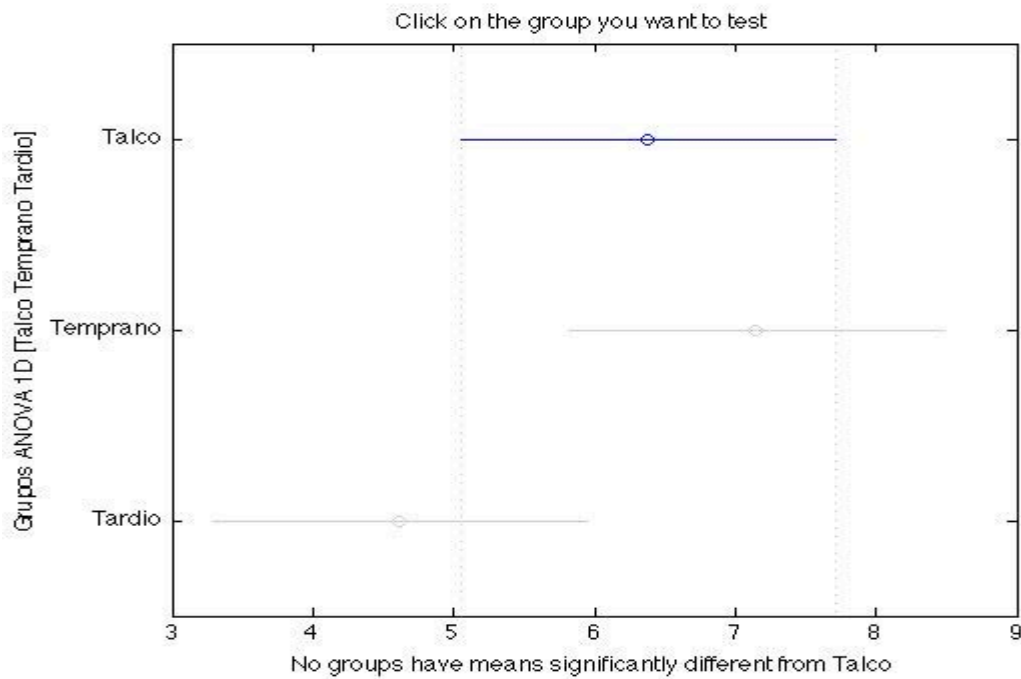


Gráfica. 3.19

Prueba de ANOVA Fig. 3.19 así como tabla 4.8 en cuanto a la relación del número de células gigantes multinucleadas, vs. Los tres diferentes grupos $p=0.07$ IC de 95%.

ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	33.638	2	16.819	2.92	0.0709
Error	155.317	27	5.7525		
Total	188.955	29			

Tabla 4.7 Análisis estadístico mediante ANOVA en cuanto a la diferencia de los tres diferentes grupos comparando el número de células gigantes x campo, en la parte superior la comparación gráfica y en la inferior se muestra el valor de p el cual no es estadísticamente significativo.



Gráfica 3.20 Representación gráfica de ANOVA entre el número de células gigantes por campo, no se aprecia diferencia estadísticamente significativa.

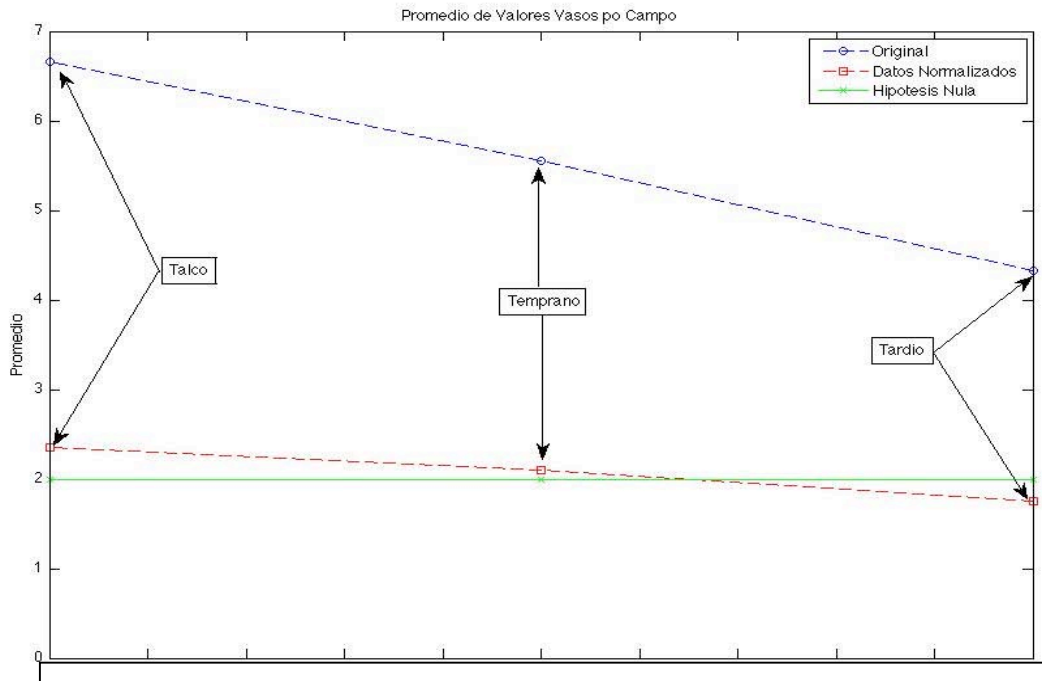
Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de -0.77 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-3.4295, 1.8895]

Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 1.76 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.8995, 4.4195]

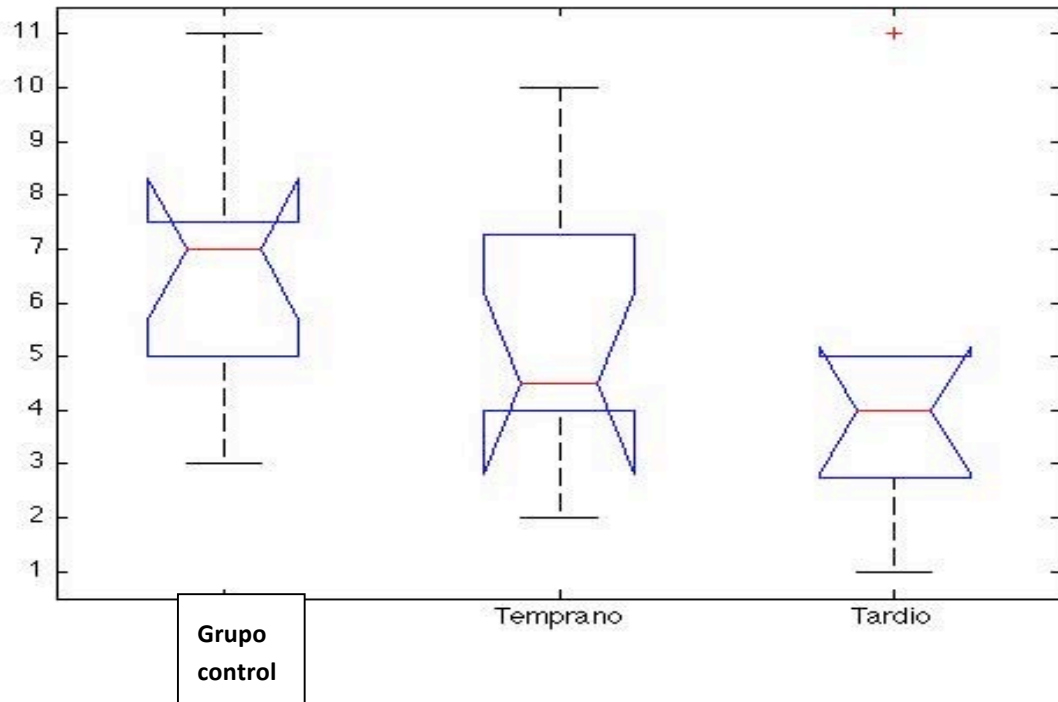
Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 2.53 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.1295, 5.1895]

ANÁLISIS ESTADÍSTICO NÚMERO DE VASOS POR CAMPO

En la Fig. 3.21 representación de comparación de medias en cuanto al número de vasos por campo entre los tres distintos grupos se muestra en color azul los datos crudos y en rojo los datos normalizados, se encuentra una discreta tendencia a la reducción del número de vasos por campo con respecto a la hipótesis nula.



Gráfica 3.21 Se ilustra la tendencia en cuanto a las medias en el número de vasos por campo en relación al distanciamiento de grupos, así como los valores normalizados.



Gráfica 3.22

Friedman's ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	1.95	2	0.975	2	0.3679
Error	17.55	18	0.975		
Total	19.5	29			

Tabla 4.8 prueba de Friedman en cuanto a los resultados obtenidos en el número de vasos por campo de gran aumento en los tres distintos grupos; no se aprecia diferencia estadísticamente significativa.

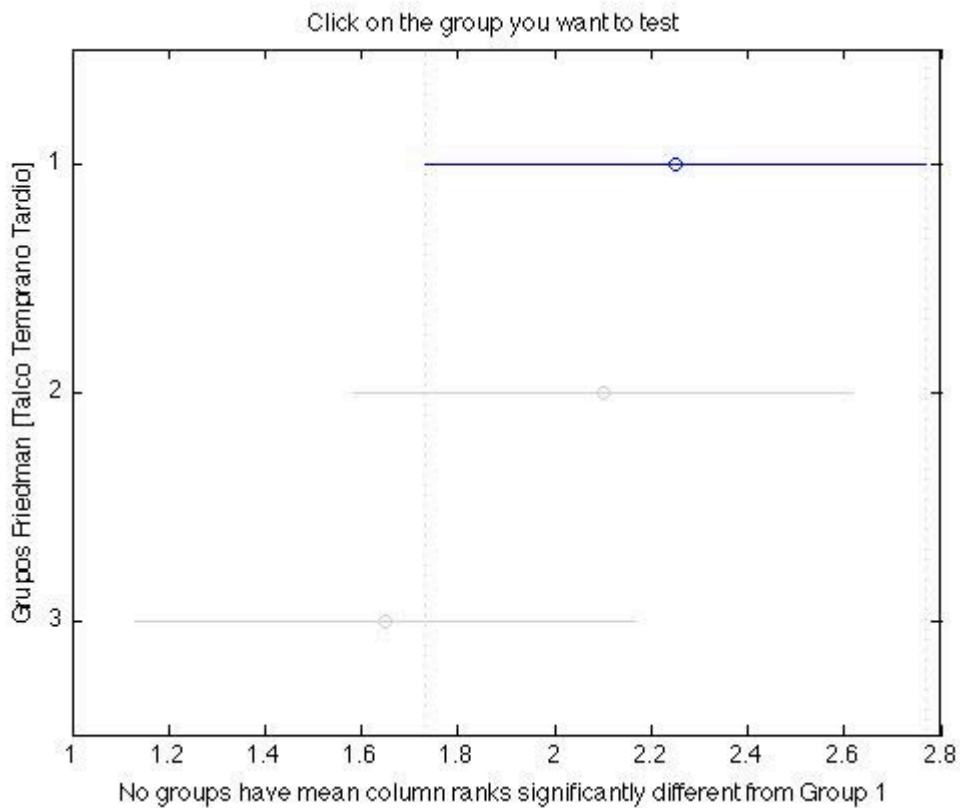


Fig. 3.22 no hay diferencia estadísticamente significativa expresada en la gráfica comparando los resultados obtenidos en la prueba de Friedman.

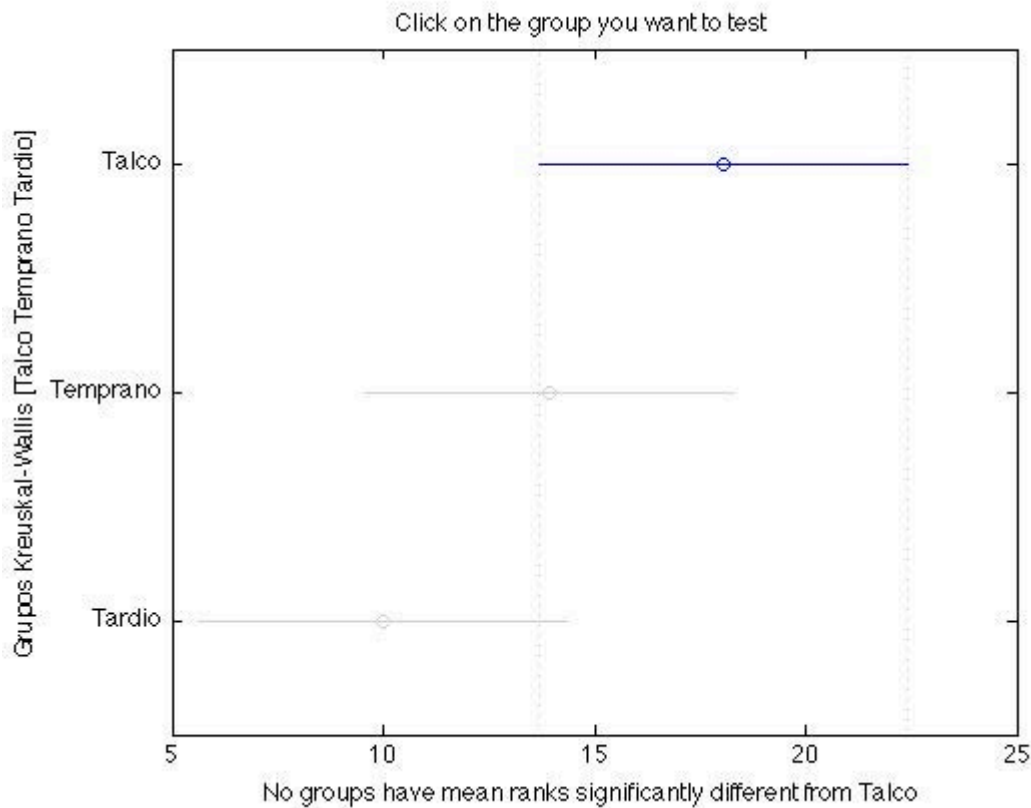
Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de 0.15 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.8850, 1.850]

Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 0.6 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.4350, 1.6350]

Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 0.45 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.5850, 1.4850]

Kruskal-Wallis ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	Chi-sq	Prob>Chi-sq
Columns	292.06	2	146.028	4.7	0.0956
Error	1324.94	24	55.206		
Total	1617	26			

Tab. 4.9 Prueba de Kruskal Wallis en relación al número de vasos por campo entre cada uno de los grupos no se encuentra diferencia estadísticamente significativa como para poder establecer dependencia. P: 0.095 IC 95%

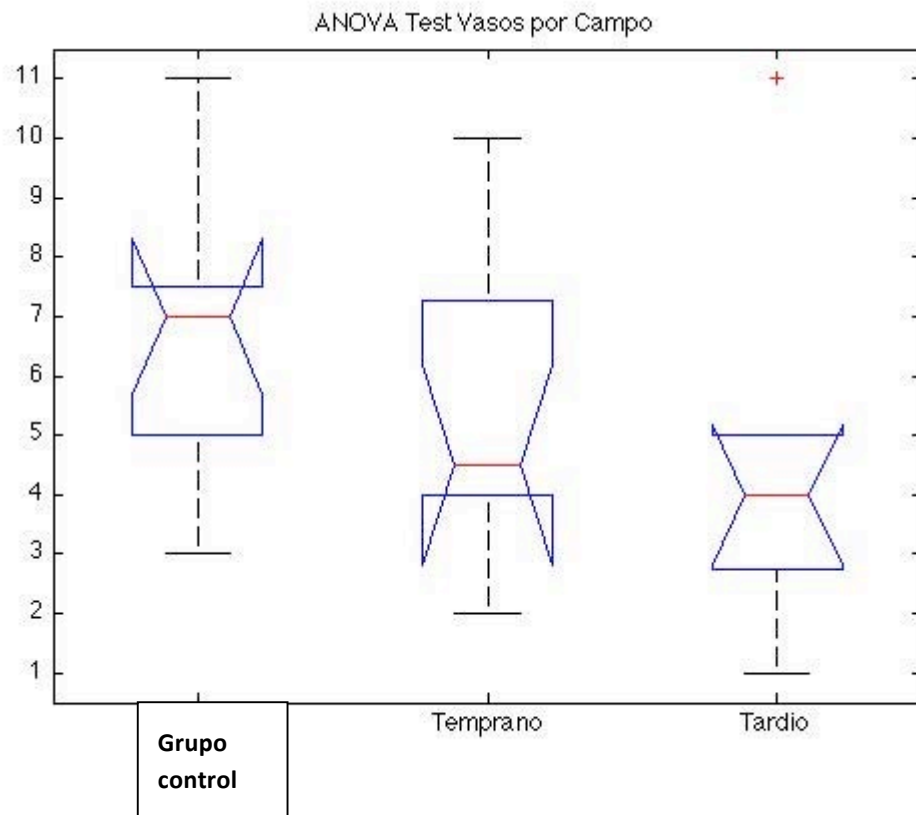


Gráfica.3.27 Reporte de resultados por prueba de Kruskal- Wallis, según en el número de vasos por campo, no hay diferencia estadística en ninguno de los grupos.

Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de 4.11 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-4.6018, 12.8240]

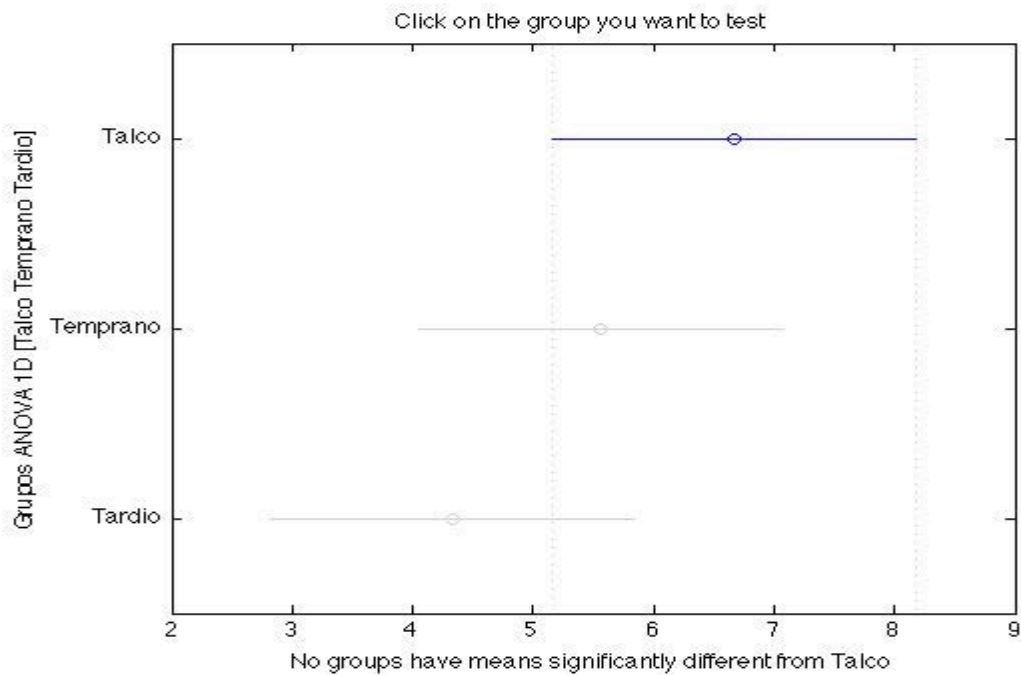
Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 8.0556 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.6574, 16.7685]

Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 3.9444 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-4.7685, 12.6574]



ANOVA Table					
Source	SS	df	MS	F	Prob>F
Columns	24.519	2	12.2593	1.87	0.1766
Error	157.722	24	6.5718		
Total	182.241	26			

Gráfica. 3.28 y tabla 4.10 en la que se muestra Prueba de ANOVA comparando el número de vasos por campo no se aprecia diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.



Gráfica.3.30

Se ilustra en prueba de ANOVA para la relación en cuanto al número de vasos por campo de gran aumento los intervalos de confianza se cruzan no dando diferencia significativa o relación.

Control vs. Temprano La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo temprano es de 1.11 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-1.9068, 4.1290]

Control vs. Tardío La diferencia de la media del grupo control con la media del grupo tardío es de 2.33 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-0.6848, 5.3512]

Temprano vs. Tardío La diferencia de la media del grupo temprano con la media del grupo tardío es de 1.22 y con un 95% de intervalo de confianza de diferencia de la diferencia de medias caen en rango de [-1.7957, 4.2401]

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

Con base a lo visto en los resultados y expuesto en las figuras 3.5 a 3.8 y en las tablas 4.1 a 4.3 así como el grupo de figuras 3.10 a 3.13 y de tablas 4.3 a 4.4 donde se aplicó Curva de Friedman, Kruskal- Wallis y ANOVA se apreció que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.034$ IC del 97%), en la reducción del score de Evans así como en el grosor en milímetros en el tamaño de la banda fibrosa ($p < 0.0006$ IC de 99%) a favor de la aplicación tardía.

Se considera que la declinación de la capacidad fibrinolítica peritoneal después del estímulo es la vía central común que conduce a la formación de adherencias. Aunque los eventos moleculares y bioquímicos específicos que median el cambio de la actividad fibrinolítica no han sido aún totalmente elucidados, parece que las citocinas (factores de crecimiento y factores de angiogénesis, que son liberados por los macrófagos activados y otras células inflamatorias en respuesta al estímulo y cuerpo extraño (talco) son los principales implicados y no existe una sola vía común hacia fibrinogénesis.

Por lo revisado en el marco teórico podrá esperarse que la aplicación temprana contra la aplicación tardía presente mejores efectos ya que el inicio del depósito de fibrina ocurre posterior a las 24 a 48 horas de haber iniciado el estímulo o la lesión, como parte del infiltrado y exudado por parte de la membrana peritoneal. Es de esperarse que la pronta aplicación de fibrinolíticos intraperitoneales en forma temprana (24 a 48 hrs) pondría al medicamento en situación de ventaja farmacocinética contra la aplicación tardía, aumentando su biodisponibilidad y la inversión temprana del desequilibrio entre depósito de fibrina y fibrinólisis al contar con mayor cantidad de medicamento. En nuestro modelo de experimentación el estímulo tan potente como el talco estéril la biodisponibilidad y el efecto del medicamento se preserva a más de 21 días de haber iniciado el estímulo por ser un cuerpo extraño. Una posible ventaja contra las adherencias que no se encuentran completamente maduras, rígidas y/o estables; que son susceptibles del proceso de remodelación remodelación sobre la base de fibrina es escasa y que al menos de 21 a 30 días (demostrado en las tinciones con tricómico de Masson). El proceso es reversible y puede invertir la balanza hacia un ambiente de fibrinólisis, disminuyendo la rigidez que es el principal componente patológico.

Sabemos que en el modelo de adherencias la rata no desarrolla queloide la respuesta peritoneal esperada en cuanto tipo, potencia y reacción son un modelo válido en cuanto a la similitud de la respuesta comparada al humano (31). No hubo una diferencia estadísticamente significativa tanto en la relación del número de vasos por campo como en el número de células gigantes multinucleadas (figuras 3.15 a 3.30; tablas 4.5 a 4.9) en los cortes histológicos representativos del estudio. Aunque no se mostró una diferencia estadísticamente significativa si se aprecia un cierto beneficio discreto.

No se observó una relación entre el número de células gigantes multinucleada, el grado de vascularidad en la adherencia, tras la administración después de administrarse el fármaco. La reacción inflamatoria a cuerpo extraño es demasiado compleja involucra una gran cantidad de citocinas y factores quimiotácticos y la persistencia del estímulo al cuerpo extraño para generación de células gigantes multinucleadas. La participación de linfocitos van más allá de los mecanismos fibrinolíticos clásicos, el medicamento no se relaciona con la disminución de estos parámetros, así pues los instrumentos de medición cuentan con un margen de error mucho más alta que la medición convencional de las adherencias. Sin embargo parece que no existe una relación tanto en el grosor y la firmeza de las adherencias al comparan con la celularidad y la neovascularidad, esto es que no necesariamente las adherencias laxas presentan mínima vascularización o menos reacción inflamatoria a cuerpo extraño, el modelo de adherencias a cuerpo extraño es uno de muchos modelos en los que debe ser comparado.

En cuanto a lo reportado en la literatura solo se encuentra el beneficio de aplicación inmediata de fibrinolíticos por vía intraperitoneal. Como *Topal* ($p < 0.01$) *Vipond* ($p = 0.001$), *Risberg* ($p = 0.04$) y *Dunn*; nuestros resultados en aplicación temprana comportan reportes son diferencias similares ($p < 0.034$ IC del 97%, para la reducción del score de Evans) y con $p < 0.0006$ IC de 99% así como para el grosor en milímetros en el tamaño de la banda fibrosa ($p = 0.01$).

Se demostró que el efecto tenecteplase es similar al reportado en la literatura alteplase, durante el diseño del estudio y la realización del estudio se cuentan con múltiples variables exógenas múltiples las cuales pueden influir en los resultados que pueden ser que la rata no realiza queloide, o que no se desarrolla un fenómeno infeccioso. Es por eso que una alternativa es utilizar métodos estadísticos influyen en la validez de los resultados. Ejemplos de algunas limitantes, como el pequeño número de la muestra, y la realización del estudio mediante tenecteplase y no con alteplase el cual es el fibrinolítico más ampliamente usado por autores previos (1,2,3,5,7). Además se demostró que tenecteplase a dosis 5 mg/kg de tuvo efecto de la sobre la inhibición de adherencias en el modelo de rata.

Con base a nuestra hipótesis y los resultados obtenidos parece demostrarse una tendencia así como un beneficio en la reducción de las adherencias. Demostrado en la medición de las variables macroscópicas y microscópicas. Además otros indicadores indirectos como comparación de medias para formación de tendencias así como los reportes de los análisis cualitativos y cuantitativos específicamente la medición de colorimetría azul en depósito de colágeno mediante tinción en tricómico de Masson. Dichos indicadores refuerzan nuestros resultados y corroboran nuestra hipótesis clínica y experimental

CONCLUSIONES

-Se observó que tenecteplase aplicado por vía intraperitoneal a las 24 horas y 21 días en el modelo de roedor de producción de adherencias mediante la aplicación intraperitoneal de talco estéril, influyó en la reducción de la firmeza (score de Evans $p=0.034$ IC 97%) y el grosor en milímetros de la banda fibrosa medida sobre la superficie serosa ($p=0.0006$ IC 99%) y que al menos en nuestro estudio piloto la respuesta es tan efectiva como la aplicación temprana. Observar el efecto de tenecteplase (activador tisular del plasminógeno aTP) aplicado por vía intraperitoneal a las 24 horas y 21 días en el modelo de roedor de producción de adherencias mediante la aplicación intraperitoneal de talco estéril.

-Comparando los dos grupos con distintos momentos de aplicación en el tiempo encontramos; la aplicación temprana contra la aplicación tardía; se encontró que comparando los grupos temprano y tardío sometidos a análisis estadístico se demuestra una diferencia discreta a favor de la aplicación retardada sobre la tardía en cuanto a la obtención de mejores resultados como inhibidores de la formación de adherencias, los cuales en estudios ulteriores con muestras mucho mayores se tendrá que dilucidar el fenómeno observado.

-Se observó que el efecto que tiene tenecteplasa como fibrinolítico aplicado intraperitoneal en la inhibición de formación de adherencias intrabdominales cuenta con resultados muy similares en cuanto a la inhibición de adherencias peritoneales reportadas en la literatura con el uso de alteplase.

- Tenecteplasa intraperitoneal disminuye la rigidez de las adherencias demostrado en una disminución del score de Evans en cada uno de los grupos de estudio en los que se usó esta terapia.

-Tenecteplasa intraperitoneal disminuyó el grosor de la banda fibrosa medida en milímetros desde la serosa mediante microscopía con diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo en el que no se aplicó esta terapia.

-No se observó efecto de tenecteplasa por vía intraperitoneal sobre la disminución en la vascularidad de la fibrosis en cada uno de los grupos de estudio estadísticamente significativo.

-No se observó efecto que tendrá tenecteplasa intraperitoneal sobre la disminución en el número de macrófagos contenidos en la fibrosis peritoneal, en ninguno de los grupos en los que se aplicó la terapia.

-No se reportó evento adverso adversos en ninguna de las ratas en las que se aplicó esta terapia.

- Se observó disminución ligera cualitativa en la cantidad de colágeno depositado en las muestras que recibieron tricrómico de Masson y medición de cantidad azul de la muestra, como un objetivo extra el cual debe validarse como nueva técnica para cuantificación precisa de cantidad de colágeno.

EXPECTATIVAS Y RELEVANCIA CLINICA

1. La aplicación tardía de hasta 21 días post inducción, cuenta con un beneficio teórico ya que posee un mejor perfil de seguridad (por menor riesgo de sangrado, presencia de fugas anastomóticas o control de la sepsis), que no sucede con la aplicación inmediata de fibrinolíticos intraperitoneales (a menos de 21 días del estímulo formador de adherencias).
2. A pesar de ser una muestra pequeña se apreció que el beneficio es incluso mayor en el grupo de aplicación tardía en contra del de aplicación temprana. Favoreciendo nuestra hipótesis central, y mostrando una tendencia la cual puede ser reproducible en estudios de extensión con muestras mas grandes.
3. No se encontraron efectos adversos o fallecimiento de modelos vivos con este la aplicación de esta terapia, las exclusiones se debieron al no encontrarse talco en la cavidad peritoneal.

Continuar la línea de investigación de adherencias en modelos de animales es fundamental para fortalecer o rechazar nuestra hipótesis abriendo un nuevo panorama de estudio en el complejo fenómeno de la formación de adherencias.

Los autores sugieren algunas líneas de investigación como la reproducción del estudio mediante incremento en la población de la muestra a más de 50 ratas por grupo. Aumento de la muestra mediante recolección de tinciones de tricrómico de Masson con histogramas y cuantificación de pixeles por campo como en la muestra propuesta.

El estudio piloto de esta tesis sienta precedentes para continuarlo con aumento en el número de muestra, tomas seriadas el tiempo y aplicaciones mas retardadas hasta 90 días para definir el grado y la influencia en tiempo en la formación de adherencias, con el beneficio clínico y con mejor perfil de seguridad que ofrece la aplicación de esta técnica en humanos

IX. REFERENCIAS

1. *Risberg B. Et al Adhesions and preventive strategies. Eur J Surg Suppl. 1997;(577):32-9.*
2. *Topal E A comparison of three fibrinolytic agents in prevention of intra-abdominal adhesions.. – Acta Chir Belg - 01-JAN-2010; 110(1): 71-5*
3. *Reed KL, Stucchi AF, Becker ; Farmacologic inhibition of adhesion formation and peritoneal tissue-type plasminogen activator activity. JM. Department of Surgery, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts 02118, USA. klreed@bu.edu Semin Reprod Med. 2008 Jul;26(4):331-40*
4. *Evans D.M., McAree K., Daniel P, et al. Dose dependency and wound healing aspects of the use of tissue plasminogen activator in the prevention of intrabdominal adhesions. Am J Surg, 1993,165:229-232.*
5. *Vipond MN , Whawell SA , Thompson JN , Dudley HA . Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions . Lancet . 1990;335:1120–1122*
6. *Holmdahl L , Eriksson E , Eriksson BI , Risberg B . Depression of peritoneal fibrinolysis during operation is a local response to trauma . Surgery . 1998;123:539–544*
7. *Whawell SA , Thompson JN . Cytokine-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 by human mesothelial cells . Eur J Surg . 1995;161:315–318*
8. *Holmdahl L . The role of fibrinolysis in adhesion formation . Eur J Surg Suppl . 1997;577:24–31*
9. *Munireddy S, Kavalukas SL, Barbul A Intra-abdominal healing: gastrointestinal tract and adhesions. Surg Clin North Am. 2010 Dec;90(6):1227-36*
10. *Tuchmann A, Prevention of adhesions in abdominal surgery. A dose finding study with streptokinase/streptodornase. , Dinstl K, Depisch D, Wendt P, Blümel G. I. Chirurgische Abteilung KA Rudolfstiftung Wien.*

11. *Wendt P, Intra-abdominal adhesions and their prevention by topical tissue plasminogen activator. Ann R Coll Surg Engl. 1994 Nov;76(6):412-5*

12. *Dudley et al ; Experimental adhesion prophylaxis with recombinant tissue plasminogen activator. Ann R Coll Surg Engl. 1994 Nov;76(6):412-5*

13. *Spear J Tissue plasminogen activator reduces intraperitoneal adhesion after intestinal resection in rats. J Formos Med Assoc. 1998 May;97(5):323-7.*

14. *Hellebrekers BW, Trimbos – Kemper TC Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation. Fertil Steril. 2000 Aug;74(2):203-12.*

15. *Sulaiman H, Dawson L Role of plasminogen activators in peritoneal adhesion formation. Biochem Soc Trans. 2002 Apr;30(2):126-31*

16. *Andrew E. Jahoda, Mary Kay Olson, and Elizabeth J. Kovacs ; Murine Model of Peritoneal Adhesion Formation Methods in molecular medicine vol.m 97 jan. 141-148.*

17. *BinnebA et al; Macrophage ant T lymphocyte infiltrates in human peritoneal adhesions, indicate chronic inflammatory disease; World J Surg- 01 FEB 2008;32(2):296-304.*

18. *MolinasC. Angiogenic factors in peritoneal adhesions formation; Gynecological Surgeyr Volume 3, Number 3; 157-167.*

19. *Hamilton JA; Inflammatory microcrystals induce murine macrophage survival and DNA synthesis. Arthritis Res;2001;3(4)246-6.*

20. *Pelling D Evans JG; Long term peritoneal tissue response in rats to mould- release agents and lubricant powder used on surgeon's gloves. Chem Toxicology 1986 May;24(5) 425-30.*

21. *Sarah E Herrick; Human peritoneal adhesions are highly cellular, innervated, and vascularized; Journal of Pathology; 26 jun 2000;(10)- 1002/1096.*

22. *Fabiano G- Peritoneal Adhesions pathophysiology; Gynecological Chirurgique;01 Mar-2008;29(3):115-25.*

23. *Collen D Molecular mechanism of action of newer thrombolytic agents; J Am Coll Cardiol 1987 Nov 10 11B-15B*

24. Andrew E. Jahoda, Mary K Olson; *Murine Model of peritoneal Adhesion Formation; Methods of Molecular Medicine Vol. 78 Methods and Protocols. Springerlink 2001. 141-148*
25. Ivarsson M-L, Holmdahl L, Eriksson E, Soderberg R, Risberg B. *Expression and kinetics of fibrinolytic components in plasma and peritoneum during abdominal Surgery. Fibrinolysis 1998;12 61-67*
26. Cheung JP, *Adjuvant Therapy for the reduction of postoperative intrabdominal adhesions formation; Asian J Surg. 2009 Jul; 146(1):12-7*
27. Irkorucu O, *Reduction of postsurgical adhesions in a rat model a comparative study; Clinics Sao Paulo; 2009;64(2):143-8.*
28. Blinda MM; *Effect of Reteplase and PAI-1 antibodies on postoperative adhesion formation in a laparoscopic mouse model, Surg Endos, 2009 May 23(5) 1018-25.*
29. Lee BH, *The kringle domain of tissue -type plasminogen activator inhibits extracellular matrix -induced adhesion and migration of endothelial cells. Biotechnol, Biochem. 2008 sep. 72(9) 2303-8.*
30. Meydanli M. *EEffect of intraoperative irrigation with alteplase on adhesi3n formation associated with intraperitoneal chemotherapy (experimental study). Eur J Gynaecol Oncol. 2008;29(4):386-9.*
31. Brokelman WJ, *Decrease peritoneal Tissue plasminogen activator during prolonged laparoscopic surgery, J Sur Res, 2009;Jan;15(1) 89-93.*
32. DiPietro Luisa ; *Methods in Molecular Medicine, vol. 78: Wound Healing: Methods and Protocols and Aime L. Burns 3 Humana Press Inc., Totowa, NJ 141-147 pages.*

X. GLOSARIO

Peritoneo

El peritoneo es una membrana serosa, constituida por un epitelio de células mesoteliales aplanadas del mismo origen embriológico que las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Este mesotelio descansa sobre una membrana basal y un estroma de tejido conectivo laxo en donde se disponen vasos sanguíneos, nervios, fibras elásticas y macrófagos. Constituye la serosa más extensa del organismo, con una superficie aproximada de 1,8 m². Con presencia de dos capas tanto visceral como parietal, así como reflejos del mismo limita una cavidad virtual llamada cavidad peritoneal.

· Reparación peritoneal y adherencias peritoneales

Cuando se produce daño de las superficies del peritoneo tanto parietal como visceral y se altera su capa protectora se produce como respuesta una reacción inflamatoria y cicatrizal. En un comienzo (fase inflamatoria) existe un exudado leucocitario, con activación de macrófagos, aparición de plaquetas y liberación de citocinas y liberación de sustancias tanto a nivel local como sistémico de mediadores inflamatorios; a su vez es seguida la respuesta de cicatrización como mecanismo protector que repara las lesiones y la pérdida de la continuidad entre estructuras que recubre el peritoneo tanto parietal como visceral. Además produce el cierre de defectos en la serosa y une a los órganos con solución de continuidad interpuesta entre sí.

Sin embargo algunas veces el proceso cicatrizal intenso y sin remodelación constante puede llegar a formar puentes de colágeno firmes y densos llamados adherencias o bandas fibrosas las cuales son permanentes, sólidas y unen a los órganos viscerales adyacentes influyendo en la mecánica del tránsito intestinal, la fisiología de la fertilidad, y favorecen el desarrollo de dolor crónico abdominal y la fusión firme de planos de disección quirúrgica que dificultan las re intervenciones en caso de agregarse una nueva patología quirúrgica, aumentando la morbilidad de cualquier procedimiento quirúrgico ulterior (2).

· Adherencias peritoneales

Son bandas de tejido fibroso de diverso grado de rigidez, grosor y firmeza así como organización que se forman entre los órganos intraperitoneales y/o la pared abdominal interna, provocando adhesión entre las estructuras adyacentes, y que forman parte del proceso de cicatrización patológica.

La morbilidad relacionada a las adherencias peritoneales tanto postquirúrgicas como sepsis abdominal se presenta entre un 6 a 11%. El dolor abdominal crónico representa del 20% al 50%, obstrucción intestinal del 49% a 74% y la infertilidad 15% a 20%. La mortalidad relacionada varía de un 5% a un 10% y se le atribuye a las complicaciones secundarias como: obstrucción intestinal, complicaciones en su tratamiento (fístulas) y al riesgo quirúrgico que conlleva una re intervención (5).

En cuanto a la etiología la principal causa de adherencias intraperitoneales es una cirugía previa (70% a 95%), donde los procedimientos pélvicos son los más importantes, seguido de la peritonitis generalizada de cualquier origen, fístulas y complicaciones postquirúrgicas, endometriosis y tumores ginecológicos. 5% a 9% son bridas congénitas y menos del 1% son idiopáticas.

-Inductor: Cualquier sustancia o estrés físico capaz de iniciar una respuesta en la serosa del peritoneo con la consecuente cicatrización y formación de adherencias. En el estudio utilizamos talco estéril.

-Inducción: Momento en el que se aplica a la serosa del peritoneo cualquier sustancia o método inductor, en nuestro caso se aplican fármacos con el objetivo de reducir la respuesta inflamatoria, el depósito de colágeno y la rigidez de la banda fibrosa, la aplicación del medicamento adherenciolítico se clasifica en el estudio si se aplico en las 24 horas inmediatas la aplicación del inductor (aplicación temprana), contra aplicación tardía más de 21 días post exposición.

-Adherenciolisis: Cualquier sustancia o evento mecánico capaz de deshacer o reducir la firmeza y la unión de estructuras provocada la generación de bandas fibrosas. En nuestro estudio se utiliza tenecteplasa como medicamento capaz de producir adherenciolisis.

-Banda fibrosa: depósito organizado tanto celular como de matriz extracelular con cierto grado de firmeza y vascularidad capaz de consolidar o fijar órganos los unos con los otros y con potencial de desarrollar enfermedad y complicaciones.

-Fibrinolíticos: Sustancia capaz de reducir y fraccionar la fibrina en sus monómeros básicos con la consecuente pérdida de matriz y licuefacción del elemento sólido del coágulo.

-Fibrina: Es la principal proteína de la matriz del coágulo, y es la primera proteína fijadora implicada en la maduración y solidificación de las adherencias.

-Activador tisular del plasminógeno: En nuestro estudio un tipo de fibrinolítico cuyo mecanismo de acción es activas a la proteína plasmina principal proteína producida in vivo encargada de la lisis de fibrina.

-Escala de Evans: Propuesta por Evans et al 1993, clasificación cualitativa la cual da una calificación apreciativa del grado de rigidez reportado en forma macroscópica en modelos de experimentación de adherencias en rata.

-Inflamación granulomatosa: Tipo específico de reacción inflamatoria en la cual se forma un conglomerado celular consistente en infiltrado tanto polimorfonuclear, con macrófagos unidos los unos con los otros las cuales rodean al elemento inductor. En nuestro caso la inflamación granulomatosa se presenta como la respuesta principal del organismo vivo a la exposición de la serosa de partículas de talco en la cual se crean las adherencias.

FIBRINOLÍTICOS

Se define a un fibrinolítico como a cualquier sustancia con la capacidad de reducir la proteína fibrina la principal conformadora de la base de la formación de un coagulo en monómeros básicos

-Células gigantes multinucleadas:

Elemento celular conformado por la fusión de múltiples macrófagos con la consecuente creación de una célula mucho mayor en dimensiones capaz de poder fagocitar elementos gigantes de cuerpo extraño presentes en el granuloma.

VIII ANEXOS

