

77
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS HISTOLOGICO E INMUNOHISTOQUIMICO
DEL EFECTO DE LA COLAGENA-
POLIVINILPIRROLIDONA (CLG-PVP) EN
ADHERENCIAS PERITONEALES EN UN
MODELO MURINO.

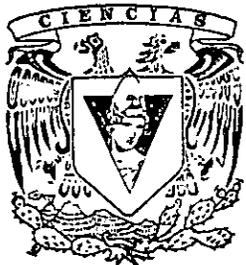
253552

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE IRENE GONZALEZ JACOME

DIRECTOR DE TESIS: DR. LIÑO-DIAZ DE LEON HERNANDEZ.

1998





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Análisis histológico e inmunohistoquímico del efecto de la colágena-PVP
en adherencias peritoneales de un modelo murino.

realizado por María Guadalupe Irene González Jácome

con número de cuenta 8731240-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Lino Díaz de León Hernández
Propietario M en IBB Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda
Propietario M en IBB Saúl Cano Colín
Suplente Dra. Genoveva González Morán
Suplente Biol. David Garcíadiego Cázares

[Handwritten signatures]

FACULTAD DE CIENCIAS



Consejo Departamental de Biología
Edna M. Suarez D.

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICADA

A mis papás:

Que siempre me brindan su cariño y apoyo constante en todo lo que realizo, de manera muy especial se las dedico a ustedes, los quiero mucho.

A cada uno de mis hermanos:

Juan, Daniel, David, Ofelia, Arturo, Alma, Tere, Raúl, Jorge Laura y Héctor.

Que me alientan a seguir siempre adelante.

Y a tí Dani:

Que siempre estas conmigo en todo momento, te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lino Díaz de León Hernández por su dirección, asesoría y apoyo que siempre me brindó durante mi pasantía. ¡Gracias!

A la M en IBB Janette Furuzawa Carballeda por la dirección, motivación, asesoría y revisión esmerada de esta tesis. Sinceramente ¡Gracias!

A la IQ Nantzin Martínez de Leal y al Ing. Leopoldo Leal Fleischer, por todo el apoyo que me brindaron incondicionalmente. De manera muy especial ¡Gracias!

Al M en IBB Edgar Kröttsch Gómez, que en toda ocasión obtuve respuesta a cualquier duda. ¡Gracias!

A Irma Castillo, por su alegría y amistad de siempre. ¡Gracias!

Al Dr. Alberto Corchado y al Dr. Gerardo Arrellín, por la oportunidad de colaborar con ustedes en este proyecto. ¡Gracias!

A los miembros del jurado por sus comentarios, sugerencias y correcciones hechas a esta tesis: Dr. Lino Díaz de León Hernández, M en IBB Janette Furuzawa Carballeda, M en IBB Saúl Cano Colín, Dra. Genoveva González Morán y Biol. David Garcíadieago Cázares. ¡Gracias!

A todo el grupo del Laboratorio de Tejido Conjuntivo: David, Saúl, Ricardo, Martha, Carlos, Jesús, Guille, Francisco R, Simona, Juanita, Coty y Sra. Chayo. Así como a Ernesto, Tatiana, Francisco Acosta y Felipe Moctezuma. ¡Gracias por su amistad!

Y a todos mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias. ¡Gracias!

LA HORA QUE PASA

Gabriela Mistral

Entrega tu labor, tu tela, tu ladrillo, tu cántaro o tu poema. Hoy, no tienes más hora segura que la que pasa; no puedes contar sino con esos latidos de tu corazón, con este aliento que se exhala de tu boca, con la claridad de los ojos tuyos en esta hora. La muerte, tal vez, ya tiene tus pies dentro de su telaraña aterciopelada y blanda, y sube... y sube...

Y el pensamiento de que la muerte te espía, empinada por sobre tu cabeza, no te deje caer la manos, más bien te enardezca. Te hicieron un instrumento frágil y tu maravilla es esa misma fragilidad. Algunos árboles quintuplican su vida; pero a ti te han sido dados sólo unos días prodigiosos.

Siente ¡qué vivos y frescos están tus sentidos en esta hora! ¡Qué alegre va la onda de tu sangre del tronco a los brazos y llega a la punta de tus dedos que se te ponen como temblorosos de ansia! Coge tu pañuelo o tu porcelana.

Apresúrate a dejar pintado el semblante de tu alma en la faena. No quedarán más retratos tuyos verdaderos que ese que haces sin saberlo en la firmeza del cañamazo que tejes o en la terca apretadura de los ladrillos que vas cortando. Pintas el rostro de tu coraje, el perfil de tu voluntad, tu alabanza o tu frenesí.

En este instante no dejes que caiga en vano el sol sobre tu espalda; devuelve el soplo de viento, lleno de olores fértiles, que bebes delante de los surcos. Devuélvelo todo. Esta es la insigne cortesía del hombre hacia las cosas...

Es un hilo de tu sangre que está resbalando y que, lo gastes o no, te deja disminuido, menguado. Porque el tiempo, desde que nacemos, es una invisible herida de traición que nos vierte gota a gota el pecho, como esos vasos que tienen una grieta delgada.

Hoy, toda la obra que viniste a hacer está golpeando a tu pecho imperiosa. ¡Y no la sientes!

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Tejido Conjuntivo del Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la dirección del Dr. Lino Díaz de León Hernández y la M. en IBB Janette Furuzawa Carballeda.

Apoyado parcialmente por ÁSPID S.A. de C.V.

Así como por una beca de la Fundación U.N.A.M.

1. INDICE	1
2. ABREVIATURAS	3
3. RESUMEN	5
4. INTRODUCCIÓN	7
4.0 El peritoneo	7
4.1 La inflamación y la reparación peritoneal	10
4.2 La reepitelización peritoneal	12
4.3 Las adherencias peritoneales y sus etiologías	13
4.4 El mecanismo de formación de las adherencias	15
4.5 La morfogénesis de las adherencias	17
4.6 El proceso inflamatorio en las adherencias	19
4.7 El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	25
4.8 Técnicas quirúrgicas, compuestos y fármacos empleados en la prevención de las adherencias peritoneales	34
5. ANTECEDENTES	42
6. HIPÓTESIS	46
7. OBJETIVOS	46
7.1 Objetivo General	46
7.2 Objetivos Particulares	46
8. MATERIALES Y MÉTODOS	48
8.0 Técnica quirúrgica utilizada para inducir las adherencias peritoneales en ratas	49
8.1 Obtención de biopsias y grupos de estudio	49
8.2 Descripción histológica de los tejidos en los grupos de estudio	52
8.3 Determinación de los infiltrados inflamatorios en los grupos de estudio	52
8.4 Determinación de las proporciones relativas de las colágenas tipos I y III en los grupos de estudio	53
8.5 Cuantificación de haces vasculares en los grupos de estudio	53
8.6 Determinación de las células inmunorreactivas al anticuerpo anti-PDGF en los grupos de estudio	53

9. RESULTADOS	55
10. DISCUSIÓN	67
11. CONCLUSIONES	71
12. APÉNDICE	72
12.1 Tinción histológica tricrómica de Massón	72
12.2 Tinción histológica de Herovici	72
12.3 Técnica de inmunoperoxidasa en cortes por congelación para la detección de PDGF	73
13. REFERENCIAS	75

2. ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CD	"Cluster Differentiation"
Células NK	"Natural killer cells" o células asesinas naturales
CMNs	Células mononucleares
clg-PVP	Colágena tipo I y polivinilpirrolidona (mezcla)
CAM	Moléculas de adhesión celular
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
DEX	Dexametasona
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
Fc	Región constante de la inmunoglobulina
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
ICAM-1	"Intercellular adhesion molecule-1" o molécula de adhesión intercelular-1
IGF	Factor de crecimiento semejante a insulina
IL-1	Interleucina-1
Lo	Linfocitos
LoSP	Linfocitos de sangre periférica
LPS	Lipopolisacáridos
Mø	Macrófagos
Mos	Monocitos

PCI	Parálisis Cerebral Infantil
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMNs	Células polimorfonucleares
Secuencia RGD	Secuencia Arg-Gli-Asp
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
VCAM-1	"Vascular Cell Adhesion Molecule-1" o molécula de adhesión celular vascular
VLA	"Very Late Activation Antigens" o antígenos de activación tardía

3. RESUMEN

El daño al mesotelio puede dispararse por una variedad de condiciones, incluyendo inmunoterapia intraperitoneal o crecimiento celular en respuesta a un antígeno persistente. Estos efectos inducen la síntesis de mediadores solubles como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (**PDGF**) secretado por las células peritoneales residentes y los leucocitos del infiltrado inflamatorio en respuesta a la activación local. Estos mediadores estimulan la proliferación de fibroblastos y el depósito de colágena, produciendo una alteración permanente de la arquitectura tisular peritoneal. Con base en lo anterior, el objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la colágena-Polivinilpirrolidona (**clg-PVP**) en la prevención de adherencias peritoneales en un modelo murino.

Previamente, se ha demostrado el efecto de la clg-PVP como un fármaco antifibrótico y fibrolítico por lo que estudiamos su participación en adherencias peritoneales generadas quirúrgicamente en un modelo murino, empleando fragmentos de cuerno uterino derecho fijados como implantes al mesenterio del cuerno y sobre una cuña realizada al ovario izquierdo, lo que originó una fibrosis. Como hemostático se aplicó una esponja de clg-PVP. El tratamiento consistió en una inyección intraperitoneal semanal con 0.2 ml del fármaco, durante cinco semanas. Se obtuvieron muestras a las 1^a, 3^a, y 5^a semanas posttratamiento, se realizaron las tinciones histológicas tricrómica de Massón y de Herovici con las que se evaluó la presencia de infiltrados inflamatorios y el grado de vascularización. Además, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico del PDGF.

Los resultados obtenidos con la tinción de Herovici muestran que las adherencias control presentaron un infiltrado celular abundante hasta la 5^a semana, mientras que en las tratadas con clg-PVP fue menor y disminuyó con respecto al tiempo. En cuanto al grado de

vascularización, las adherencias no tratadas presentaron un incremento considerable en el número de vasos sanguíneos en la 5ª semana, mientras que las tratadas se mantuvieron sin cambio con respecto al control. Con respecto al contenido de colágena tipo III en el grupo control no aumentó, mientras que en las tratadas incrementó a partir de la 1ª semana. Finalmente, la inmunohistoquímica para PDGF mostró que en las ratas sin tratamiento, las células inmunorreactivas fueron abundantes en todas las muestras analizadas, mientras que en las tratadas con clg-PVP se presentaron en menor cantidad, en todos los tiempos analizados, con respecto a las control. Los resultados anteriores sugieren que la clg-PVP es capaz de modular el recambio de la MEC del peritoneo y la inflamación asociada a esta patología.

4. INTRODUCCIÓN

EL PERITONEO

El *peritoneo* (Figura 1), se caracteriza por ser una membrana serosa extensa que limita la cavidad abdominal y cubre órganos viscerales como el hígado, el estómago, los intestinos y los ovarios (Wingerd, B. 1988); se compone de una fina capa de tejido conjuntivo laxo cubierta por una capa de mesotelio, tal como ocurre en el epiplón o el mesenterio (Fawcett, D. 1987). La porción del peritoneo que limita la superficie interna de la pared abdominal es el *peritoneo parietal*, y la porción que cubre los órganos, el *peritoneo visceral*. Así, el espacio potencial entre las dos porciones es la llamada *cavidad peritoneal*, que contiene normalmente una pequeña cantidad de fluido que reduce la fricción entre los órganos viscerales adyacentes (Wingerd, B. 1988).

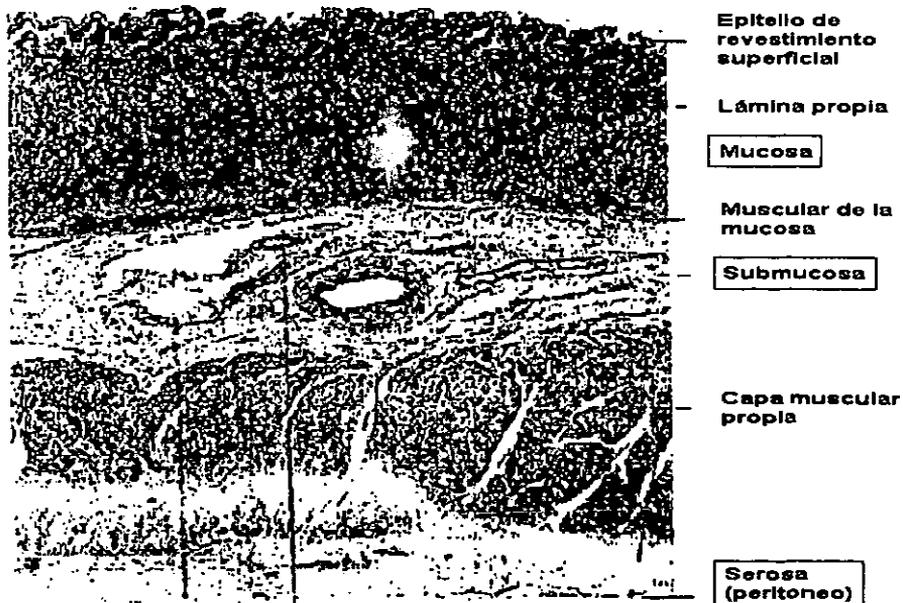


FIGURA 1. Localización del peritoneo a través de la pared del estómago 45x.

Además de las membranas peritoneales, existen *pliegues peritoneales*. Estas extensiones del peritoneo que crecen durante el desarrollo embrionario como el mesenterio ventral y el dorsal, contienen una delicada red de fibras de colágena y elastina, fibroblastos diseminados, macrófagos (Mø), células cebadas y un número variable de células adiposas. Estos mesenterios se diferencian, en la rata adulta, de la siguiente forma (Wingerd, B. 1988):

El *mesenterio ventral*, que son los pliegues del peritoneo que se originan de la pared abdominal, tales como el *ligamento falciforme*, que se une del hígado a la pared abdominal ventral y el diafragma; y el *omentum menor*, que se extiende entre la curvatura menor del estómago y el hígado.

El *mesenterio dorsal*, que son los pliegues del peritoneo que sujetan órganos asociados a la pared dorsal del abdomen, tales como: el *mesogaster*, que sujeta el estómago; el *mesenterio propio*, que sujeta el intestino delgado; el *mesocolon*, que sujeta el ovario en la mujer; y el *omentum mayor*, que es una doble capa de peritoneo que se extiende de la curvatura mayor del estómago hasta los intestinos.

Es importante hacer notar, que el *epiplón* se diferencia del peritoneo porque esta membrana serosa, característica de los mamíferos, está formada por innumerables orificios, que la reducen a un delicado encaje formado por haces de colágena cubiertos por células mesoteliales. Las áreas finas y fenestradas contienen pocos o ningún vaso. En las áreas más gruesas, donde el epiplón es una lámina continua, los Mø son numerosos. También hay muchos linfocitos (Lo) pequeños y células plasmáticas y, ocasionalmente, eosinófilos y células cebadas. El número de Los y de células plasmáticas varía considerablemente en diferentes especies animales. El epiplón se extiende hacia abajo, desde la curvatura mayor del estómago, en forma de una cortina suelta o velo dispuesto sobre los intestinos. Éste posee una gran importancia clínica en la limitación de procesos patológicos de la cavidad abdominal. Cuando se opera a pacientes con una úlcera

recientemente perforada, el epiplón se adhiere localmente a la pared del estómago por lo que se cierra la abertura. De modo semejante, el epiplón se adhiere a los sitios de inflamación y tiende a limitar el proceso, de tal manera, que se forma un absceso localizado en lugar de una peritonitis generalizada, a menudo fatal. Además de la protección proporcionada por la adherencia del epiplón, las células libres de su tejido conjuntivo constituyen una importante reserva móvil para combatir las infecciones de la cavidad peritoneal (Fawcett, D. 1987).

Normalmente el volumen de exudado seroso en las cavidades del cuerpo es pequeño, pero en circunstancias patológicas puede aumentar enormemente. Contiene células inmersas de naturaleza muy variada, entre las que se incluyen a: (1) los **Mæs**, que proceden del epiplón y que migran a la cavidad; (2) las células mesoteliales descamadas, que mantienen su forma plana o que se han redondeado; (3) los **Los** pequeños, cuya inmensa mayoría ha migrado desde los vasos sanguíneos del epiplón; (4) los leucocitos eosinófilos, que son de origen hemático; (5) las células cebadas libres, que son particularmente abundantes en los exudados serosos de ratas y ratones; y (6) gran número de leucocitos de tipo neutrófilos, en los exudados inflamatorios patológicos (Fawcett, D. 1987).

LA INFLAMACIÓN Y LA REPARACIÓN MESOTELIAL

La inflamación posttrauma se manifiesta por un infiltrado local de leucocitos, edema y neovascularización, que es parte integral de la reparación postquirúrgica (Figura 2). DiZerega, G. 1994). Así, diversos investigadores han estudiado la regeneración del peritoneo parietal y visceral en la rata, evaluando el proceso de reparación a través de microscopía electrónica (Waters, W. 1972; Ryan, G. 1973; Raftery, A. 1973). Estos estudios mostraron que tras 11 horas del daño, numerosos leucocitos polimorfonucleares (**PMNs**) se observaron enganchados entre los hilos de fibrina. De igual forma, escasos infiltrados inflamatorios se visualizaron en lo profundo de la herida. Desde las 24 hasta las 36 horas después del daño, el número de células, principalmente **Mø**s, se incrementó en la parte superficial de la herida. Alrededor del segundo día, la mayor parte de ésta se cubrió por una capa de **Mø**s asentados a través de una matriz de fibrina bien definida. También dos tipos celulares adicionales se observaron en la superficie de la herida: un tipo celular mesenquimático se presenta escasamente en la base de la herida, y pequeños acinos de células mesoteliales. Tres días después del daño, el número de células mesenquimáticas presentes, en la superficie se incrementó; aunque los **Mø**s siguieron siendo el tipo celular prevalente. Al cuarto día, las células mesenquimáticas se pusieron en contacto, unas con otras, en la superficie de la herida. Al quinto día, la reparación pareció completa en algunas áreas superficiales, debido a que se presentó una capa de células mesoteliales; sin embargo, en otras áreas la reparación fue menos avanzada. Del quinto al sexto día, el número de **Mø**s en la superficie de la herida disminuyó. Al séptimo día después de la cirugía, la apariencia de la herida se observó muy semejante al día seis, a excepción de una membrana basal discontinua que hasta ese momento se evidenció por debajo de las células mesoteliales, cubriendo el *peritoneo parietal* y el *cecum*. En el octavo día una capa continua de células mesoteliales cubrió la herida superficial.

ELEMENTOS CELULARES EN LA REPARACIÓN PERITONEAL

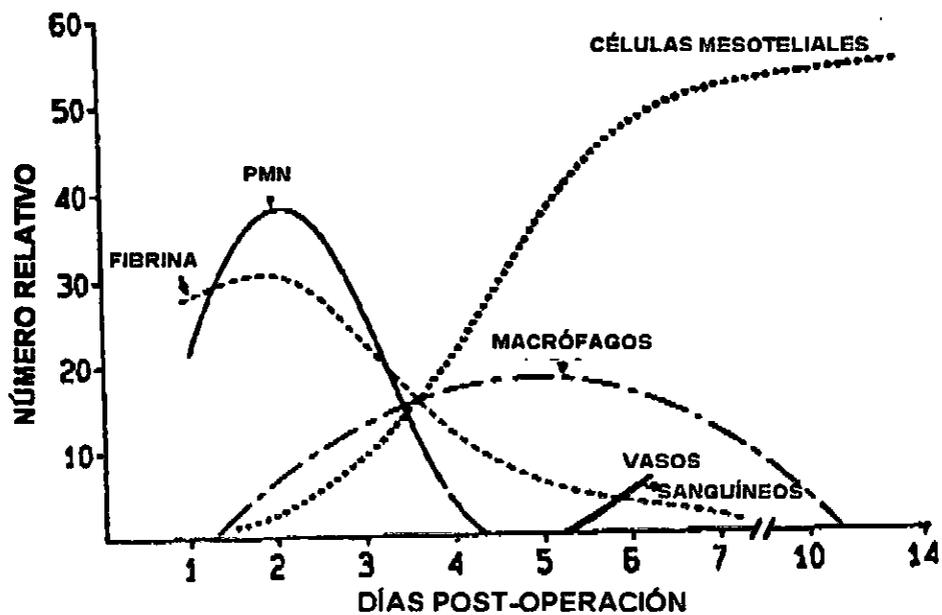


FIGURA 2. Cambios en el número relativo de elementos celulares y fibrinólisis (fibrina) en el sitio de daño peritoneal, en ratas adultas, al tiempo de la reepitelización. Los principales elementos celulares que controlan la reparación peritoneal son los *Mø*s, los cuales aparecen en gran número uno o dos días después de la cirugía. El *Mø* está relacionado con la regulación de los fibroblastos y las funciones celulares mesoteliales. Alrededor del segundo día, las células mesoteliales se presentan en gran número sobre la lesión peritoneal. Por el día 6 ó 7 después del daño quirúrgico, virtualmente toda la lesión peritoneal se cubre por, al menos, una capa de células mesoteliales. (DiZerega, G. 1994).

LA REEPITELIZACIÓN PERITONEAL

En 1919 se demostró que la reparación peritoneal era distinta a la de piel (Figura 3). Así, se observó que cuando un daño se efectuaba en el peritoneo "la superficie entera llega a reepitelizarse simultáneamente, y no gradualmente, de los bordes como en una reparación epidermal" (Hertzler, A. 1919). Aún cuando la multiplicación y la migración de células mesoteliales del margen de la herida contribuyen al proceso reparativo, éstas no juegan un papel predominante. El nuevo mesotelio está constituido principalmente de células epiteliales que se adhieren a través de la superficie de la herida y entonces proliferan. En consecuencia, las grandes heridas peritoneales se reepitelizan tan rápido como las pequeñas.



FIGURA 3. El posible origen de un nuevo mesotelio incluye a tres tipos celulares: (1) Células mesenquimáticas primitivas presentes en la periferia del daño; **(2)** Células mesenquimáticas primitivas en vías de diferenciación hacia fibroblastos y **(3)** Fibroblastos subperitoneales que, en su caso, se originan de los fibroblastos diferenciados, pero inactivos, dentro el tejido conjuntivo perivascular (diZerega, 1994).

En general, se ha reportado que la reparación del mesotelio se lleva a cabo en 5 ó 6 días cuando se trata del peritoneo parietal (Ellis, H. et al, 1965. y Hubbard et al. 1967). Cuando el

defecto peritoneal va desde los 2 X 2 o hasta los 0.5 X 0.5 cm, éstos son cubiertos completamente por una lámina continua de mesotelio 3 días después de la herida (Ellis, H. 1962).

LAS ADHERENCIAS PERITONEALES Y SUS ETIOLOGÍAS

La palabra **adherencia** se deriva del latín *adhaerere*, que significa **estar unido**. La adherencia se define como la unión congénita o cicatrizal de la membrana serosa con algún órgano visceral contiguo, normalmente independiente (Garnier, M. 1981) (Figura 4).

En la actualidad, clínicos e investigadores están de acuerdo en que la formación de las adherencias postquirúrgicas son comunes después de una cirugía pélvica (Fabri, P. 1991) y que éstas, en general, son un problema importante clínicamente, ya que producen infertilidad y obstrucción intestinal (Duffy, D. 1996). Otras etiologías por las que se daña el mesotelio y se desarrollan las adherencias son la inmunoterapia intraperitoneal (Urba, W. 1989; Steis, R. 1990), las diálisis peritoneales (Gandhi, V. 1980; Daurgida, J. 1986), y el crecimiento celular (Friemann, J. 1990; Vlasveld, L. 1992).

En los últimos años, el interés en la prevención de las adherencias peritoneales se inclinó hacia la investigación multidisciplinaria lo que reforzó los conocimientos y acentuó la comprensión de las mismas. Los estudios recientes demuestran, concluyentemente, que las técnicas microquirúrgicas por sí solas, no previenen la formación de adherencias, ya que éstas se detectan postoperatoriamente por ejemplo, la incidencia de la formación de adherencias postoperatorias, mostró en un estudio, que después de una adhesiolisis laparoscópica en 68 pacientes, 66 incidieron al desarrollo de adherencias, es decir, un 97.1% de los pacientes las presentaron y un 2.9% no presentaron adherencias pélvicas después de la operación inicial. (Diamond, M. 1991).



FIGURA 4. Observación de la adherencia formada a través de una laparotomía.

La reformación de las adherencias es citada por diversos autores y sus resultados muestran que los pacientes, después de ser sometidos a una segunda adhesiolisis con laparoscopia, reforman adherencias con un porcentaje de un 55% a un 100% (Tabla 1).

	TIEMPO DEL PROCEDIMIENTO	NÚMERO DE PACIENTES	NO. DE PACIENTES CON ADHERENCIAS♦
Diamond et al.	1-12 semanas	106	91 (86)
DeCherney y Mezer	4-16 semanas	20	15 (75)
	1-3 años	41	31 (76)
Surrey y Friedman	6- 8 semanas	31	22 (71)
	≥ 6 meses	6	5 (83)
Pittaway et al.	4-6 semanas	23	23 (100)
Trimbos- Kemper	8 días	188	104 (55)
Daniell y Pittaway	4-6 semanas	25	24 (96)

TABLA 1. Adherencias detectadas en una segunda observación♣.

♣ Tomado de Diamond et al. 1991.

♦ Los valores en paréntesis representan el porcentaje.

En el área de la investigación científica, así como en la industria farmacéutica un gran esfuerzo se ha dedicado a tratar de mejorar la reparación peritoneal, a través de la identificación de fármacos y materiales biocompatibles que disminuyan la formación de las adherencias y en general reducir la **relación costo/paciente**. Así, entre los avances en el campo principalmente, se pueden mencionar cinco:

1. Los mecanismos fisiológicos de la reparación peritoneal, que se definen ahora a nivel anatómico, bioquímico y molecular.
2. El financiamiento para la prevención de enfermedades crónicas, que se contempla por proveedores de servicios de salud y agencias financieras gubernamentales para el cuidado de la salud.
3. El complejo médico-industria, que concibe beneficios en el descubrimiento de más modalidades para reducir el costo de enfermedades crónicas y, por lo tanto, producir apoyo a la investigación.
4. El desarrollo de nuevos agentes farmacológicos, a través del adelanto en la biología molecular que aumentan la reparación tanto de heridas agudas como crónicas.
5. Las técnicas quirúrgicas reconstructivas, que han cambiado drásticamente (Clark, J. 1988).

MECANISMO DE FORMACIÓN DE LAS ADHERENCIAS

El mecanismo de formación de las adherencias comienza por una variedad de causas mencionadas anteriormente, que principalmente originan un **daño al mesotelio**, el cual desarrolla una respuesta inflamatoria en la superficie serosa (peritoneo) con una consecuente pérdida de mesotelio. Posteriormente, se incrementa la permeabilidad de los vasos sanguíneos en el tejido traumatizado y se produce una salida de exudado serosanguíneo rico en células inflamatorias. Este exudado coagula en un período de 3 horas. Normalmente, la mayoría de las matrices de fibrina

formadas llegan a lisarse algunos días después de su formación. Así, la patogenia de las adherencias peritoneales está directamente relacionada con aquellos factores que dificultan la degradación de las matrices fibrinosas, es decir, por una inadecuada fibrinólisis. (Holtz,G. 1984).

En una **remesotelización** se observa una actividad fibrinolítica adecuada, donde el peritoneo normal presenta activadores de plasminógeno localizados en el mesotelio y en los vasos sanguíneos submesoteliales. Estos activadores convierten al plasminógeno, que se presenta en la sangre y en el exudado fibrinoso, en plasmina, una enzima degradativa de la fibrina. Por lo que la actividad fibrinolítica de las células mesoteliales les permite penetrar y lisar las adherencias fibrinosas.

En el caso de la **formación de adherencias** se presenta una actividad fibrinolítica inadecuada a la cual se le pueden argumentar dos daños peritoneales intraoperativos comunes, una es el secamiento de la serosa y otro es el contacto con la sangre. Así, cuando ambos daños se presentan concurrentemente, se forman las adherencias, ya que el secamiento de la serosa puede causar daño histológico, pero raramente induce la formación de adherencias y, similarmente, en ausencia de un daño seroso; la sangre sin coagular no induce la formación de adherencias. Otro argumento por el que existe una inadecuada actividad fibrinolítica son los productos de la sangre que proveen una fuerza adicional a la fibrina donde, los elementos celulares hacen que la lisis de la fibrina se realice con más dificultad. Además las plaquetas pueden jugar un papel importante estimulando la reacción inflamatoria serosa y la subsecuente migración y proliferación de fibroblastos (Figura 5).

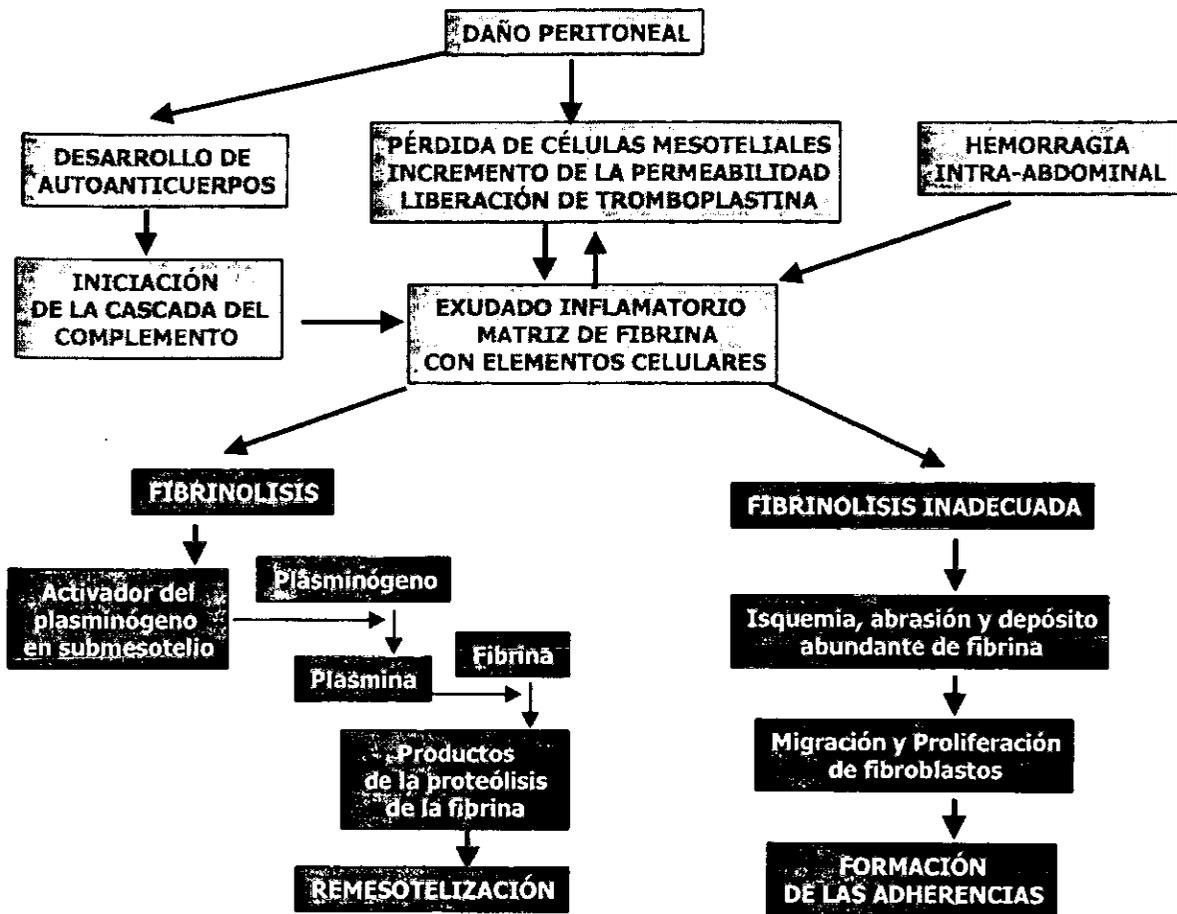


FIGURA 5. Procesos de remesotelización o formación de adherencias después de un daño peritoneal.

LA MORFOGÉNESIS DE LAS ADHERENCIAS

Algunos autores han descrito las características morfológicas e histológicas de la formación de adherencias quirúrgicas en ratas, donde se usaron técnicas de microscopía de luz y electrónica (Milligan, D. 1974; Raftery, A. 1980). Ellos han comparado el crecimiento de adherencias del hígado, *cecum* y uniones ceco-ileales usando técnicas de abrasión y de franjas para crear defectos peritoneales bien delimitados.

En la actualidad, la descripción de la formación de las adherencias propuesta por diZerega, resulta ser la más completa. Estas comienzan con el establecimiento de una matriz de fibrina que se presenta típicamente durante la coagulación. Del primer al tercer día, la adhesión está compuesta de una variedad de elementos celulares inmersos en una matriz de fibrina (Figura 6). Esta matriz es gradualmente reemplazada por tejido de granulación vascular que contiene Mø, fibroblastos y células gigantes. A corto tiempo, no hay evidencia de adhesión de células mesoteliales hacia la superficie de la adherencia. Al cuarto día, la mayoría de la fibrina se hidroliza y se presenta un gran número de fibroblastos y un aumento en la cantidad de colágena. Después del cuarto día, los Mø son los leucocitos predominantes en la matriz de fibrina residual, junto con algunos fibroblastos. Al quinto día, esta matriz está generalmente organizada con diferentes haces de colágena, fibroblastos y células cebadas. Además, se observan pequeños haces vasculares que contienen células endoteliales. En el transcurso del quinto al décimo día, los fibroblastos llegan a orientarse linealmente dentro de la adherencia mientras la organización y depósito de colágena se incrementa. A las dos semanas, las células presentes son predominantemente fibroblastos. Y de uno a dos meses después del daño, las fibrillas de colágena se organizan en discretos haces interpuestos por fibroblastos de forma espinosa, junto con algunos Mø (diZerega, G. 1994).

En el caso de la formación de una adherencia madura esta se caracteriza por ser una banda fibrosa que frecuentemente contiene pequeños nódulos de calcificación. Además, éstas contienen vasos sanguíneos y fibras de tejido conjuntivo, incluyendo elastina, que por lo general se extienden y son cubiertas por mesotelio. Estos efectos son los que dan lugar a la elaboración de mediadores secretados por células peritoneales residentes (Mø primordialmente) y leucocitos del infiltrado inflamatorio en respuesta a la activación local. Estos mediadores que incluyen al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), estimulan la proliferación de fibroblastos y el depósito de colágena (Kovacs, E. 1991), dando lugar a una alteración permanente de la arquitectura peritoneal.

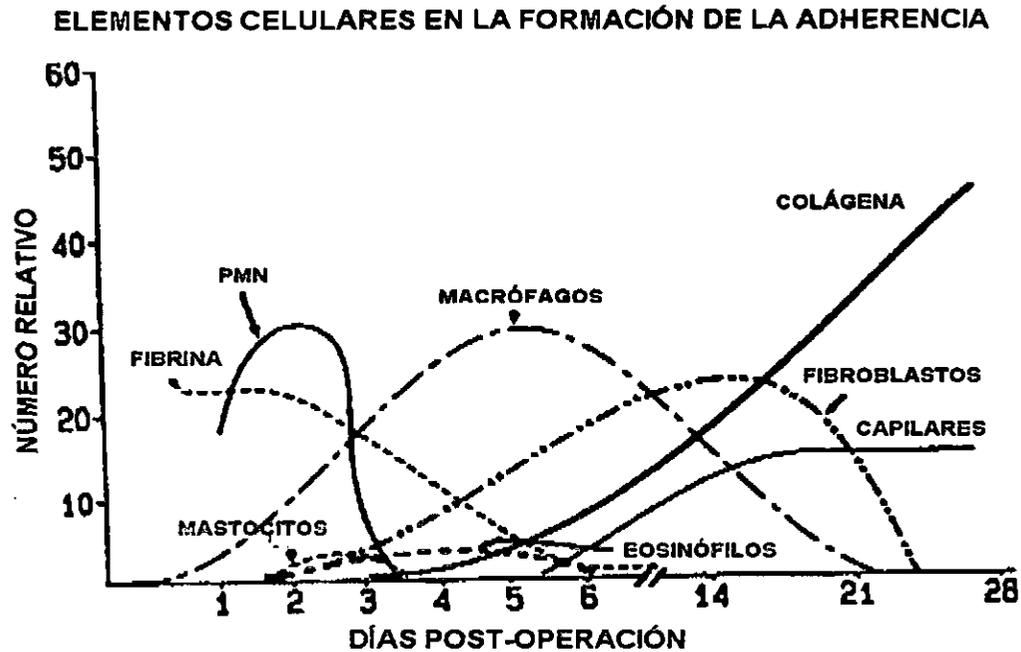


FIGURA 6. Elementos celulares en la formación de la adherencia. A partir del daño peritoneal se forma inmediatamente la matriz de fibrina y las células PMNs se presentan en gran número a lo largo de toda la cirugía. Su número aumenta rápidamente en función del daño. El aumento acelerado en el número de PMNs y la cantidad de fibrina resalta la importancia de la prevención de la formación de adherencias transoperatoria y postoperatoriamente (diZerega, G. 1994).

EL PROCESO INFLAMATORIO EN LAS ADHERENCIAS

A diferencia de algunos organismos inferiores como los lacertilios que sanan por regeneración, los humanos sanan preferentemente a través de mecanismos reparativos relacionados con la inflamación, depósito de proteínas de matriz extracelular y remodelación de la cicatriz (Clark, J. 1988). Debido a que en la actualidad existen agentes que son capaces de modificar la reparación de heridas humanas mejorando los procesos de inflamación y cicatrización,

es necesario conocer detalladamente las características importantes de estos mecanismos.

En la inflamación, la respuesta del cuerpo a un daño está caracterizada por el incremento del flujo sanguíneo hacia el área afectada para diluir potencialmente los agentes tóxicos, posteriormente se presenta un incremento de la permeabilidad capilar que facilita la transvasación de grandes moléculas a través del endotelio y la migración de leucocitos (primeramente neutrófilos y en menor cantidad, **Mø**s) fuera del sistema circulatorio hacia los alrededores del tejido, para remover desechos y restaurar la actividad y estructura del tejido. La duración y magnitud de la respuesta inflamatoria dicta el resultado final. Si el tejido es dañado severamente y la respuesta inflamatoria es prolongada, la restauración de la arquitectura y la función del tejido puede ser más difícil. (Kovacs, E. 1994). Histológicamente, el primer tipo celular que se presenta en el sitio de inflamación es el neutrófilo. La infiltración neutrófila aguda es seguida por una invasión de **Mø**s y **Lo**s. Este evento marca el comienzo de la inflamación crónica, la cual es de larga duración y comprende muchos tipos diferentes de células sanguíneas y del tejido conjuntivo, incluyendo **Lo**s y fibroblastos (Kovacs, E. 1994).

Así, se puede decir que la inflamación es el proceso por el cual los leucocitos y material derivado del suero son dirigidos al sitio del daño. En la piel por ejemplo, la inflamación es caracterizada por enrojecimiento y edema. Donde, factores de coagulación, así como factores que alteran la permeabilidad vascular, permiten facilitar vasodilatación e incremento células sanguíneo en el área afectada, aumentando la permeabilidad de los capilares y la migración de células efectoras del sistema circulatorio al sitio de lesión.

La respuesta inflamatoria puede dividirse en varios estadios que se superponen: vascularidad aguda, celularidad aguda, celularidad crónica y resolución. Esta respuesta es disparada por trauma, infección, necrosis tisular o reacción inmune, la cual permite la dilatación de vasos sanguíneos causando la salida del fluido de las arteriolas precapilares. Los cambios agudos en el patrón de flujo sanguíneo permiten la adhesión de neutrófilos a lo largo de la superficie vascular de

las células endoteliales, seguidas por la migración directa de éstos a través de una monocapa de células endoteliales hacia el tejido conjuntivo. Dependiendo del grado de infección o daño del tejido, este proceso puede ser suficiente para remover desechos y restaurar la estructura del tejido. Sin embargo, un infiltrado inflamatorio crónico de **Møs** y **Los** es usualmente necesario para remover bacterias y tejido necrótico. Cuando el daño es más extenso, el tejido es reemplazado en la fase de resolución por tejido cicatrizal, como resultado de la proliferación de fibroblastos y del depósito de proteínas del tejido conjuntivo.

En particular los **Møs** aislados de heridas dérmicas en modelos animales han presentado la capacidad de estimular la formación de nuevos capilares (angiogénesis), síntesis de colágena y fibroplasia. La habilidad de los **Møs** activados para inducir angiogénesis como fibroplasia esta mediada, principalmente, por la secreción de factores de crecimiento y otras proteínas que inducen la proliferación celular y la síntesis de proteínas. (Diprieto, L. 1995)

Los análisis histológicos revelan que los leucocitos mononucleares y los **PMNs** están presentes en el tejido inflamatorio, debido a un elemento clave en el proceso inflamatorio: la **quimiotaxis**, que es la migración dirigida de leucocitos del sistema vascular a través de factores quimiotácticos que son generados en el sitio de la inflamación y difundidos radialmente.

Una gran variedad de agentes pueden ser quimiotácticos para los leucocitos, entre los que se incluyen los péptidos formilados, los leucotrienos B₄, la trombina, el TGF- β , los péptidos quimiotácticos de monocitos (**Mos**), las proteínas de tejido conjuntivo como la fibronectina, la colágena, la laminina, y fragmentos de elastina. Así como los agentes de origen sanguíneo y componentes de fragmentos de membranas basales pueden atraer células al espacio extravascular (Kovacs, E. 1994).

La **migración celular** dirigida por factores quimiotácticos se lleva a cabo mediante las moléculas de adhesión celular (**CAM**), las cuales son requeridas para que las células migren a través matrices extracelulares y las monocapas de células endoteliales. Mientras que las células

endoteliales se adhieren unas con otras por complejos de unión, los leucocitos usan una serie de proteínas de superficie celular o **CAM**, las cuales juegan un papel importante en los procesos de crecimiento, proliferación, migración, diferenciación celular, y otros. (Albeda, S. 1990).

Dentro de los principales receptores de adhesión que se detectan en las células del sistema inmune, se agrupan tres grandes familias, que se describen brevemente a continuación:

1. La familia de las **Integrinas**: comprende a un grupo de glicoproteínas heterodiméricas transmembranales, aparentemente heterogéneas, que fueron denominadas así debido a su función integradora de las células con la matriz extracelular en el tejido conjuntivo. Las integrinas están constituidas por una cadena β y una α asociadas de manera no covalente; se conocen 7 cadenas β (1 a 7) y al menos 12 cadenas α ($\alpha 1$ a 8, αL , αM , αX y αV). Existe una asociación preferencial de algunas cadenas α con ciertas β , lo que da lugar a la formación de 3 subfamilias: cuando la cadena $\beta 1$ (CD29) se asocia a las cadenas $\alpha 1$ a la 8 genera *la subfamilia de las integrinas $\beta 1$ o VLA* (Very Late Activation Antigens); cuando la cadena $\beta 2$ (CD18) se asocia a las cadenas αL , αM , y αX se constituye *la subfamilia de las integrinas $\beta 2$ o leucocitarias* y por último, la $\beta 3$ se asocia preferencialmente con αV (CD41/CD51) que se denomina *subfamilia $\beta 3$ o de las citoadhesinas*. Las integrinas $\beta 1$ se expresan casi en todas las células del organismo, a excepción de los neutrófilos. Entre sus funciones se incluyen el reconocimiento de los componentes de la matriz extracelular, uniéndose cada una a más de un ligando; por ejemplo, la adhesión de la VLA4 participa en la unión de las células T CD8⁺, los **Mos** y los eosinófilos a la fibronectina, por un lado y por el otro, a las células endoteliales activadas, a través de la molécula **VCAM-1** (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), una glicoproteína perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Finalmente, la activación celular, como en el caso de la interacción de VCAM-1/VLA4, que induce señales de coestimulación en la activación de las células T mediada por su receptor (TCR). Las integrinas $\beta 2$ se expresan únicamente en los leucocitos, por lo que se les ha denominado integrinas

leucocitarias. Sus funciones incluyen la actividad citotóxica mediada por las **células NK** y la dependiente de anticuerpos (**Acs**), la función cooperadora de las células T, la unión de los leucocitos al endotelio, la presentación antigénica, la agregación, la migración y la quimiotaxis leucocitaria, la opsonización y fagocitosis, así como la interacción leucocitaria con superficies recubiertas de proteínas séricas. La subfamilia $\beta 3$ se expresa principalmente en las plaquetas. Posee funciones de reconocimiento en ligandos de la matriz extracelular con la región **RGD** tales como la fibronectina, el fibrinógeno, el factor de Von Willebrand, la vitronectina, la trombospondina, la osteopontina y la colágena (Furuzawa-Carballeda, J. 1995).

2. La familia de las **selectinas**: son lipoproteínas transmembranales con una estructura peculiar (Un dominio tipo lectina, otro tipo factor de crecimiento epidérmico y de 2 a 9 dominios tipo factor del complemento) que se expresan en la membrana de los leucocitos, las plaquetas y las células endoteliales. Se han descrito 3 tipos de selectinas, la L-selectina (LAM-1 gp90MEL, Mel-14, Leu 8, LECAM-1), la E-selectina (ELAM-1, LECAM-2) y la P-selectina (CD62, PADGEM, GMP-140, LECAM-3); la primera se expresa constitutivamente en la mayor parte de los leucocitos, los **Mos**, las células T, los **PMNs** y otras células mieloides, la segunda lo hace en el endotelio activado y la tercera se detecta en las plaquetas y en las células endoteliales. Los ligandos que se unen a las selectinas son principalmente oligosacáridos que se encuentran en la membrana de diversas células. La E-selectina y la L-selectina inducen la adhesión de los **Los** y los granulocitos a las células endoteliales mediante el fenómeno de rodamiento (rolling) a lo largo de las paredes de la microvasculatura, éste es el paso inicial en la migración de los leucocitos a través de los endotelios. La P-selectina se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y en las plaquetas se localiza en las membranas de los gránulos densos, por lo que es capaz de mediar las interacciones entre éstas y los leucocitos y posiblemente también entre las células endoteliales y los leucocitos (Furuzawa-Carballeda, J. 1995).

3. Las moléculas de la superfamilia de las **inmunoglobulinas**: son glicoproteínas que

comprenden a un grupo importante de moléculas que poseen regiones que semejan a las de los dominios de las inmunoglobulinas. Se expresan en los **Los**, así como en otras células, e incluyen al CD2 (LFA-2), el LFA-3, la ICAM-1 ó CD54, la ICAM-2, el CD4, el CD8, el complejo Receptor de Células T (TCR)/CD3, la VCAM-1 y las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I y II (Furuzawa-Carballeda, J. 1995).

La adhesión de leucocitos a la superficie celular endotelial y su migración fuera del sistema vascular hacia el espacio intersticial, requiere de las CAMs. Los neutrófilos, por ejemplo, expresan MAC-1 o LFA-1, los cuales pueden interactuar con ICAM-2. La molécula de adhesión celular endotelial que se une a Mel-14/LAM-1 es desconocida. Los **Los** que tienen relación con LFA-1 pueden también unirse a células que expresan ICAM en células endoteliales. (Albeda, S. 1990).

Para iniciar la **reparación de una herida**, las plaquetas se unen a productos de la matriz extracelular, presentes después de un daño al endotelio. La activación de la cascada de coagulación estimula la unión de nuevas plaquetas que se desgranulan y liberan trombina y TGF β . Por ejemplo, la expresión de los receptores de fibronectina en queratinocitos, facilitan la migración de éstos a través de las moléculas abundantes de fibronectina en las heridas. Los neutrófilos, a su vez, pueden adherirse a las superficies de células endoteliales de los capilares y pasar a través de las uniones celulares de vénulas postcapilares en respuesta a señales quimiotácticas específicas. La necrosis se dispara por la liberación de enzimas hidrolíticas y metabolitos activos de oxígeno de los neutrófilos. Asimismo, la trombina y el TGF β juegan también un papel importante en la inflamación crónica, estimulando la expresión de integrinas en la superficie de **Mos** y fibroblastos, los cuáles facilitan su infiltración al sitio del daño (Kovacs, E. 1994). Éstos ejercen directamente efectos en el tejido blanco a través del contacto celular o, indirectamente, a través de mediadores como citocinas y eicosanoides (Kovacs, E. 1994).

Además de las citocinas, otros mediadores no peptídicos son producidos por las células efectoras, como lo son los productos del metabolismo del ácido araquidónico durante el proceso

inflamatorio (incluyendo las prostanglandinas, leucotrienos y tromboxanos). Éstos se originan a partir de la ruptura de la membrana fosfolipídica en su mayoría, sino es que en su totalidad, por las células que participan en la respuesta inflamatoria, entre las que se incluyen a las células de origen inmune o no inmune.

El metabolismo del ácido araquidónico puede dividirse en dos rutas, la de la ciclooxigenasa y la de la lipooxigenasa. El papel de las prostanglandinas, productos de la ruta de la ciclooxigenasa, se ha estudiado en varios laboratorios demostrando que la E2 (PGE2) regula la producción de interleucina-1 (**IL-1**) y del factor de necrosis tumoral- α (**TNF- α**). Los estudios reportan la producción tanto de citocinas como de PGE2, sugiriendo un posible papel autócrino o parácrino para los metabolitos del ácido araquidónico en el control de la expresión de los genes de la **IL-1** y el **TNF- α** . Ya que las prostanglandinas inducen a las citocinas y éstas a su vez inducen a las prostanglandinas, lo completa un ciclo de regulación autócrina entre ambas (Kovacs, E. 1994).

En las células cebadas, la histamina es el principal mediador preformado. Su síntesis se lleva a cabo a partir de la histidina y por una enzima encontrada en el citoplasma de las células cebadas y de los basófilos. Sus funciones son mediadas a través de dos clases distintas de receptores, los H1 y H2, en donde, los efectos inflamatorios vasculares son transducidos a través de receptores H1 de células musculares lisas y los efectos antiinflamatorios a través de receptores H2. (Kovacs, E. 1994).

EL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

Debido a que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (**PDGF**) es uno de los muchos factores polipeptídicos que controla el crecimiento, diferenciación y activación de una variedad de células como los **M ϕ s**, fibroblastos y células endoteliales, los cuales participan en actividades tan diversas como la reparación de tejidos blandos, de hueso y la regeneración epitelial, es importante resaltar que algunas de las actividades pueden resultar de la interacción del **PDGF** con otros

factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidermal (**EGF**), el factor de crecimiento fibroblástico (**FGF**), el **TGF- β** y el factor de crecimiento semejante a la insulina (**IGF**), los cuales además de relacionarse funcionalmente parecen interactuar y afectar procesos fisiológicos normales como la reparación de heridas, la morfogénesis y la embriogénesis, o procesos patológicos como las respuestas fibrosas asociadas a respuestas inflamatorias como la fibrosis pulmonar, la mielofibrosis, la artritis reumatoide, la arteriosclerosis y, en este caso, la formación de adherencias peritoneales. Debido a ello se ahondará en las características más importantes del PDGF como son la expresión y secreción en diferentes tipos celulares, las características de sus receptores, de sus mecanismos de acción celular y bioquímico, de sus efectos directos e indirectos en el crecimiento celular y de cómo interviene en la modificación de proteínas de la matriz extracelular.

El PDGF es una proteína de 30 KDa que se aisló inicialmente de los gránulos α de las plaquetas. Éste consiste de 2 subunidades: A y B, las cuales están unidas por puentes disulfuro que forman el dímero de 30 KDa. Este factor existe en tres isoformas diméricas: el heterodímero AB y los homodímeros BB y AA, los cuales exhiben actividad biológica; ya que los monómeros no la presentan (Kovacs, E. 1991). La actividad biológica de las tres isoformas parece ser cualitativamente similar entre ellas. Cada una es capaz de unirse a uno o a ambos tipos de receptores, el α y el β , los cuales varían en número en los diferentes tipos celulares. Parece que cada una de las 2 subunidades del dímero de PDGF se unen a una molécula receptora, la cual resulta de la dimerización de los receptores ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$). Este receptor puede ser requerido para la transmisión de la señal; en donde las células que poseen solamente receptores β responderán al PDGF-BB, débilmente al PDGF-AB y nada al PDGF-AA. No obstante, las que poseen únicamente receptores α responderán a las tres isoformas (Pierce, G: 1991).

El PDGF es el principal mitógeno para células mesenquimáticas; se expresa a niveles bajos o indetectables en células normales; y las diferencias en los componentes de la MEC a los cuales las

células se adhieren, el tipo celular y las alteraciones metabólicas en respuesta a los diferentes medios de cultivo, están relacionadas con la inducción de los genes para el PDGF.

Existen numerosos ejemplos de la inducción transitoria del PDGF en respuesta a mediadores fisiológicos que estarían presentes en sitios de daño, como factores de coagulación, **TGF- β** liberados de plaquetas y **Mos/M δ s** activados y **TNF- α** . Las concentraciones fisiológicas de trombina y de factor X activado, son dos productos de la cascada de coagulación que incrementan la producción del PDGF más de nueve veces. La liberación del PDGF es observada 1.5 h después de la adición de trombina previa inducción de transcritos PDGF A- y B, los cuales son máximos a las 4 h. Esta liberación no disminuye cuando se inhibe la síntesis de proteínas (Sporn, M. 1990). Los datos sugieren que la trombina estimula la liberación del PDGF de bancos de almacenamiento intracelulares, o la conversión de un precursor a la forma activa.

El efecto de la trombina puede ser simulado por la exposición de células endoteliales a ésteres forbol (PMA); sin embargo, las eficacias relativas son diferentes: el PMA es más efectivo en inducir transcritos de la cadena A, mientras la trombina es más efectiva en incrementar los transcritos de la B. El TGF- β , por su parte, incrementa el ARNm de ambos. También la adición de TNF- α a cultivos de células endoteliales de vena umbilical de humano induce un incremento transitorio en la transcripción de las cadenas A y B del PDGF (Sporn, M. 1990).

En cultivos de fibroblastos ninguna de las cadenas A o B del PDGF están expresadas. Sin embargo, la adición de PDGF o el EGF inducen transitoriamente el ARNm del PDGF de cadena A y la liberación del PDGF al medio. La interleucina-1 (**IL-1**), una citocina liberada por **M δ s** activados, induce también la expresión transitoria de ARNm del PDGF de cadena A con la subsecuente liberación de PDGF-AA (Sporn, 1990).

La interacción del PDGF con sus receptores de superficie celular activa diferentes rutas intracelulares, iniciando una secuencia de eventos que dan lugar a la respuesta celular específica. Aún no está completamente elucidado cuáles de estos eventos son necesarios para inducir las

respuestas celulares que dan lugar al movimiento, contracción del músculo liso y progresión del ciclo celular. Sin embargo, se sabe que muchos de los eventos tempranos son consecuencia de la interacción receptor/PDGF y no del proceso de señalización. Actualmente, los mecanismos bioquímicos por los cuales estas respuestas pleiotrópicas se inducen son aún desconocidos (Sporn, M. 1990).

Es importante mencionar también la capacidad del PDGF para inducir la duplicación celular, la cual puede ser modificada por otros componentes en el ambiente extracelular, particularmente por los del plasma, que actúan de manera coordinada para promover una respuesta mitogénica óptima. De esta forma se ha propuesto que la mitogénesis se presenta en dos estadios: la inducción de "mantenimiento" por factores de crecimiento como el PDGF, seguidos de la "progresión" por la cual el ciclo celular es dependiente de los componentes del plasma. Por ejemplo, en ausencia de factores plasmáticos, las células 3T3 tratadas con PDGF detienen su crecimiento, sin embargo, los componentes activos del plasma en este sistema pueden ser reemplazados por EGF e IGFs (Sporn, M. 1990). Así, el requerimiento para la "progresión" parece ser dependiente del sistema celular y del medio de crecimiento.

La potencia mitogénica de las diferentes isoformas del PDGF depende del tipo celular y, paralelamente, de la capacidad de las células para unirse a las diferentes isoformas. Por ejemplo, las células 3T3 responden a las tres isoformas; en contraste, los fibroblastos humanos expresan bajos niveles de la subunidad α del receptor, uniéndose relativamente poco al PDGF-AA. Sin embargo, se cree que el PDGF-AA no es intrínsecamente menos mitogénico que el PDGF-BB, y que la pobre estimulación puede reflejar diferencias cuantitativas en el número de los sitios de unión, más que en las actividades de los receptores (Pierce, G. 1991).

La detección de los receptores de alta afinidad para el PDGF se limita a células de tejido conjuntivo como fibroblastos dérmicos, células del músculo liso vascular, células gliales y condrocitos. Esta restricción en el tipo celular coincide con la habilidad de las células para

responder mitogénicamente al factor. Sin embargo, las células epiteliales y endoteliales también responden. El PDGF estimula la síntesis de ADN tanto en células mesoteliales de humano como en islotes de Langerhans de rata (Sporn, M. 1990).

Además de estimular directamente la proliferación de un gran número de células, el PDGF parece amplificar la respuesta proliferativa de otras células induciendo la expresión de genes que actúan sinérgicamente. En células mononucleares y neutrófilos este factor ha demostrado ser un quimiotáctico, pero no un mitógeno. En **Mos** la inducción de quimiotaxis es controversial ya que éstos pueden reflejar diferentes subpoblaciones de células y/o diferencias en los receptores de PDGF responsables de la migración (Sporn, M. 1990).

En procesos de depósito y remodelación del tejido conjuntivo, el PDGF tiene una importante implicación clínica. Éste estimula la síntesis de colágena, particularmente (Canalis, E. 1981, Owen, A. 1982) la tipo V y regula la cantidad de la tipo III vs. tipo IV sintetizada por fibroblastos gingivales (Narayanan, A. 1983). La expresión y secreción de trombospondina, otra proteína de matriz extracelular, es también modulada por este factor (Majack, R. 1985, 1987). En los fibroblastos dérmicos de humano, el PDGF estimula positivamente, y en 3 veces más la actividad colagenolítica (Chua, C. 1985), la cual es detectada de 8 a 10 h postexposición al factor.

La dualidad del PDGF, para estimular tanto la secreción de componentes de matriz extracelular, así como de enzimas capaces de degradarla, son eventos importantes en la alteración del entorno celular, en la preparación del movimiento celular y la mitosis, en procesos normales como el desarrollo y la reparación de una herida, así como también en condiciones patológicas como la artritis, la cirrosis hepática, la escleroderma, la formación de adherencias peritoneales y la arteriosclerosis.

El PDGF en la reparación de heridas en un modelo murino ha demostrado inducir la proliferación celular de tejido conjuntivo, la síntesis de ADN y el depósito de colágena, alrededor de las cámaras con PDGF colocadas subcutáneamente (Grosstendorst, G. 1985). Estudios similares en

animales diabéticos con una reparación deficiente de heridas, mostró que el daño es restaurado al aplicárles PDGF (Lawrence, W. 1986). Además, la combinación de TGF- β , EGF y PDGF en estas cámaras demostró un efecto sinérgico entre los factores, al igual que el PDGF parcialmente purificado con geles de colágena colocado en cámaras subcutáneas (Lynch, S. 1987). La combinación del IGF-1 con el PDGF puro mostró aumentar en 2.4 veces la formación de nuevas capas de tejido conjuntivo, así como el engrosamiento de la epidermis en un 95% comparado con los controles. En estos experimentos también se observó que el IGF-1 por sí sólo no causa cambios morfológicos significativos, o que la combinación de PDGF con el EGF produce un engrosamiento solo epidermal. Estos resultados indicaron acciones sinérgicas de otros factores con el PDGF en la modulación de la reparación de las heridas.

También el PDGF está relacionado con la proliferación de células sinoviales en la artritis reumatoide, y por lo tanto, con la formación del *pannus*, de la fibrosis y con muchos aspectos de la enfermedad. En la sinovitis crónica hay un incremento en los receptores de PDGF en asociación con un aumento del MHC DR y **Los T** (Rubin, K. 1988 a y b). Hamerman et al. han determinado la presencia del PDGF en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Así, la posible estimulación celular proliferativa parácrina y autócrina bajo estas circunstancias puede ser importante en dicha enfermedad fibroproliferativa asociada con la inflamación crónica.

Otra enfermedad que se ha asociado con una alta concentración de PDGF es la escleroderma, en la cual hay un incremento en el depósito de tejido conjuntivo alrededor de los vasos sanguíneos. Takehara, encontró que el suero de pacientes con escleroderma presenta un incremento de la actividad mitogénica para fibroblastos al compararlo con el de los controles, demostrando que aproximadamente el 70% de la actividad presente en el suero se debió al PDGF, ya que neutralizaron dicho efecto al emplear anticuerpos anti-PDGF.

Es interesante resaltar la participación del PDGF y del TGF- β a través de un estudio realizado en pacientes con cáncer sometidos a inmunoterapia intraperitoneal con IL-2 y en

voluntarios sanos. Donde fluídos de los sobrenadantes de leucocitos de sangre periférica de los pacientes tratados con IL-2 incrementaron la incorporación de ^3H -timidina en monocapas de fibroblastos NIH3T3, seis veces más que los medios de cultivos de leucocitos sin IL-2. Los mediadores elaborados por **Los** de sangre periférica (**LoSP**) tratados con IL-2 indujeron la expresión de ARNm de procolágena tipo I y de fibronectina en los fibroblastos del peritoneo. La producción de colágena fue 2 veces mayor en los sobrenadantes de fibroblastos tratados con los sobrenadantes de LosP previamente sometidos con IL-2, que en los sobrenadantes de LosP en ausencia de IL-2 o células alimentadas con medio. Es importante observar que al someterse los fibroblastos con IL-2 no se incrementó la producción de la colágena. La expresión de genes para las citocinas reveló que los ARNm que codifican para el TGF- β y PDGF-B se expresaron en **LoSP** sometidos con IL-2 (Kovacs, E. 1993).

Estas observaciones sugirieron que la excesiva producción de tejido conjuntivo en estos pacientes sometidos a inmunoterapia peritoneal pueden ser resultado de la liberación de citocinas por los **LoSP** tratados con IL-2 o por células residentes de la cavidad peritoneal. Pero debido a que se han observado una gran cantidad de adherencias en postinmunoterapia intraoperitoneal, se asume que el efecto que ocurre en la cavidad abdominal se debe a la cercanía de los M ϕ s y fibroblastos al sitio de daño. Así, como por la secreción parácrina de citocinas derivadas de los M ϕ s, los cuales inducen la proliferación de fibroblastos y la producción de colágena. Además, los factores de crecimiento producidos por los fibroblastos pueden actuar de manera autócrina para estimular la proliferación. Tomando en cuenta que las macromoléculas de la cavidad peritoneal se difunden de forma más lenta que en la circulación sistémica, los fibroblastos residentes se exponen a estos mediadores por periodos prolongados. Un ejemplo de este mecanismo se presenta en la Figura 8.

Apoyándose en el estudio anterior, el mismo grupo de investigadores determinó el papel de la IL-2 en cultivos de M ϕ s peritoneales. Los resultados mostraron que la expresión de los ARNms

para el PDGF-A y B fue de 2 a 6 veces mayor en las células tratadas con IL-2 con respecto a las control. Además, este incremento fue tiempo y dosis dependiente. Para determinar la expresión de las cadenas A y B del PDGF secretadas al sobrenadante, éstos se colectaron y analizaron por Western-blot. Los resultados mostraron una acumulación espontánea de PDGF A y B en todos los sobrenadantes. Sin embargo, la proteína PDGF-B se expresó de 2 a 16 veces más en el sobrenadante de MøS tratados con IL-2 vs los no tratados; mientras que la cadena A del PDGF expresó de 2 a 8 veces más en las células tratadas (Kovacs, E. 1994). Lo anterior sugiere que la IL-2 induce PDGF, el cual podría jugar un papel crítico en la formación de adherencias peritoneales.

Así, el papel del PDGF en procesos fibrosantes como es el caso de numerosas patologías en piel, pulmón, médula espinal y adherencias peritoneales está basado en la presencia de células capaces de secretar e interactuar con el factor. Aún cuando cada uno de estos procesos demuestren características histológicas diferentes, el común denominador de todos ellos es la respuesta fibroproliferativa, consistente en la infiltración celular inflamatoria, la proliferación de células mesoteliales, así como la acumulación de colágena, y la presencia de MøS, células inflamatorias predominantes después del daño, las cuales al activarse secretan PDGF, que constituye el principal mitógeno para los fibroblastos.

CASCADA TEMPRANA CASCADA TARDÍA

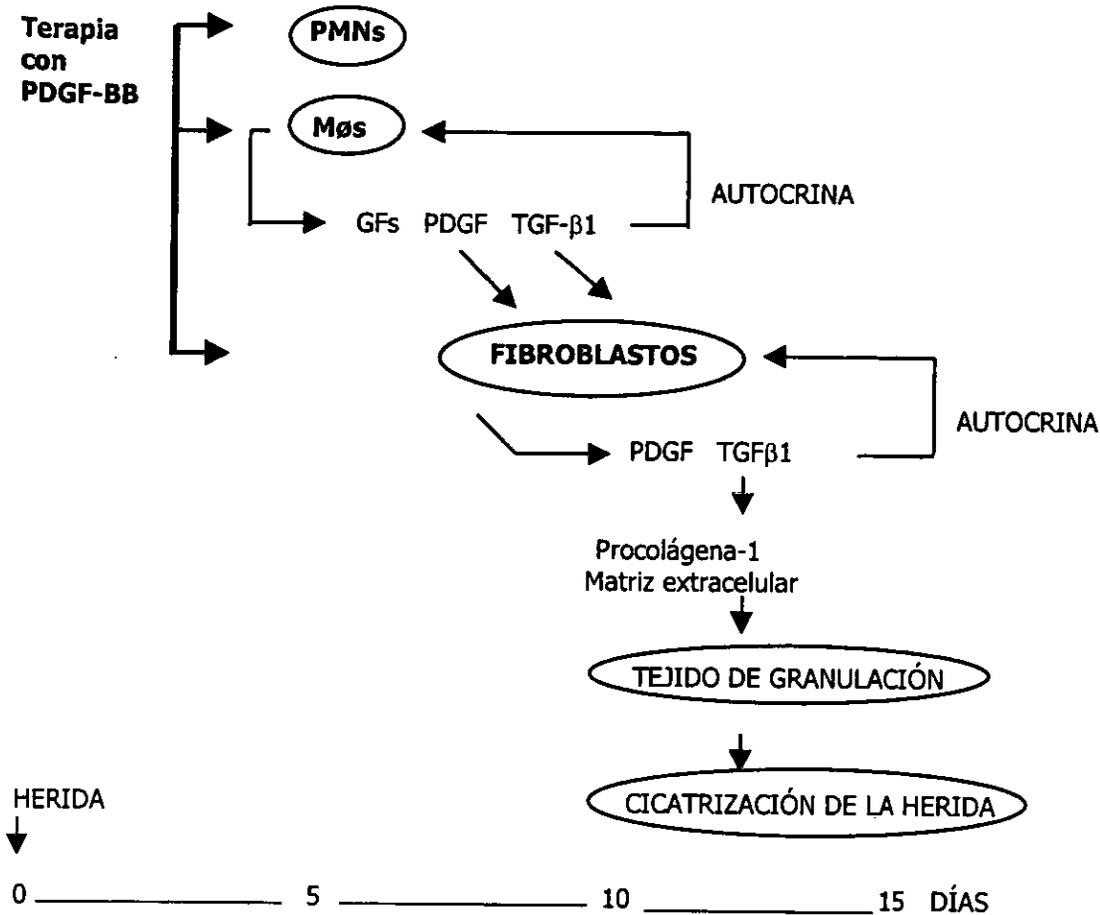


FIGURA 8. Mecanismo de acción del PDGF-BB exógeno en heridas dérmicas. El PDGF-BB aumenta la fase inflamatoria aguda, incrementando la cascada de actividades que inducen el depósito de MEC en la fase de reparación de heridas. GFs, factores de crecimiento; PMNs, leucocitos polimorfonucleares (Pierce, G. 1991).

TÉCNICAS QUIRÚRGICAS, COMPUESTOS Y FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA PREVENCIÓN DE LAS ADHERENCIAS PERITONEALES

A) LAPAROSCOPIÁS

Dentro de las técnicas quirúrgicas para la prevención de adherencias peritoneales, las laparoscopías pueden ser de las mejores, ya que éstas se realizan con movimientos mínimos dentro del peritoneo en comparación con otras técnicas como las laparotomías, originando menos sitios de daño entre las superficies de los órganos y los intestinos, no obstante aún se siguen formando adherencias postoperatorias (Jansen R. 1988).

B) FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS Y BARRERAS

Se han realizado una gran cantidad de estudios en animales para identificar agentes y técnicas que prevengan la formación de adherencias peritoneales, proporcionando datos que apoyen el uso clínico de los **fármacos antiinflamatorios** y el uso de **barreras** para la prevención de adherencias. Los fármacos anti-inflamatorios se evaluaron porque éstos pueden limitar la inflamación, reduciendo la liberación de exudado fibrinoso en el sitio de la cirugía. De las dos clases se han examinado; los corticoesteroides y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

B.1) CORTICOESTEROIDES

Los resultados del uso de corticoesteroides en modelos experimentales para la formación de adherencias intraperitoneales generalmente no han sido favorables; además, el empleo clínico postoperatorio es limitado por sus propiedades farmacológicas, incluyendo inmunosupresión y la demora de la reparación de la herida, aunque se ha reportado una reducción significativa después de formada la adherencia con el uso de soluciones intraperitoneales que contienen esteroides, del grupo de los glucocorticoides (Cohen, 1983). Por ejemplo, la acción protectora de las micropartículas biodegradables con dexametasona (DEX) administradas intraperitonealmente

reducen tanto la incidencia como la severidad de las adherencias en un modelo en rata (Hockel, M. 1987). Sin embargo, los resultados de diversas investigaciones son aún contradictorios.

B.2) FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)

Los **AINES** son una clase de compuestos que modifican el metabolismo del ácido araquidónico en una variedad de tejidos, algunos actúan alterando las actividades de la enzima ciclooxigenasa y la formación de sus productos finales, incluyendo prostaglandinas y tromboxanos. Los metabolitos del ácido araquidónico son producidos por los PMNs y Møs presentes en el sitio de inflamación o pueden ser resultado de la agregación de plaquetas, y son los mediadores de muchos aspectos de la respuesta inflamatoria postquirúrgica (diZerega, G. 1994).

B.3) EL USO DE BARRERAS

Actualmente, se sabe que el uso de las barreras reduce las adherencias previniendo la formación de acúmulos de fibrina entre los tejidos dañados (diZerega, G. 1994). Estas barreras son disponibles tanto en formas líquidas como en sólidas, se aplican directamente en el sitio de la cirugía, cubriendo el peritoneo en forma general o en un sitio específico. Dentro de las barreras **líquidas** se encuentran el Hyskon™; (Pharmacia Uppsala, Sweden) y las soluciones cristaloides, y en las barreras **sólidas** se encuentran el Interceed™ (WL Gore Co., Flagstaff, Arizona, USA) y el Preclude™ (Johnson and Johnson Medical Inc., Arlington, Texas, USA).

B.3.1) LAS BARRERAS LÍQUIDAS

Entre las más usadas para reducir la formación de las adherencias se encuentran las **soluciones cristaloides**, como el *lactato de Ringer*, el *amortiguador de fosfatos salino* o la *solución salina normal*, las cuales son depositadas al final del procedimiento quirúrgico (diZerega, G. y Campaeu, J. 1994). La absorción del agua y electrolitos es rápida en la cavidad peritoneal, por ejemplo: 500 ml de una solución fisiológica es absorbida en menos de 18 horas, es decir de 30-37 ml por hora. Debido a que la remesotelización después de una cirugía toma de 5 a 8 días, los

cristales se absorben antes del proceso de depósito de fibrina y la formación de la adherencia aún no se completa, se sustenta que éstos pueden reducir su formación (diZerega, G. 1992).

Se dispone de una gran cantidad de datos clínicos para delinear el posible beneficio de los cristaloides en la prevención de adherencias. Durante la década de los 80s, varios estudios clínicos fueron publicados, en los cuales se comparó el uso del dextrán con los cristaloides para prevenir la formación de adherencias (diZerega, G. 1983; Rosenberg, S. 1984; Larsson, B. 1985). La combinación de estos estudios mostró una tasa de reformación de adherencias de aproximadamente 80%. La elevada tasa se confirmó en un estudio donde se compararon diferentes modalidades de tratamiento tales como DEX, prometacina, dextrán y una solución de lactato de Ringer. El primer grupo consistió de 396 mujeres con infertilidad a las cuales se les realizó laparotomía para corregir quirúrgicamente anormalidades tubales, ováricas, uterinas o peritoneales. De este primer grupo se obtuvieron 4 subgrupos, el subgrupo 1 recibió 20 mg de DEX intravenosa (Decadron) y 25 mg de prometacina intramuscular (Phenergan) y 200 ml de dextrán 70 al 32 % (Hyskon™), el subgrupo 2 recibió prometacina y 200 ml de dextrán 70 al 32 % (Hyskon™) de manera similar al subgrupo 1, el subgrupo 3 fue tratado con 200 ml de Hyskon™ en la cavidad pélvica antes de cerrar y al subgrupo 4 se le depositaron 400 ml de solución de lactato de Ringer. El segundo grupo consistió en 546 mujeres con infertilidad a quienes se realizó una laparoscopia para tratar alguna enfermedad pélvica. Este grupo se subdividió en tres subgrupos: el primero en el que se emplearon 200 ml de Hyskon™ dentro de la pelvis luego de la laparoscopia; al segundo se le administraron 400 ml de una solución de lactato de Ringer mezclada con 1 mg de hidrocortisona y 2500 U de heparina; y el tercer subgrupo recibió una solución de lactato de Ringer en la cavidad pélvica al concluir la laparoscopia. A las pacientes que fracasaron para concebir se les realizó una segunda laparoscopia, donde al compararse la preñez y la formación de adherencias entre los grupos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, es decir todas las pacientes que no concibieron presentaron adherencias peritoneales. Esto permitió concluir que los

glucocorticoides, la prometacina, la heparina y el Hyskon™ no proporcionaron ventajas terapéuticas sobre la solución de lactato de Ringer en la prevención de la formación de adherencias peritoneales (Fayez, J. 1987).

Reportes más recientes describen el uso de soluciones cristaloides para reducir la formación de adherencias después de una laparoscopia ovárica. Un estudio utilizó de 300 a 500 ml de solución salina en la cavidad peritoneal después de una coagulación laparoscópica de la superficie ovárica en pacientes con ovarios poliquísticos. Se comparó el tratamiento a base de cristaloides, o sin ellos y no se observó diferencia en la incidencia de adherencias (17% contra 19%, respectivamente) (Naether O. 1993). En otro estudio se aplicaron 150 ml de lactato de Ringer dentro de la pelvis después de una laparoscopia electrocautérica o vaporización laser en la superficie ovárica en pacientes con ovarios poliquísticos, donde el 82% llegó a presentar adherencias (Gaugan, T. 1991). De lo anterior, se infiere que el uso de estas soluciones no previene la formación de las adherencias.

Existen también otras limitaciones de las soluciones salinas incluyen el manejo de grandes volúmenes en la cavidad peritoneal, ya que influyen en una secuela de condiciones patológicas. Por ejemplo, el inoculo de 1 a 10ml en la cavidad peritoneal aumenta el porcentaje de mortalidad de *Escherichia coli* de un 20% a un 60% y es mayor en un intervalo de 1 a 6 horas en animales que reciben un inoculo bacterial de 30 ml. Así, se reporta que un volumen intraperitoneal entre 200 y 400 ml de solución salina después de una cirugía aumenta aun más el porcentaje de mortalidad de *Escherichia coli* por el tiempo que permanece ésta en la cavidad peritoneal. (diZerega, G. 1983). Es decir, el depositar grandes volúmenes de solución salina intraperitonealmente reduce substancialmente la habilidad del hospedero a eliminar infecciones.

El dextrán es un polímero de glucosa hidrosoluble usado originalmente como un expansor

de plasma. Éste puede ser manufacturado en una variedad de pesos moleculares; sin embargo, la mayoría de las investigaciones en las adherencias peritoneales utilizan el polímero de 70 000 D (**Hyskon™**; Pharmacia, Uppsala, Sweden). El mecanismo de acción del dextrán en la prevención de adherencias pélvicas postquirúrgicas es aún desconocido (diZerega, G. 1996).

Un estudio multicéntrico para determinar la efectividad del dextrán en la prevención de adherencias pélvicas postoperatorias en mujeres infértiles en edad reproductiva (entre los 18 y 35 años) sometidas a cirugía para corregir una enfermedad de la tuba uterina distal, una endometriosis o adherencias pélvicas, consideró la aplicación de 250 ml de dextrán 70 en una solución al 32% de dextrosa (n=55) o una solución salina (n=47) dentro de la porción independiente de la pelvis. Después de 8 a 12 semanas la laparoscopia se realizó sólo a aquellas pacientes con infertilidad. Las que recibieron dextrán 70 redujeron el número de adherencias observadas en la laparotomía inicial (26 de 51 para el dextrán 70 vs 12 de 40 para la solución salina).

El efecto postadministración del dextrán fue una ascitis (acumulación de líquido en la cavidad peritoneal), la cual provee un baño de flotación separando las superficies epiteliales durante los estadios iniciales de la reparación postoperatoria. Los resultados obtenidos mostraron una disminución en el número de adherencias formadas en la porción de dicho mecanismo de hidrofloculación, donde se apoya la pelvis. Así, al aplicarse el dextrán existe tejido flotante que no se coloca en aposición directa por largos periodos de tiempo, donde la re-epitelización puede ocurrir, sin la formación de los puentes de fibrina y las adherencias subsecuentes. De lo anterior se puede concluir que los beneficios del dextrán solo se limitan a reducir las adherencias en porciones dependientes de la pelvis y no así en sitios abdominales superiores.

Otros estudios clínicos en pacientes con infertilidad, sometidos a un proceso quirúrgico, reportaron que no en todos los casos se encuentra la misma eficiencia del dextrán en la eliminación de la adherencia. Por ejemplo, estudios realizados en Escandinavia y Finlandia no

mostraron diferencias entre los grupos tratados y los control (Larsson, B. 1985; Jansen, R. 1988), igualmente no se reportaron beneficios en la adición de 100 a 200 ml de Hyskon™ en los puntos de adherencias de las siguientes laparoscopías (Jansen, R. 1985).

Los usos clínicos del Hyskon™ están asociados a beneficios transitorios y ascitis. El compuesto puede producir una autolimitación e incremento transitorio en los niveles de transaminasa sérica postoperatoria. La complicación clínica mas común después de su uso es el edema vulvar, y con menos frecuencia la expansión pleural. Adicionalmente, se ha reportado que la administración intravenosa de dextrán puede prolongar el tiempo de coagulación, así como producir un "shock" anafiláctico o síntomas alérgicos. Por otra parte se ha observado que un pequeño porcentaje de pacientes tratados intraperitonealmente también presentan estos efectos secundarios (diZerega, G. 1994).

B.3.2) LAS BARRERAS SÓLIDAS

Entre las barreras sólidas más utilizadas se encuentra el **Interceed (TC7)** (Johnson Medical Inc., Arlington, Texas, USA), inicialmente llamado Surgicel, un material absorbible de celulosa oxidada reconstituida que, originalmente fue usado como hemostático. El mecanismo consiste en depositarlo en el cuerpo para transformarse en una masa de gelatina que es absorbida en unos días. Muchas evaluaciones en modelos animales de adherencias, por ejemplo el de trauma cecal en rata (Queralt, C. 1987), el de modelos de isquemia peritoneal y de trauma peritoneal múltiple (Rafferty, A. 1980), así como en modelos de cuernos uterinos en conejo (Nishimura, K. 1983; Galan, N. 1983; Shimanuki, T. 1987) mostraron reducir la incidencia de las mismas. Sin embargo, Yemini, M. demostró que el Surgicel junto con otras modalidades no reducían las adherencias cecales en rata (Yemini, M. 1984). Otros trabajos demostraron que el Surgicel no ofrecía ventajas sobre el control después de estandarizar el corte del cuerno uterino de conejo (Soules, M. 1982).

Asimismo, se observó que el Surgicel prevenía mejor la formación de adherencias en

modelos de conejos (Linsky, C. 1987; Diamond, M. 1987a), que en otros modelos como en rata, ratón y hámster. El TC7 o Interceed es un compuesto fabricado también de celulosa oxidada reconstituída, pero con un tiempo de residencia intraperitoneal más largo que el Surgicel (Diamond, M. 1991c). El TC7 persiste durante los estadios críticos de reepitelización y, posteriormente, se reabsorbe en la cavidad peritoneal en un tiempo aproximado de 28 días. Se sostiene sobre el tejido sin suturas a través de la formación de enlaces hidrostáticos entre él y los sitios dañados por la cirugía. (Linsky, C. 1989).

La eficacia del TC7 se comprobó después de realizar cirugías tubo-ováricas, endometriosis y en adhesiolisis. Dentro de las cirugías ováricas se reportan varios estudios. Por ejemplo, el tratamiento quirúrgico en 52 pacientes con enfermedades ováricas bilaterales, consistió en un grupo control sin cubrir y otro tratado con TC7. En una segunda laparoscopia, se encontró que aproximadamente el doble de los ovarios cubiertos con TC7 vs los ovarios controles estuvieron libres de adherencias. Esta diferencia representó un 86 % de mejoría sobre el control, en la prevención de formación o reformación de adherencias (Franklin, R. 1995). Otros estudios también confirmaron resultados similares, en los que se reportó un 70% de reducción en adherencias ováricas (Larsson, B. 1995). Contrariamente, existen otros reportes que afirman la poca eficacia del TC7 al compararse con otros agentes como el dextrán en conejos (Best, C. 1991), o como la solución Ringer (Pagidas, K. 1992).

El **Gore-Tex (Preclude™)** (W. L. Gore Co. Flagstaff, AZ) es una membrana delgada de 0.1 mm de politetrafluoroetileno (PTFE), usada como un sustituto para el pericardio y actualmente se le conoce como Preclude™. Esta membrana tiene un tamaño de poro pequeño ($\leq 1 \mu\text{m}$) que inhibe la penetración celular, es antitrombogénica y no reactiva, se ancla dentro del cuerpo y no es absorbible (diZerega, G. 1996). En cirugía cardiovascular evitó la formación de adherencias cuando fue usada como sustituto pericardial (Minale, C. 1988; Revuelta, J. 1985). Sin embargo, las investigaciones con la membrana en modelos animales para cirugías ginecológicas mostraron

resultados contradictorios. Por ejemplo, un modelo en conejo con daño en la pared lateral/cuerno uterino produjo una reducción significativa en la formación de adherencias (Boyers, S. 1988). En otro modelo similar, se observó el efecto contrario (Goldberg, J. 1987).

Un estudio clínico en pacientes con infertilidad sometidas a una adhesiolisis para reducir las adherencias, comparó la eficacia del TC7 y la membrana Gore-Tex. A cada paciente se le realizó una lisis de las adherencias en las paredes laterales pélvicas, una se cubrió con TC7 y la otra con la membrana anclada. El tamaño del área cubierta por la adherencia se midió en una segunda laparoscopia después de 1 a 6 semanas encontrando una marcada reducción en las adherencias por ambas barreras (85% y 66% respectivamente) (diZerega, G. 1996). Aunque las dos membranas mostraron ser seguras y con cierta eficacia en estudios clínicos en humanos, su uso no eliminó las adherencias en todos los pacientes. Es importante enfatizar que el empleo de estas barreras no es un sustituto de las técnicas quirúrgicas establecidas. Aún cuando los métodos de barrera sean la herramienta más efectiva para la prevención de reformación de adherencias (Luciano, A. 1995), su uso está limitado a situaciones quirúrgicas donde el área en cuestión puede ser cubierta completamente. La aceptación de las barreras por los médicos está restringida por las dificultades técnicas que incluyen la hemostasia y eliminación del fluido peritoneal excesivo (TC7), así como por las técnicas de fijación de la membrana (Preclude).

5. ANTECEDENTES

LA COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA (CLG-PVP) UNA NUEVA PROPUESTA EN LA PREVENCIÓN DE LAS ADHERENCIAS PERITONEALES.

Debido a que las técnicas quirúrgicas, compuestos y fármacos, no han conseguido resultados ampliamente satisfactorios, ya que no evitan la progresión de la fibrosis, sugerimos la evaluación de la **clg-PVP** que previamente ha demostrado tener efectos moduladores sobre el metabolismo de la colágena, la inflamación, la cicatrización y la hemostasia.

Este medicamento es la mezcla irradiada de colágena tipo I de origen porcino y polivinilpirrolidona (PVP), en una solución amortiguadora de citratos que estabiliza el pH. Para los experimentos realizados se empleó la siguiente formulación:

ÁSPID, S.A. DE C.V.

Solución inyectable

Cada 1 ml. Contiene:

Clg-PVP.....1.3 mg

Equivalente a 8.3 mg de colágena

Vehículo c.b.p. 1 ml

La clg-PVP está indicada en pérdidas cutáneas, úlceras, quemaduras de 2º y 3º grado, áreas donadoras de injerto, heridas accidentales, raspones y abrasiones, así como sitios de sutura debido a sus propiedades hemostáticas y cicatrizantes. Puede aplicarse junto con antibióticos en caso de infección.

La colágena administrada por vía intramuscular, cutánea o subcutánea se metaboliza de la misma manera que la colágena endógena, al degradarse en el espacio extracelular, principalmente por medio de las enzimas colagenolíticas. Los péptidos generados son rápidamente metabolizados por las enzimas gelatinasas y posteriormente por otras enzimas inespecíficas, dando como subproductos oligopéptidos y aminoácidos libres. Dada la fuente de obtención de la colágena empleada en la clg-PVP y su antigenicidad característicamente baja, se considera un material prácticamente inocuo, excepto en pacientes que manifiesten hipersensibilidad a la proteína. Por su parte, la PVP es un polímero inerte no metabolizable que se excreta principalmente por vía urinaria

(95%) en un período menor a 24h.

Particularmente la clg-PVP participa directamente en los procesos reparativos de la piel y de otros tejidos. Lo anterior se ha demostrado durante el tratamiento de heridas quirúrgicas en ratas Wistar, donde la clg-PVP aplicada intralesionalmente induce un incremento del tejido de granulación hasta el día 7 posterior a la cirugía y una mejor arquitectura tisular que el proceso normal desde el día 14, esto incluye la presencia de anexos cutáneos (glándulas sebáceas y folículos pilosos) y un arreglo en la disposición de las fibras de colágena similar al de la piel normal (Kröttsch-Gómez, FE, 1993).

Por otro lado se ha evaluado la actividad de la clg-PVP sobre el metabolismo de la colágena en cultivos celulares de fibroblastos y Mø's murinos. Los resultados mostraron que la actividad del fármaco es diferente de la expresada por sus componentes por separado, la colágena tipo I y la PVP. Así, su efecto sobre la síntesis de la colágena en cultivos de fibroblastos, mostró un incremento hasta del 150 % con respecto al control; mientras que la actividad colagenolítica en este mismo tipo celular disminuyó hasta el 30 %. En cuanto a la actividad degradativa mediada por la colagenasa de los Mø's, ésta se incrementó hasta un 100%, prácticamente en todas las concentraciones probadas (2, 4, 8 y 10%). Además, se observaron efectos cooperativos inducidos por el medicamento, tanto en la síntesis como en la degradación de la colágena en ambas estirpes celulares, al cultivar los fibroblastos en presencia de los medios condicionados de los Mø's, previamente expuestos al medicamento y viceversa. Cabe señalar que los efectos que se presentaron tanto en los Mø's como en los fibroblastos, fueron un reflejo de la actividad que tiene el medicamento sobre las células, ya que en los ensayos de la incorporación de timidina, no hubo diferencias significativas en la proliferación celular con respecto al control. Estos resultados sugieren la participación de la clg-PVP en el incremento del recambio de la colágena, lo cual favorece la reestructuración del tejido dañado (Kröttsch-Gómez FE, 1998).

También se ha demostrado que el fármaco participa en la remodelación de la fibrosis,

como en el caso de la contractura del tendón de Aquiles en niños con parálisis cerebral (PCI), donde un estudio realizado a 8 semanas con una aplicación intratendinosa semanal de 0.2 ml de clg-PVP, mostró buenos resultados en forma inmediata ya que se logró disminuir la contractura del tendón en 22 niños, con una amplitud del arco de movilidad del tobillo de 5° (4.5%), 10° (54.5%), 12° (4.5%), 15° (13.6%) y hasta 20° (22.7%), mientras que el grupo control constituido por 13 pacientes, presentó una disminución mínima en la contractura, de los cuales 9 (69.2%) no recuperaron ningún grado de movilidad y 4 (30.8%) recuperaron tan sólo 5°. Con el empleo del fármaco se logró llegar a la posición neutra, en los pacientes con PCI media y moderada, además se mejoró el patrón de marcha; y en la contractura severa y muy severa el arco de movilidad aumentó en una mayor proporción de 10° a 20° (Ruiz-Lozano, M. 1994).

Además, se ha demostrado su eficacia en la resolución de otros padecimientos fibrosantes dérmicos, tal es el caso de las cicatrices hipertróficas y queloides en humanos, donde fue aplicado en dosis de 0.2 ml por cada 5 cm de cicatriz, de forma intralesional y con frecuencia semanal durante un periodo máximo de 6 meses, o una terapia mixta, aplicado tres semanas antes y tres después de realizar una resección quirúrgica. La evaluación clínica e histológica incluyó parámetros tales como la disminución y eliminación del exceso de fibrosis de la cicatriz, siendo estos últimos junto con la normocromía los parámetros que más tiempo tardaron en resolverse. Los resultados mostraron que en un periodo de 4-6 meses el 25 % de los pacientes respondieron de manera satisfactoria, el 45 % moderada y el 30 % mínima. El grupo tratado con la terapia mixta solamente presentó recidiva de la cicatriz en el 26 % de los pacientes y siempre fue con un componente fibroso menor. En cuanto a los parámetros histológicos se observó una disminución en la cantidad de la colágena depositada y un arreglo de las fibras semejante al de la piel normal, disminución del infiltrado celular y corrección en el contorno epidérmico con presencia de apéndices cutáneos en áreas cicatrizales (Díaz de León, L. 1994).

Con respecto al mecanismo de acción del fármaco, se ha determinado que los

sobrenadantes de los cultivos de fibroblastos de la cicatriz queloide tratada con clg-PVP, presentan una disminución estadísticamente significativa del TGF- β 1, mientras que los niveles del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) se normalizan con respecto a los cultivos de fibroblastos de la piel normal (Kröttsch-Gómez FE; 1998).

En cuanto a los parámetros histológicos mediante la tinción histológica de Herovici se observó que las cicatrices hipertróficas fueron diferentes de la piel normal, ya que las papilas dérmicas se presentan aplanadas, mientras que en la piel normal éstas tienen crestas y valles. En los criocortes de las cicatrices las fibras de colágena tipo I presentaron un arreglo paralelo a la epidermis, mientras que en la piel normal su distribución es reticular; la colágena tipo III se reduce debajo de la epidermis y en la piel normal la proporción de la colágena tipo III es abundante en la dermis papilar. Interesantemente, el tratamiento de las cicatrices con clg-PVP produjo un arreglo de las zonas de colágena tipo I y III similar al de la piel normal y en algunos casos se observó la presencia de apéndices cutáneos.

Por otro lado, la evaluación de la expresión *in situ* de citocinas fibrogénicas proinflamatorias como la IL-1, TNF- α , TGF- β 1 y el PDGF en cicatrices hipertróficas revelaron más células inmunorreactivas que en la piel normal o en las cicatrices hipertróficas tratadas con clg-PVP, diferencia que fue estadísticamente significativa; mientras que en las cicatrices hipertróficas tratadas con clg-PVP los niveles de citocinas fueron similares o incluso más bajos que los de piel normal. Por otra parte, se evaluó la presencia de MACs como la VCAM1 y ELAM-1 encontrándose que en las cicatrices hipertróficas se expresaron de 10 a 15 veces más moléculas de adhesión que en la piel normal, mientras que en las cicatrices previamente tratadas con clg-PVP, ambas moléculas mostraron niveles similares a los del grupo de piel normal (Kröttsch-Gómez, FE; 1998).

6. HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes farmacológicos del medicamento y a que éste no ha presentado reacciones colaterales, se sugiere que el fármaco sea capaz de inducir la remodelación de las fibrosis peritoneal y modular la inflamación asociada a esta patología, a través de un aumento en la actividad colagenolítica, disminuyendo la producción de proteínas de matriz extracelular, principalmente colágena, en el sitio del daño, induciendo también un recambio de colágena tipo I por III. Así como una quimiotaxis menor de células mesenquimáticas e inflamatorias (**PMN's** **Mø's** y fibroblastos), disminuyendo la vascularización y la expresión de citocinas fibrogénicas como el **PDGF**, lo que modificaría la expresión de otras citocinas proinflamatorias que podrían actuar de manera sinérgica con este factor, por lo que en general favorecería directamente la disminución de la fibrosis peritoneal.

7. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar el efecto de la **clg-PVP** en la prevención de adherencias peritoneales inducidas por cirugía en un modelo murino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar histológicamente la presencia de infiltrados inflamatorios, el grado de vascularización y la proporción de colágena tipos I y III en secciones del grupo control, y adherencias peritoneales inducidas por cirugía en ratas sin tratamiento y tratadas con **clg-PVP** a 1, 3 y 5 semanas.
- ❖ Evaluar inmunohistoquímicamente la presencia del **PDGF**, en secciones del grupo control, y adherencias peritoneales inducidas por cirugía en ratas sin tratamiento y tratadas con **clg-PVP** a 1, 3 y 5 semanas postcirugía.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño experimental consistió en la inducción de adherencias peritoneales en un modelo murino a través de un procedimiento quirúrgico y la evaluación del efecto de la **clg-PVP** en las adherencias obtenidas a diferentes tiempos de tratamiento. Las biopsias se sometieron a dos técnicas histológicas, donde se observó y cuantificó la presencia de infiltrados inflamatorios y la vascularidad, así como la relación de colágena tipo I y III. Para la detección del PDGF se realizó la técnica de inmunoperoxidasa en cortes por congelación. El diagrama de flujo experimental se muestra en la figura 9.

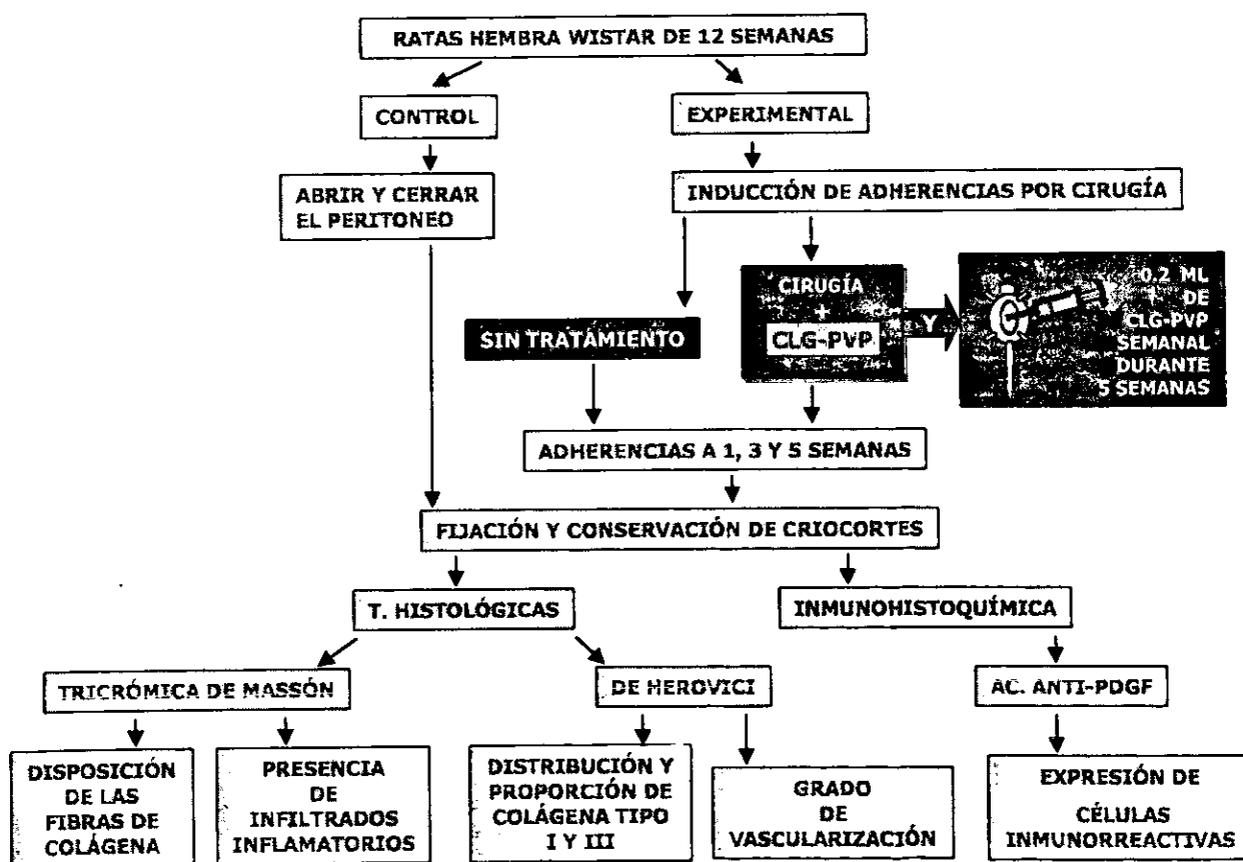


FIGURA 9. Diagrama de flujo experimental.

TÉCNICA QUIRÚRGICA PARA INDUCIR LAS ADHERENCIAS PERITONEALES EN UN MODELO MURINO

Para evaluar la participación de la **clg-PVP** en un modelo de adherencias peritoneales, se empleó una variante de la técnica descrita originalmente por Steinleitner para el hámster (Steinleitner, A. 1991), con el objetivo principal de estudiar distintos aspectos (fibrosis y tratamiento) en el campo de la reparación peritoneal y la formación de adherencias. (Holtz, F. 1984; Favez, A. 1987; Heany, A. 1993; Diamond, M. 1991).

- ❖ Para iniciar la cirugía, se anestesió al animal con kelamina-xilazina, la cual se administró por vía intramuscular 90 mg de ketamina/kg de peso corporal y posteriormente por vía intraperitoneal 10 mg de xilazina/kg de peso corporal.
- ❖ Después se efectuó la tricotomía, la antisepsia de la piel en la zona a intervenir y la técnica "limpia" (sin requerir condiciones de quirófano).
- ❖ Posteriormente se llevó a cabo la laparotomía media baja de aproximadamente 2 a 3 cm de longitud, se incidió la piel y continuó una disección roma del plano muscular en la línea alba hasta el peritoneo (Figura 10 A).
- ❖ Una vez que se realizó la incisión en el peritoneo en la misma dirección que la piel y se visualizaron los genitales internos, se efectuó la ligadura en ambos extremos del cuerno uterino derecho utilizando hilo nylon 6-0 (Figura 10 B).
- ❖ Se escindió el cuerno uterino derecho y se abrió longitudinalmente, a continuación se dividió en cuatro fragmentos (de aproximadamente 2X2 mm a 5X5 mm) (Figura 10 C).
- ❖ Los segmentos se emplearon como autoinjertos, suturándolos al mesenterio del cuerno uterino y sobre una cuña realizada en el ovario izquierdo con hilo nylon 6-0 (Figura 10 D y E).
- ❖ Finalmente, se colocó **clg-PVP** esponja como hemostático y se cerró la pared abdominal en 2 planos con sutura absorbible de ácido poliglicólico ó polidioxanona 4-0, aplicando sobre la herida una solución de iodopovidona o violeta de genciana.

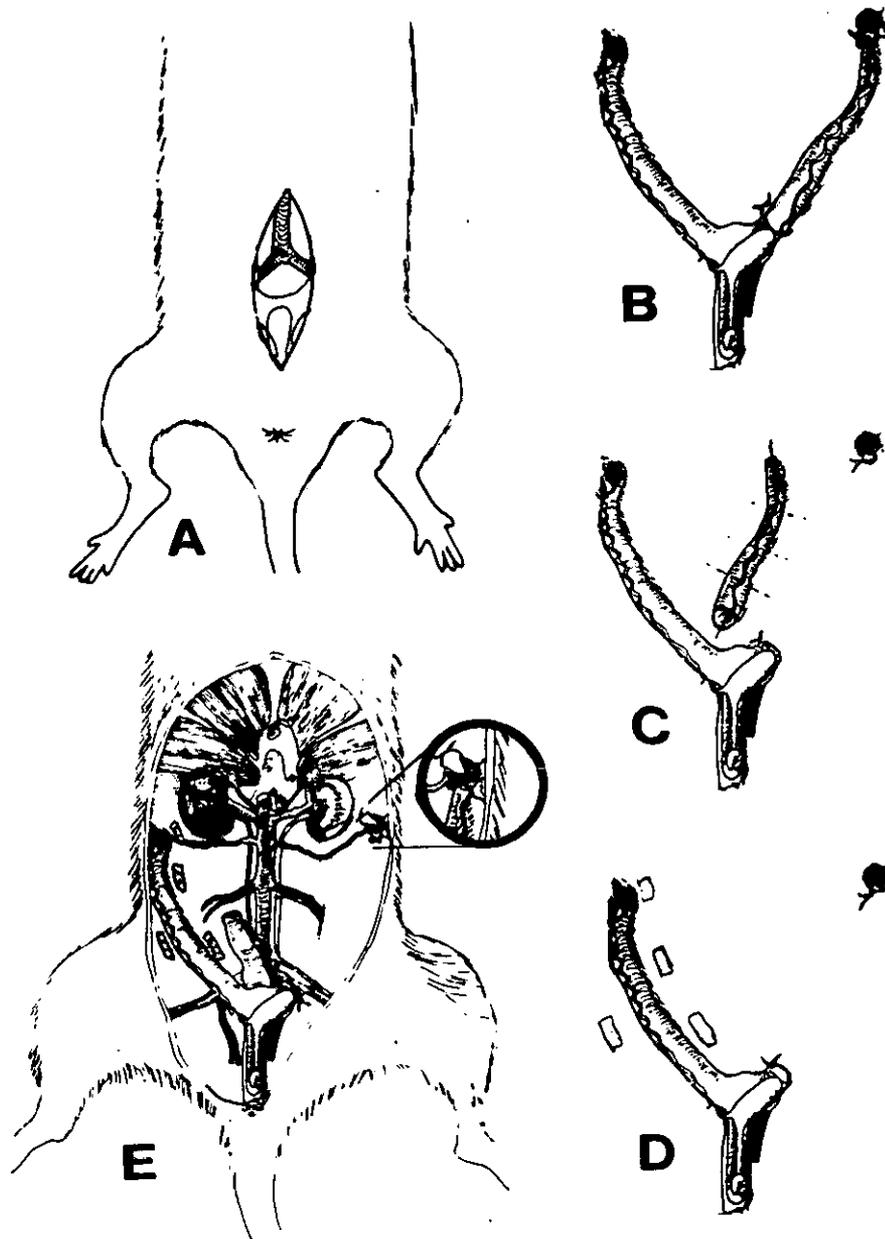


FIGURA 10 A-E. Técnica quirúrgica para la Inducción de las adherencias peritoneales en ratas.

OBTENCIÓN DE BIOPSIAS Y GRUPOS DE ESTUDIO

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar (de 12 semanas de nacidas) las cuales tuvieron un peso aproximado de 200-220g.

Los grupos de estudio realizados fueron tres: el control (abrir y cerrar), fueron ratas a las que tan solo se abrió y cerró el peritoneo y 2 grupos a los que se les indujeron las adherencias a través de cirugía: un subgrupo de ratas con adherencias sin tratamiento y otro subgrupo de ratas tratadas con una inyección intraperitoneal semanal de 0.2 ml **clg-PVP** durante 5 semanas (Tabla 2).

Las biopsias se obtuvieron de la región de la pared abdominal posteriormente, se congelaron en nitrógeno líquido durante 5 minutos y se conservaron a -70°C

GRUPOS	PROCEDIMIENTO	# DE ANIMALES/ GRUPO
1. Control	abrir-cerrar	3 semanas n=1
2. Sin tratamiento	cirugía	1 semana n=1
		3 semanas n=2
		5 semanas n=3
3. Tratadas con clg-PVP	cirugía	1 semana n=1
		3 semanas n=1
		5 semanas n=3

TABLA 2. Grupos experimentales, procedimiento realizado y tiempo de obtención de biopsias en cada uno de ellos.

El número de biopsias peritoneales analizadas fue el siguiente: del grupo abrir-cerrar 6; de los grupos no tratados a 1 semana 6; a 3 semanas 6; y a 5 semanas 9 y de los tratados con **clg-PVP** a 1 semana 6; a 3 semanas 6; y a 5 semanas 9 secciones.

Las biopsias congeladas se cortaron en un crióstato en secciones de 4-5 μm , se depositaron en portaobjetos recubiertos con silano (solución de γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano [Sigma], al 2% en acetona) y se fijaron en acetona absoluta a -20°C

Los criocortes se analizaron microscópicamente después de realizarse las tinciones histológicas e inmuohistoquímicas.

DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LOS TEJIDOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

La descripción histológica se realizó a través de tres características observadas y empleadas como parámetros, para determinar si se había o no formado una fibrosis en los tejidos: la distribución de las fibras de colágena, que podían disponerse de forma *paralela, compacta o a manera de haces gruesos u ovillos*. Otra característica histológica observada fue el infiltrado inflamatorio, el cual se diferenció en *escaso, moderado o abundante*, además se identificó si éste fue *perivascular o intersticial* y la vascularidad se estableció al igual que los infiltrados como *escaso, moderado o abundante* (Tabla 3).

PARÁMETRO OBSERVADO	CARACTERÍSTICA HISTOLÓGICA
Distribución de fibras de colágena.	Paralela, compacta o a manera de haces gruesos u ovillos.
Infiltrado inflamatorio	Escaso, moderado o abundante; y si éste fue de tipo perivascular o intersticial.
Vascularidad	Escasa, moderada o abundante.

TABLA 3. Características histológicas dependiendo del parámetro histológico observado.

DETERMINACIÓN DE INFILTRADOS INFLAMATORIOS EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

La determinación de infiltrados se realizó a través de un estudio doble ciego de todas las laminillas de los grupos experimentales, estas observaciones se llevaron a cabo por triplicado en cada grupo.

Los resultados se expresaron a través de un sistema de conteo con la asignación de números relativos, con su respectiva descripción en la Tabla 4.

NÚMERO RELATIVO	TIPO DE INFILTRADO INFLAMATORIO
0	Ausencia
1	Escasos
2	Ligeros
3	Moderados
4	Abundantes.
5	Muy abundantes
6	Todo el tejido cubierto

TABLA 4. Sistema de conteo para determinar los infiltrados inflamatorios.

DETERMINACIÓN DE LAS PROPORCIONES RELATIVAS DE LAS COLÁGENAS TIPOS I Y III

La determinación de las proporciones relativas de colágena tipos I y III se realizó a través de un estudio doble ciego de todas las laminillas de los grupos experimentales, estas observaciones se llevaron a cabo por triplicado para cada grupo de estudio experimental.

Los resultados se expresaron a través de la relación de las colágenas tipos I y III (Tabla 5), elementos predominantes del tejido conjuntivo en desórdenes fibrosos.

RELACIÓN CLG TIPOS I Y III (■/□)	PROPORCIÓN DE CLG TIPO III EN EL TEJIDO	PROPORCIÓN DE CLG TIPO I EN EL TEJIDO
■■■■■■■	Zonas que abarcan 0/6	Zonas que abarcan 6/6
■■■■■/□	Zonas que abarcan 1/6	Zonas que abarcan 5/6
■■■■/□□	Zonas que abarcan 2/6	Zonas que abarcan 4/6
■■■/□□□	Zonas que abarcan 3/6	Zonas que abarcan 3/6
■■/□□□□	Zonas que abarcan 4/6	Zonas que abarcan 2/6
■/□□□□□	Zonas que abarcan 5/6	Zonas que abarcan 1/6

TABLA 5. Sistema para determinar las proporciones relativas de colágena tipos I y III.

CUANTIFICACIÓN DE HACES VASCULARES

La cuantificación de haces vasculares se realizó a través de un estudio ciego en el que primero se contó el número de campos observados a 100x de todo el tejido; obteniéndose así el número de campos. Posteriormente se cuantificó el número de vasos sanguíneos entre el número de campos observados en cada tejido y en cada grupo de estudio. Todas las observaciones se llevaron a cabo por triplicado.

DETERMINACIÓN DE CÉLULAS INMUNORREACTIVAS AL ANTICUERPO ANTI-PDGF EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

La identificación de células inmunorreactivas al anticuerpo anti-PDGF se realizó a través de un estudio doble ciego de todas las laminillas de los grupos experimentales, en dos tejidos por cada

grupo de estudio a un aumento de 100X.

Al encontrarse en los resultados una exacerbada cantidad de células inmunorreactivas para el anticuerpo anti-PDGF, la determinación se realizó empleando un sistema para evaluar la densidad descrito en la Tabla 6.

DENSIDAD	DESCRIPCIÓN
–	No hay presencia de células inmunorreactivas.
X	Zonas con escasas células inmunorreactivas.
XX	Zonas con una moderada cantidad de células inmunorreactivas.
XXX	Zonas con abundantes células inmunorreactivas.
XXXX	Zonas con células inmunorreactivas que pueden llegar a abarcar la totalidad del tejido observado.

TABLA 6. Sistema para evaluar la densidad de células inmunoreactivas al anticuerpo anti-PDGF*

* Sistema previamente utilizado en estudios similares (Larson, B. 1982; 1995).

9. RESULTADOS

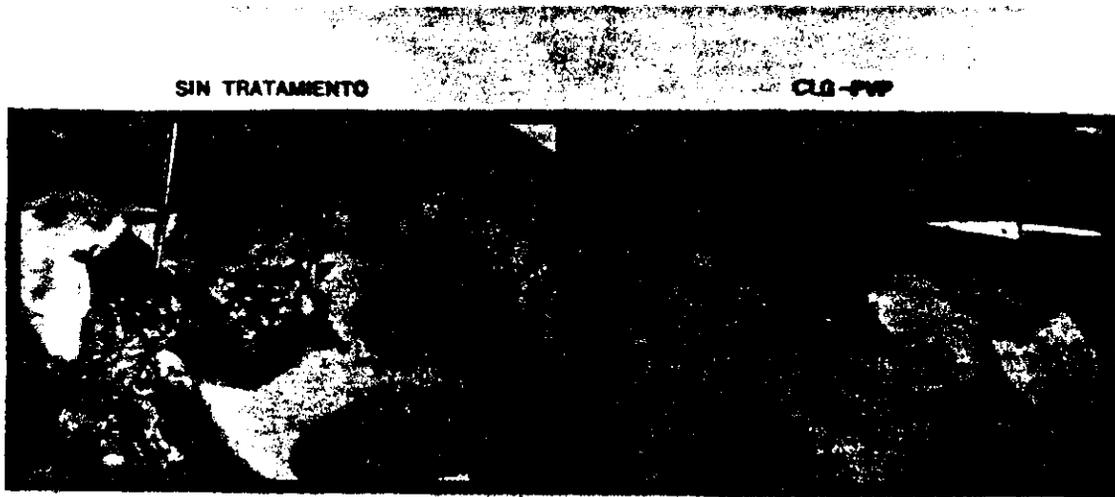


FIGURA 11. Visión macroscópica de las adherencias peritoneales formadas a las 5 semanas postcirugía en ratas sin tratamiento y tratadas con clg-PVP.

TINCIÓN HISTOLÓGICA TRICRÓMICA DE MASSÓN.

Las secciones del grupo control y de las adherencias sin tratamiento y tratadas con **clg-PVP** fueron teñidas según la tinción de Massón. Esta tinción histológica se caracteriza por teñir los diferentes tipos de colágena en diversos tonos de azul, y las células e infiltrados inflamatorios en rojo. Los resultados mostraron en las secciones del grupo control (CTRL) una distribución reticular de las fibras de colágena tipo I y III así como un moderado infiltrado inflamatorio. En las adherencias sin tratamiento se presentaron abundantes infiltrados inflamatorios durante las 5 semanas de evaluación (Tabla 7), además, las fibras de colágena se observaron muy compactas y de distribución paralela a diferencia del control (Figura 12). En lo que respecta al grado de vascularización, los tejidos de las ratas sin tratamiento presentaron un gran número de vasos sanguíneos (Gráfica 1) con infiltrados perivasculares (Figura 12). Interesantemente, las secciones de las adherencias tratadas con **clg-PVP** (Figura 13) mostraron una disposición de las fibras de colágena similar a los de los controles a lo largo del tratamiento; la vascularidad disminuyó con respecto a las adherencias sin tratamiento y además mostraron ausencia de infiltrados celulares perivasculares e intersticiales con respecto al tiempo de tratamiento.



FIGURA 12. Tinción histológica tricrómica de Massón en secciones del grupo control (CTRL) y en las adherencias sin tratamiento a 1, 3, 4 y 5 semanas postcirugía. Los diferentes tipos de colágena se tiñeron en diversos tonos de azul y los infiltrados inflamatorios en rojo. (200X).

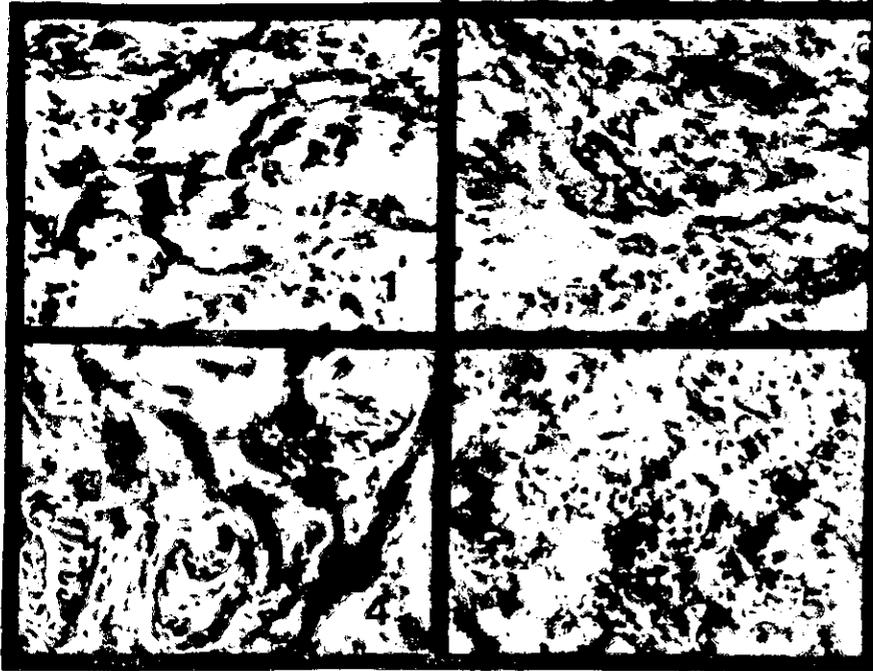


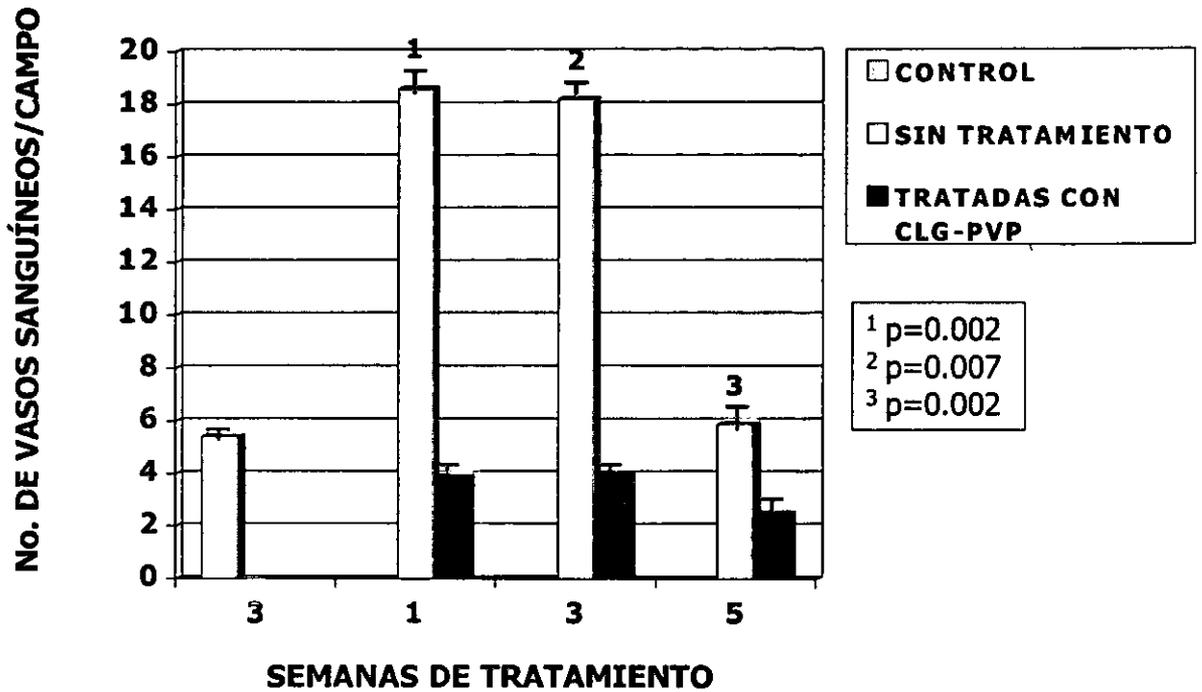
FIGURA 13. Tinción histológica tricrómica de Massón en secciones del grupo control (CTRL) y en las adherencias tratadas con clg-PVP a 1, 3, 4 y 5 semanas postcirugía. Los diferentes tipos de colágena se tiñeron en diversos tonos de azul y los infiltrados inflamatorios en rojo. (200X)



GRUPO	INFILTRADOS INFLAMATORIOS		
	1 ^a	3 ^a	5 ^a
Semanas			
Control		2	
Adherencias sin tratamiento	6	5	5
Adherencias tratadas con clg-PVP	5	5	0

TABLA 7. Infiltrados inflamatorios en secciones del grupo control, y en las adherencias sin tratamiento y tratadas con clg-PVP a 1, 3 y 5 semanas postcirugía. I.I.:Infiltrados Inflamatorios. La escala para cada tipo de infiltrado inflamatorio se asignó a través de los siguientes números relativos: 0: Sin I.I.; 1: Escasos I.I; 2 Ligeros I.I; 3 Moderados I.I; 4: Abundantes I.I; 5: Muy abundantes I.I; 6: Todo el tejido cubierto por I.I.

VASCULARIZACIÓN



GRÁFICA 1. Grado de vascularización observados en secciones del grupo control (CTRL), y en las adherencias sin tratamiento y tratadas con clg-PVP a 1, 3 y 5 semanas postcirugía.

TINCIÓN HISTOLÓGICA DE HEROVICI.

Para determinar la distribución y relación de colágena tipos I y III, se realizó la tinción de Herovici, que permite teñir las fibras de colágena tipo I en rojo y las tipo III en azul. Las adherencias sin tratamiento fueron diferentes a las de los controles (Figura 14 CTRL); las fibras de colágena tipo I (rojo en la Figura 14) se presentaron en forma de haces gruesos u ovillos que abarcaron casi la totalidad del tejido. Mientras la colágena tipo III (fibras azules) se encontraba prácticamente ausente a lo largo del tiempo (Tabla 8). En tanto que en las secciones del grupo control, el arreglo de la colágena tipo I fue característicamente reticular y la colágena tipo III fue más abundante que en las secciones de las adherencias sin tratamiento (Tabla 8). Interesantemente, los cortes de las adherencias tratadas con **clg-PVP** (Figura 15) mostraron similitud con el grupo control en relación a la colágena tipo I y III a lo largo del tratamiento. En cuanto al grosor de las adherencias, éste fue mayor en las no tratadas y menor en las tratadas con **clg-PVP** en la última semana de evaluación (Figura 14 [5] y 15 [5]).

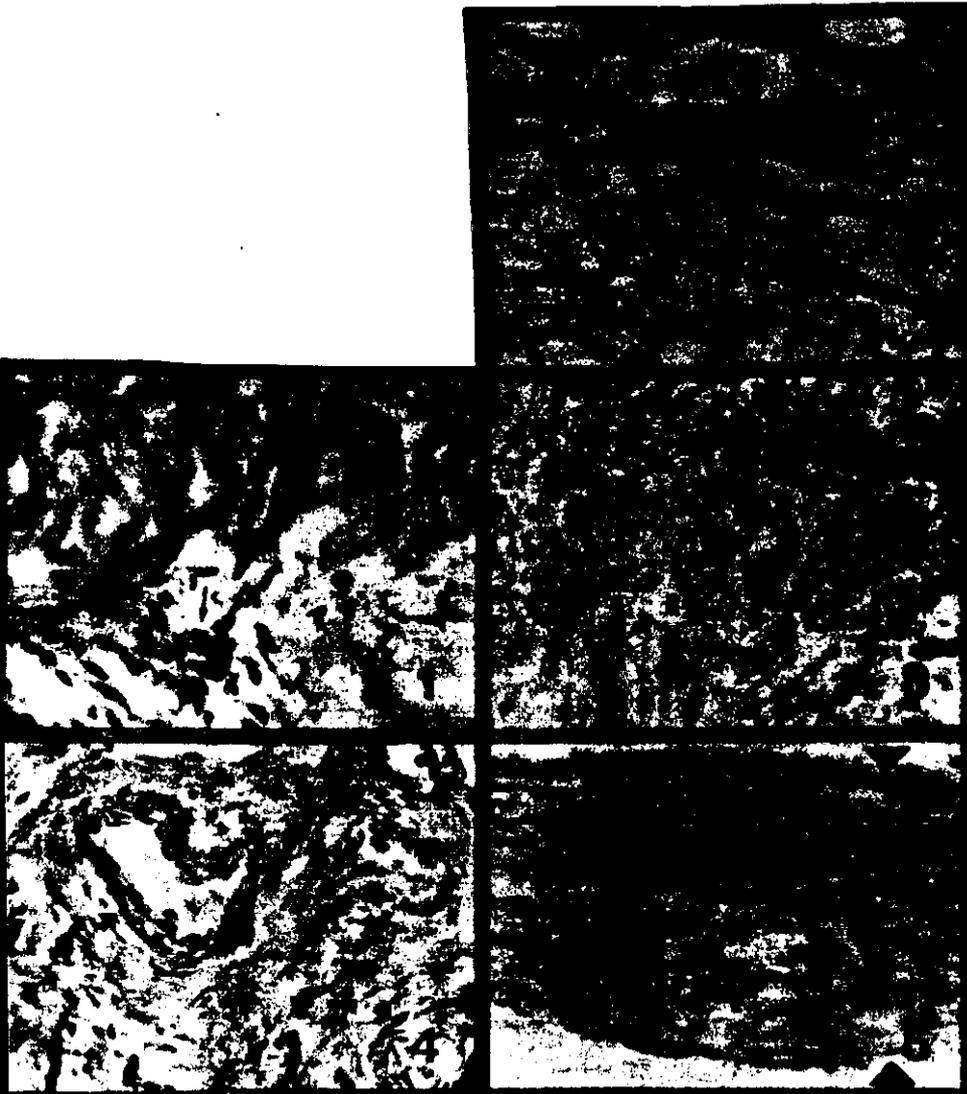


FIGURA 14. Tinción histológica de Herovici en secciones del grupo control (CTRL) y en las adherencias sin tratamiento a 1, 3, 4 y 5 semanas postcirugía. La colágena tipo I corresponde a las fibras teñidas en rojo y la tipo III a las fibras teñidas en azul. La ★ indica haces gruesos de colágena tipo I, las → indican zonas de infiltrado inflamatorio, las ➔ indican haces vasculares y las ▼▲ indican el grosor de la adherencia. (200X).

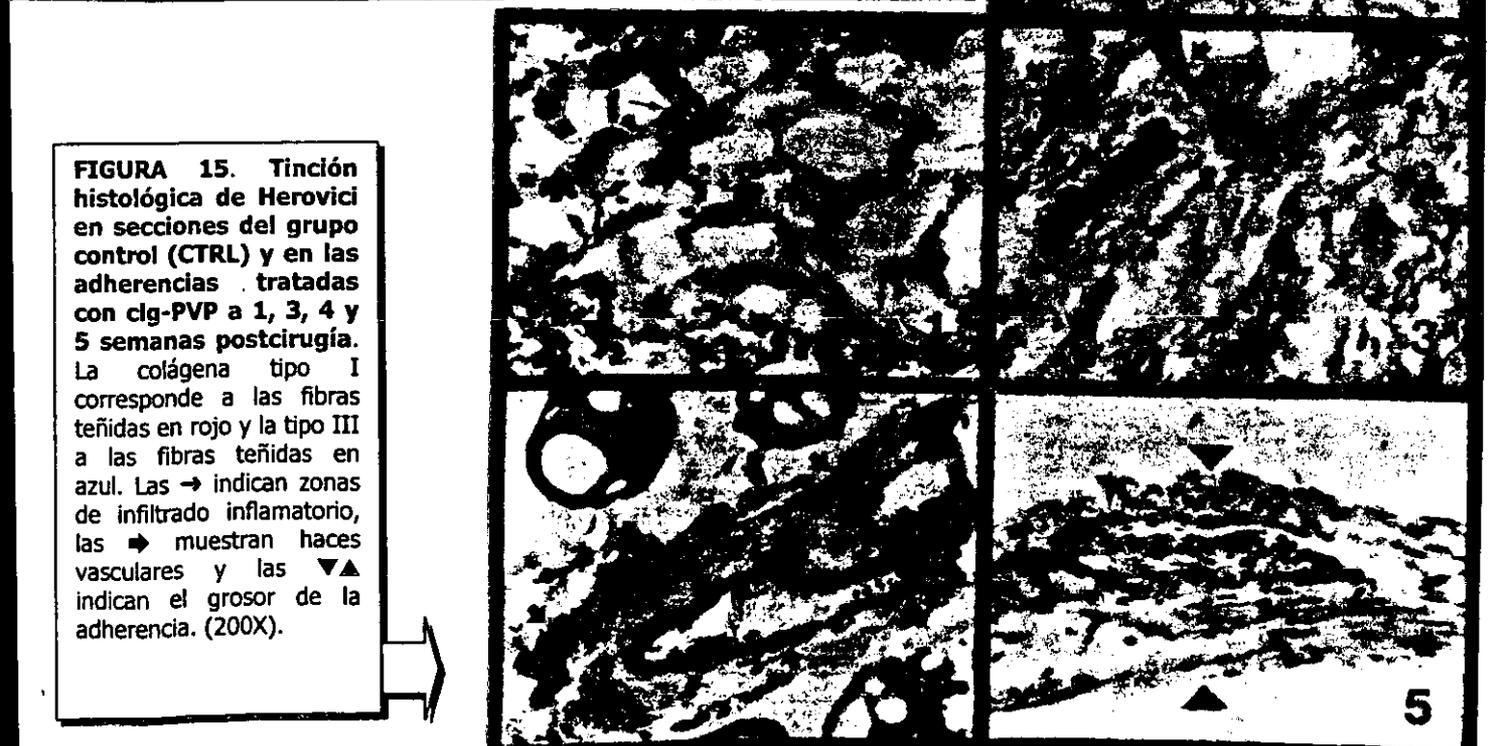


FIGURA 15. Tinción histológica de Herovici en secciones del grupo control (CTRL) y en las adherencias tratadas con clg-PVP a 1, 3, 4 y 5 semanas postcirugía. La colágena tipo I corresponde a las fibras teñidas en rojo y la tipo III a las fibras teñidas en azul. Las → indican zonas de infiltrado inflamatorio, las ➔ muestran haces vasculares y las ▼▲ indican el grosor de la adherencia. (200X).

GRUPO	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS			
TIEMPO:SEMANAS	1 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
CONTROL		<p>La distribución de las fibras de clg tipo I fue característicamente reticular al igual que la tipo III. ■■■■/□□ Los infiltrados inflamatorios se presentaron de manera moderada al igual que la vascularidad</p>		
ADHERENCIAS SIN TRATAMIENTO	<p>La distribución de la clg tipo I se presentó en forma de haces gruesos u ovillos. ■/□□□□ Los infiltrados inflamatorios se presentaron abundantemente, al igual que la vascularidad.</p>	<p>La distribución de las fibras de clg tipo I fue compacta. ■■/□□□□ Los infiltrados inflamatorios fueron abundantes al igual que la vascularidad.</p>	<p>La distribución de las fibras de clg tipo I fue compacta. ■■■/□□□ Los infiltrados inflamatorios fueron abundantes y de localización perivascular así como intersticial. En cuanto al grado de vascularización se observó un gran número de vasos sanguíneos en todo el tejido.</p>	<p>La distribución de las fibras de clg tipo I fue compacta. ■■■■/□□ Los infiltrados inflamatorios fueron abundantes en todo el tejido al igual que el número de vasos sanguíneos. El grosor de la adherencia fue mayor con respecto a las adherencias tratadas.</p>
ADHERENCIAS TRATADAS CON CLG-PVP	<p>La distribución de las fibras de clg tipo I fue típicamente reticular al igual que la tipo III. ■■■■/□□ Los infiltrados inflamatorios se presentaron de manera moderada al igual que la vascularidad.</p>	<p>La distribución de las fibras de clg tipo I fue característicamente reticular al igual que la tipo III aumentando la proporción de la última. ■/□□□□ Los infiltrados inflamatorios fueron escasos. Los vasos sanguíneos se presentaron de forma obliterada.</p>	<p>La distribución de las fibras de clg tipo I fue reticular al igual que la tipo III. ■■/□□□□. Los infiltrados inflamatorios fueron escasos; al igual que el número de vasos sanguíneos, en los cuales se observó ausencia de infiltrados perivascuales e intersticiales.</p>	<p>La distribución de las fibras de clg tipo I fue reticular. ■■/□□□□ Los infiltrados inflamatorios fueron escasos; al igual que la vascularidad. El grosor de la adherencia fue menor con respecto a las adherencias sin tratamiento.</p>

TABLA 8. Características histológicas en secciones del grupo control (CTRL), y las adherencias sin tratamiento y tratadas con clg-PVP a 1, 3, 4 y 5 semanas postcirugía. La proporción de colágena tipos I y III esta indicada en 6/6. Cada ■ equivale a 1/6 de colágena tipo I y cada □ equivale a 1/6 de colágena tipo III.

ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DEL PDGF. Se llevó a cabo en los criocortes de las adherencias con y sin tratamiento, a través de la reacción de inmunoperoxidasa indirecta. El PDGF expresado mostró diferencias entre los grupos de estudio. Las secciones de las adherencias sin tratamiento (Figura 16) mostraron más células con este mediador que las secciones del grupo control o las de adherencias tratadas con **clg-PVP** (Gráfica 2). En las secciones de adherencias sin tratamiento observamos que la inmunorreactividad de las células examinadas se asoció frecuentemente a la presencia de focos de infiltrados inflamatorios (Figura 16). Las adherencias tratadas (Figura 17), expresaron niveles similares o más bajos que las secciones del grupo control, en las que se observaron niveles basales de células inmunorreactivas (Figura 16).

Figura 16. Expresión del PDGF en secciones del grupo control (CTRL) y en las adherencias sin tratamiento a 1, 3, 4 y 5 semanas postcirugía. La expresión de células inmunorreactivas está determinada por la presencia de gránulos color café. La → indica células inmunorreactivas y la ⇨ indica zonas de células inmunorreactivas asociadas a focos de infiltrados inflamatorios. (200X).



Figura 17. Expresión del PDGF en secciones del grupo control (CTRL) y en las adherencias tratadas con clg-PVP a 1, 3, 4 y 5 semanas postcirugía. La expresión de células inmunorreactivas está determinada por la presencia de gránulos color café. La → indica células inmunorreactivas. (200X).

GRUPO	DENSIDAD DE CÉLULAS INMUNORREACTIVAS AL ANTICUERPO ANTI-DGF		
	1 ^a	3 ^a	5 ^a
Semanas			
Control		XX	
Adherencias sin tratamiento	XXXX	XXXX	XXX
Adherencias tratadas con clg-PVP	X	X	XX

GRÁFICA 2. Densidad de células inmunorreactivas al anticuerpo anti-PDGF en secciones del grupo control, y en las adherencias no tratadas y tratadas con clg-PVP a 1, 3 y 5 semanas postcirugía. —:No hay presencia de células inmunorreactivas; **X**: Zonas con escasas células;inmunorreactivas; **XX**: Zonas con una moderada cantidad de células inmunorreactivas; **XXX**: Zonas con abundantes células inmunorreactivas; **XXXX**: Zonas con células inmunorreactivas que pueden llegar a abarcar la totalidad del tejido observado.

GRUPO	SIN TRATAMIENTO/CLG-PVP		
	SEMANAS DE TRATAMIENTO		
	1ª	3ª	5ª
INFILTRADOS INFLAMATORIOS	↑↑↑↑↑↑/↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑/↑↑↑↑↑	↑↑↑↑↑/-
HACES VASCULARES	↑↑↑↑↑/↑	↑↑↑↑↑/↑	↑↑↑/↑
COLÁGENA TIPO I Y III	↑↑↑↑↑/↑↑	↑↑↑↑/↑↑↑↑↑	↑↑/↑↑↑↑
CÉLULAS INMUNORREACTIVAS AL ANTICUERPO ANTI-PDGF	↑↑↑↑/↑	↑↑↑↑/↑	↑↑↑/↑↑

TABLA 9. Resumen de resultados en las secciones de adherencias sin tratamiento y tratadas con clg-PVP a 1, 3 y 5 semanas.

10. DISCUSIÓN

Las adherencias peritoneales se originan como respuesta al daño del mesotelio, el cual induce la síntesis de mediadores solubles tales como el PDGF y el TGF- β , secretados por las células peritoneales residentes y leucocitos del infiltrado inflamatorio (Kovacs, E. 1994). Estos factores estimulan la proliferación de fibroblastos y el depósito de colágena, produciendo una alteración permanente de la arquitectura tisular peritoneal (Fraizer-Jenssen, M 1993).

Debido a que las adherencias peritoneales, fundamentalmente, se inician a partir de procesos inflamatorios cuyo mecanismo efector es el desarrollo de fibrosis, se evaluó la participación de un biofármaco que es la mezcla de colágena purificada tipo I de origen porcino con PVP, que ha demostrado tener efectos fibrolíticos y antifibróticos en procesos fibrosantes dérmicos, tales como la cicatriz hipertrófica (Krötzsch-Gómez, FE. 1998) y la escleroderma (Furuzawa-Carballeda, J. 1998). Además, regula negativamente la producción de citocinas y factores de crecimiento tales como IL-1, TNF- α y PDGF, así como de MACs ELAM-1 y VCAM-1, por lo que en consecuencia inhibe el proceso inflamatorio (Krötzsch-Gómez, FE. 1998).

Así, en el modelo preventivo de formación de adherencias peritoneales murinas, estudiamos diferentes parámetros de la inflamación, tales como la presencia y tipo de infiltrados inflamatorios, el grado de vascularización, la proporción relativa de colágena tipo I y III y la inmunodetección del PDGF (Tabla 9). Los resultados de la determinación y asociación de los infiltrados inflamatorios obtenidos de la histología mostraron, en las secciones del grupo que no recibió tratamiento, la presencia de un infiltrado celular abundante hasta la 5ª semana, mientras que en el tratado con **clg-PVP** éste fue escaso y disminuyó de forma dependiente del tiempo.

Por otro lado, las adherencias no tratadas se encontraban vascularizadas desde la 1ª hasta la 5ª semana, mientras que las tratadas se mantuvieron sin cambio y en todos los casos con un número menor de vasos que las primeras. Con respecto a la proporción de colágena tipo I y III, los cortes de las secciones del grupo no tratado presentaron una disminución de la clg tipo III y un

aumento en la tipo I, mientras que en las tratadas se observó un aumento en la clg tipo III y una disminución en la tipo I desde la 1ª semana de tratamiento, siendo similares al control en la 5ª semana. Finalmente, se detectó que sólo en las adherencias tratadas con el biofármaco había una menor cantidad de células inmunorreactivas en todos los tiempos analizados con respecto al grupo sin tratamiento. Los resultados anteriores sugieren que el tratamiento con este fármaco es capaz de modular el recambio de la MEC del peritoneo y la inflamación asociada a esta patología.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos con las técnicas quirúrgicas como laparotomías y laparoscopías se ha observado que nuestra estrategia terapéutica es más eficaz pues aún empleando técnicas quirúrgicas específicas se siguen formando las adherencias postoperatorias (Jansen, R. 1988). En cuanto a los fármacos antiinflamatorios, los corticosteroides (Cohen, B. 1983) en el empleo clínico postoperatorio es limitado por sus propiedades farmacológicas que incluyen la inmunosupresión y la demora de la reparación de la herida. En lo que se refiere a corticosteroides biodegradables como la DEX han mostrado mejores resultados reduciendo la severidad de las adherencias (Hockel, M 1987). Sin embargo, las diversas investigaciones son aún contradictorias. El uso de barreras líquidas (Hyskon) y las soluciones cristaloides (amortiguador de fosfatos y soluciones salinas) parecen tener mejores resultados, debido a que la barrera líquida crea un baño de flotación entre las superficies epiteliales y reduce las adherencias, pero únicamente en porciones dependientes de la pelvis y no en sitios abdominales superiores (Di Zerega, G. 1983). Dentro de las barreras sólidas el TC7 y el Preclude son las herramientas más efectivas para la prevención de adherencias, pero el TC7 genera ciertas dificultades en la hemostasia y la eliminación del fluido peritoneal excesivo; y el Preclude para la fijación de la misma en el sitio de daño (Di Zerega, 1996).

Por su parte, el empleo de la **clg-PVP**, proporciona un nuevo horizonte terapéutico curativo y preventivo para la fibrosis peritoneal, debido a que es un fármaco entre cuyas propiedades intrínsecas se encuentran la de ser fibrolítico y antifibrótico, modulador de la inflamación y por

contener colágena y PVP quizá sea capaz de generar un baño de flotación entre las superficies epiteliales de manera transitoria. Además, este biofármaco no ha generado reacciones colaterales, ni secundarias adversas, y su uso y aplicación resultan ser muy sencillas aún en el periodo postoperatorio.

Con base en los resultados obtenidos sugerimos un posible mecanismo de acción de la **clg-PVP** en la prevención de adherencias peritoneales (Figura 18). Éste se caracteriza primordialmente por inducir una disminución en los infiltrados inflamatorios, citocinas (PDGF) y posiblemente MACs; que reducen el reclutamiento y quimiotaxis de células mesenquimáticas; por un decremento de la proliferación de las mismas, lo que a su vez descende la síntesis de MEC (principalmente colágena), que finalmente induce la disminución de la fibrosis peritoneal a corto tiempo.

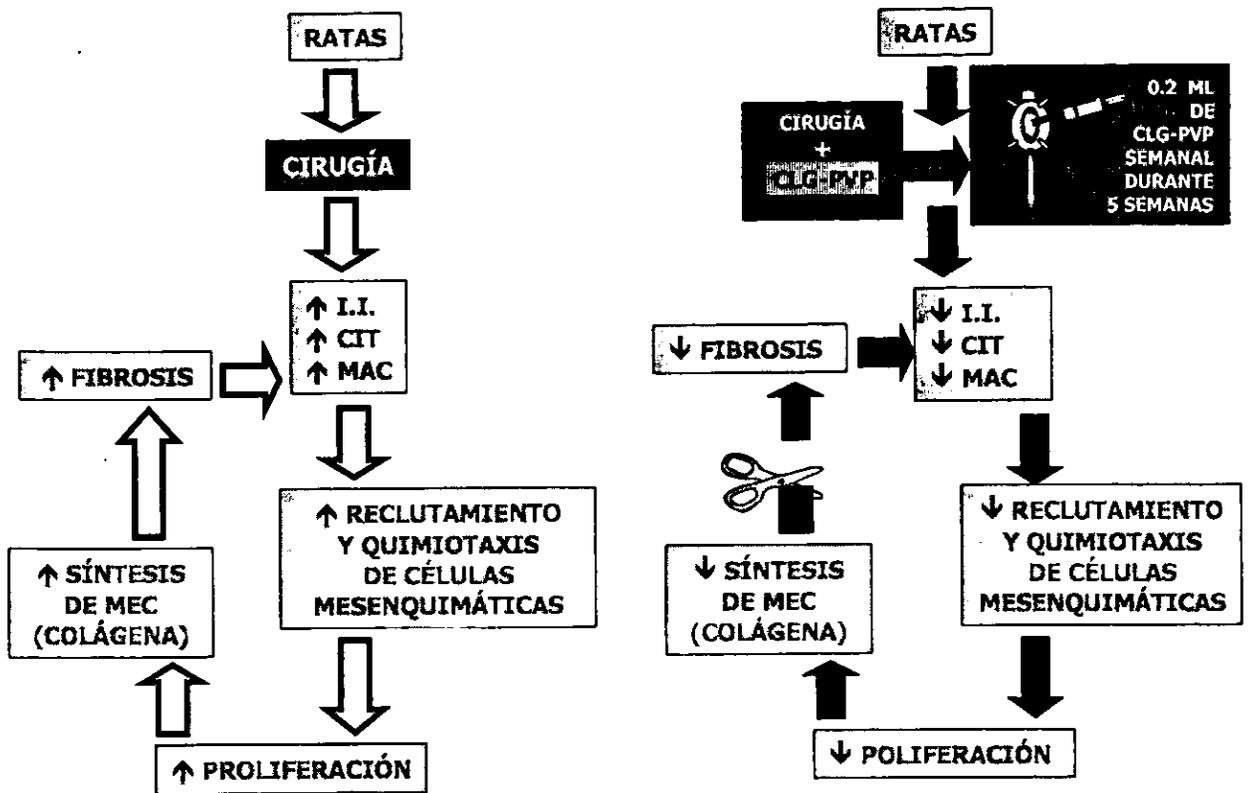


FIGURA 18. Posible efecto mecanístico de la clg-PVP en la prevención de las adherencias peritoneales murinas. Las flechas claras indican el mecanismo seguido por las adherencias sin tratamiento y las flechas oscuras el seguido por las tratadas con **clg-PVP**. I.I.: infiltrados inflamatorios, CIT: citocinas (proinflamatorias y fibrogénicas), MAC: moléculas de adhesión celular, MEC: proteínas de matriz extracelular

11. CONCLUSIONES

- ❖ A través del análisis histológico e inmunohistoquímico, se detectó un patrón de respuesta diferencial a la reparación del daño en las adherencias sin y con tratamiento con el biofármaco.
- ❖ Del estudio comparativo se observó la disminución de los infiltrados inflamatorios y la vascularidad, la modificación en la disposición y la proporción de fibras de colágena tipos I y III; y además se determinó un menor porcentaje de células inmunorreactivas al anti-PDGF, en las adherencias tratadas vs no tratadas, donde el empleo de la clg- PVP arrojó resultados similares a los obtenidos en el grupo control.
- ❖ Con base en la información obtenida acerca de la abundancia de los infiltrados inflamatorios, el grado de vascularidad y de PDGF en las adherencias no tratadas, se puede proponer que la inflamación crónica asociada a la fibrosis que se observa, se debe posiblemente al reclutamiento de Mø y proliferación células residentes de la cavidad peritoneal, en la que también intervienen la liberación de citocinas que atraen fibroblastos al sitio de daño amplificando la respuesta inflamatoria y aumentando el depósito de proteínas de matriz extracelular. En cambio en las adherencias tratadas con el biofármaco se observa un proceso modulado, caracterizado por una disminución de los infiltrados inflamatorios, del depósito de colágena y de la producción de citocinas fibrogénicas particularmente PDGF, que disminuyen el reclutamiento de células mesenquimáticas, la proliferación de células efectoras y la síntesis de matriz extracelular, esto último tal vez asociado a un incremento en la degradación.
- ❖ Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugiere a la **clg-PVP** como una alternativa terapéutica en la prevención de la formación de adherencias peritoneales postquirúrgicas.

12. APÉNDICE

TINCIÓN HISTOLÓGICA TRICRÓMICA DE MASSÓN

La tinción histológica tricrómica de Massón se empleó fundamentalmente para observar la disposición de las fibras de colágena, la presencia de infiltrados inflamatorios y la arquitectura tisular.

Los pasos de la técnica tintorial se detallan a continuación.

Los tejidos:

- Se lavaron con agua destilada 3 minutos.
- Se sumergieron en alumbre férrico acuoso al 5 % 30 minutos a 50 °C.
- Se tiñeron con hematoxilina de Regaud 30 minutos a 50°C.
- Se lavaron con agua destilada.
- Se diferenciaron en ácido pícrico hasta que los eritrocitos adquirieron una coloración amarillo-verdosa (aproximadamente 40 minutos).
- Se lavaron en agua por 3 minutos.
- Se tiñeron con fuscina ácida durante 1 minuto.
- Se enjuagaron en agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante.
- Se sumergieron en ácido fosfomolibdico durante 5 minutos.
- Se retiraron del ácido sin lavar.
- Se tiñeron con azul de anilina durante 2 minutos.
- Se lavaron en agua destilada.
- Se sumergieron en ácido acético durante 2 minutos.
- Se deshidrataron en etanol al 50%, 70%, 80%, 96%, etanol-xileno y xileno durante tres minutos en cada uno.
- Finalmente se montaron en resina.

TINCIÓN HISTOLÓGICA DE HEROVICI.

La tinción histológica de Herovici se empleó para distinguir la distribución y relación de la colágena tipos I y III en los tejidos; donde: las fibras azules corresponden a la colágena tipo III y las rojas a la colágena tipo I (Herovici, C. 1963).

Los pasos de la técnica tintorial se detallan a continuación.

Los tejidos:

- Se tiñeron con una solución de azul celestino durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua.
- Se tiñeron con una solución de hematoxilina durante 5 minutos.
- Se lavaron con agua durante 15-30 minutos.
- Se tiñeron con amarillo metanilo durante 2 minutos.
- Se diferenciaron en una solución de ácido acético al 1% y se lavaron en agua.
- Se viró la tinción en una solución de Li_2CO_3 durante 2 minutos.
- Se sumergieron en una solución picropolicrómica durante 2 minutos.
- Se sumergieron en ácido acético al 1 % por 2 minutos.
- Se deshidrataron en etanol al 50%, 70%, 80%, 96%, etanol-xileno y xileno durante tres minutos en cada uno.
- Finalmente se montaron en resina.

TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA EN CORTES POR CONGELACIÓN PARA LA LOCALIZACIÓN DEL PDGF

Los pasos realizados en la inmunohistoquímica se detallan a continuación:

- Se realizaron criocortes de 4-6 μm de las biopsias peritoneales, los cuales se depositaron en laminillas previamente recubiertas con silano (solución de γ -metacriloxipropiltrimetoxisilano [Sigma], al 2% en acetona).
- Se fijaron los tejidos en acetona absoluta a -20°C durante 3 minutos.
- Se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución 9:1 de metanol y H_2O_2 al 30% durante 20 minutos.
- Se lavaron los portaobjetos en PBS al 0.01 M, pH 7.2 .
- Se eliminó el exceso del amortiguador.
- Se bloquearon los sitios de pegado inespecífico con leche descremada al 7%, incubando las laminillas durante 30 minutos en cámara húmeda, a temperatura ambiente.
- Se enjuagaron las laminillas con PBS al 0.01 M, pH 7.2 y Tween al 0.3%, 3 veces durante 3 minutos cada lavado.
- Se eliminó el exceso de amortiguador.

- Posteriormente se agregaron 200 a 250 μ l del anticuerpo monoclonal de ratón anti-PDGF, diluido en el amortiguador de PBS con leche al 7% a una concentración de 20 μ g/ml, o un anticuerpo irrelevante (Suero de humano) para el control negativo.
- Se incubaron las laminillas durante 24 horas a 4°C, en cámara húmeda.
- Se lavaron los portaobjetos con PBS al 0.01 M, pH 7.2 y Tween al 0.3%, 3 veces durante 3 minutos cada lavado.
- Se eliminó el exceso de PBS.
- Se agregaron a los tejidos 200-250 μ l de anticuerpo anti-IgG de conejo biotinado [Sigma], en una dilución 1:40 en amortiguador de PBS con leche al 7%.
- Se incubaron durante 45 minutos a 4 °C, en cámara húmeda.
- Se lavaron las laminillas con PBS al 0.01 M, pH 7.2 y Tween al 0.3%, 3 veces durante 3 minutos cada lavado.
- Se agregaron a los tejidos de 200-250 μ l de complejo avidina-peroxidasa en una dilución 1:40 incubándose durante 45 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Se lavaron los portaobjetos con PBS al 0.01 M, pH 7.2 y Tween al 0.3%, 3 veces durante 3 minutos cada lavado.
- Se reveló la peroxidasa con una solución de diaminobencidina (6 mg de 3'3-diaminobencidina [Sigma], 10 ml de Tris-HCl pH 7.6, 0.05 M y 10 μ l de H₂O₂ al 30%) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se paró la reacción lavando con PBS al 0.01 M pH 7.2 .
- Posteriormente se contratiñeron los tejidos durante 10 minutos con hematoxilina de Harris.
- Se eliminó el exceso de colorante con agua corriente.
- Se viró la tinción con una solución saturada de Li₂CO₃.
- Se lavó con agua corriente.
- Se deshidrataron los tejidos con las siguientes concentraciones de etanol: 50% , 70%, 80% , 96%, etanol-xileno y xileno durante 3 minutos en cada uno.
- Finalmente se montaron los tejidos con resina.

13. REFERENCIAS

1. Albeda, S y Buck, C: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4:2868-2880.
2. Best, C; Rittenhouse, D: A comparison of TC7 and 32% dextran 70 for prevention of postoperative adhesions in hamsters. *Obst Gynecol* 1991; **78**: 858-60.
3. Best, C; Rittenhouse D; Vasquez, C. Evaluation of Interceed (TC7) for reduction of postoperative adhesions in rabbits. *Fertil Steril* 1992; **58**: 817-820.
4. Boyers, S; Diamond, M; DeCherney, A et al: Reduction of postoperative pelvic adhesions in the rabbit with Gore-Tex Surgical Membrane. *Fertil Steril* 1988; **49**:1066-70.
5. Canalis, E: Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 1981; **30**: 970-975.
6. Clark, J y Henson PM: The molecular and cellular biology of Wound repair. Plenum Pres, New York. 1988. Pags 279-285.
7. Clark, J; Madtes, D y Rague, G: Effects of platelet-derived growth factor isoforms on human lung fibroblast proliferation and collagen gene. *Exp Lung Res* 1993; **9**:327-44.
8. Cohen, B. Heyman, T y Mast, D: Use of intraperitoneal solutions for preventing pelvic adhesions in the rat. *J Reprod Med* 1983; **28**:649-53.
9. Chua, C; Geiman, D; Keller, G et al: Induction of collagenase secretion in human fibroblast cultures by growth promoting factors. *J Biol Chem* 1985; **260**: 5213-5216.
10. Daurgida, U; Gandhi, V; McShane, A et al: Peritoneal sclerosis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients dialyzed exclusively with lactate-buffered dialysate. *Int J Artif Organs* 1986; **9**:413.
11. DeCherney, A y Mezer, H: The nature of posttuboplasty pelvic adhesions as determined by early and late laparoscopy. *Fertil Steril* 1984; **41**:643-646.
12. Diamond, M: Adhesion reformation and *de novo* adhesion formation after reproductive pelvic surgery. *Fertil Steril* 1987a; **47**:864-866.
13. Diamond, M; Daniell, F; Johns, A (Operative Laparoscopy Study Group) et al: Postoperative adhesion development after operative laparoscopy: evaluation at early second look procedures. *Fertil and Steril* 1991; **55**: 700-704.
14. Díaz de León H, L; Krötzsch-Gómez, FE; Guerrero-Padilla, E: A novel approach for treatment of tisular fibrosis. *Matrix Biol* 1994; 14 (5): 401 (abstr).
15. DiPietro, L: Wound Healing: The role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 1995; **4**: 233-240.
16. diZerega, G; Buttram, V; Malinak, R (Adhesion Study Group) et al: Reduction of postoperative pelvic adhesions with intraperitoneal 32% dextran 70: a prospective, randomized clinical trial. *Fertil Steril* 1983; **40**:612-619.
17. diZerega, G: Contemporary Adhesion Prevention. *Fertil Steril* 1994; **61**(2): 219-235.
18. diZerega, G: Course of adhesion prevention barriers in ovarian surgery, tubalplasty, ectopic pregnancy, endometriosis, adhesiolysis, and miomectomy. *Curr Op Obstet Gynecol* 1996; **8**: 230-237.
19. Duffy, D: Adhesion Controversies: pelvic pain as a cause of adhesions, cristaloids in preventing them. *J Reprod Med* 1996; **41**:19-26.
20. Ellis, H: The etiology of post-operative abdominal adhesions: an experimental study. *Br J Surg* 1962; **50**:410-16.

21. Ellis, H: The healing of peritoneum under normal and pathological conditions. *Br J Surg* 1965;**52**:471-476.
22. Fabri, P. y Rosemurgy, A: Reoperation of small intestinal obstruction. *Surg Clin North Am* 1991; **71**:131-13
23. Fawcett, D: Tratado de histología. *Interamericana* Madrid, España. 1987. Pags.165-166.
24. Fayez, J y Schneider, P: Prevention of pelvic adhesion formation by different modalities of treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1987;**157**:1184-1188.
25. Franklin, R; Malinak, L; Larsson, B et al: Reduction of ovarian adhesions by the use of Interceed. *Obst Gynecol* 1995; **86**: 335-340.
26. Frazier-Jessen, M y Kovacs, E: Abdominal wall thickness as a mean of assessing peritoneal fibrosis in mice. *J Immunol Methods* 1993; **162**:115-121.
27. Frieman, J; Muller, K y Pott, F: Mesothelial proliferation due to asbestos and man-made fibres. Experimental studies on rat omentum. *Pathol Res Pract* 1990; **78**:186.
28. Furuzawa-Carballeda, J: Análisis molecular de la respuesta inflamatoria sinovial en pacientes con artritis reumatoide. *UNAM*. México, D.F. 1995. Pags. 10-12.
29. Furuzawa-Carballeda, J; Kröttsch-Gómez, FE; Barile-Fabris, L et al: Estudio comparativo del tratamiento de la esclerosis sistémica progresiva con colágena-PVP y Kenakort. *XII Congreso Nacional de Inmunología* 1998, 03.
30. Gailit, J y Clark, R: Wound repair in the context of extracellular matrix. *Cell Biol* 1994; **6**:717-725.
31. Galan, N; Leader, A; Mallkson, T et al: Adhesion prophylaxis in rabbits with Surgicel an two absorbable microsurgical sutures. *J Reprod Med* 1983; **28**: 662-4.
32. Gandhi, V; Humayun, H; Daurgidas, J et al: Sclerotic thickening of the peritoneal membrane in maintance peritoneal dialysis patients. *Arch Intern Med* 1980; **140**:1201-1205
33. Garnier, M y Delamare, V. 1981. Diccionario de términos de medicina. *Interamericana*. México, D.F. 1114 Pags.
34. Goldberg, J; Toledo, A y Mitchell, P: An evaluation of th Gore-Tex Surgical Membrane for the prevention of postoperative peritoneal adhesion. *Obstet Gynecol* 1987; **70**:846-8.
35. Gomel, V: Pathophysiology of adhesion formation and strategies for Prevention. *J Reprod Med* 1996; **41**:35-41.
36. Gray, A; Bishop, J; Reeves, J et al: Alpha y beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *J Cell Sci* 1993; **104**: 409-13.
37. Grotendorst, G; Chang, T; Seppa, J et al: Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1982; **113**: 261-266.
38. Gurgan, T; Kisinisci, H; Yarali, H; et al: Evaluation of adhesion formation after laparoscopic treatment of polycystic ovarian disease. *Fertil Steril* 1991; **56**: 1176-1178.
39. Hammerman, D; Taylor, S; Kirschenbaun, I et al: Growth factors with heparin binding affinity in human synovial fluid. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987; **186**: 384-389.
40. Heany, A. y Doty, E: Expanded-polytetrafluoroethylene but not oxidized regenerated cellulose prevents adhesion formation and reformation in a mouse uterine horn model of surgical injury. *Fertil Steril* 1993; **60**: 550-558.
41. Herovici, C: Polychrome stain for differentiation procollagen from collagen stain Technology 1963; **38**: 204-205.
42. Hertzler, A. The peritoneum. St. Louis: DV Mosby. 1919. Pags. 20-69.
43. Holtz, G: Prevention and management of peritoneal adhesions. *Fertil Steril* 1984; **41**: 497-507.
44. Hubbard, T; Khan, M; Carag, V et al: The pathology of peritoneal repair its relations of reformation adhesions. *Ann Surg* 1967; **165**:908-916.
45. Jansen, R: Early laparoscopy after pelvic operations to prevent adhesions: safety and efficacy. *Fertil Steril* 1988;

49:26-31.

46. Kahler, C; Herold, M y Wiedermann, C: Substance P: a competence factor for human fibroblast proliferation that induces the release of growth-regulatory arachidonic acid metabolites. *J Cell Physiol* 1993; **156**:579-87.
47. Kovacs, E: Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 1991; **12**:17-23.
48. Kovacs, E; Brock, B; Silber, I et al: Production of fibrogenic cytokines Interleukin-2 treated peripheral blood leucocytes: expression of Transforming Growth Factor- β and Platelet-Derived Growth Factor B chain genes. *Obstet Gynecol* 1993; **82**: 29-36.
49. Kovacs, E; van Stedums; Neuman, J et al: Selective induction of PDGF gene expression in peritoneal macrophages by interleukin-2. *Immunobiol* 1994a; **190**:263-274.
50. Kovacs, E y Frazier-Jensen: The Inflammatory Process. *Xenobiotics and Inflammation. Academic Press* 1994b; 17-31.
51. Kröttsch-Gómez, FE; Guerrero-Padilla, E y Díaz de León, HL: Morphological studies on the effects of fibroquel during wound of surgical wounds in rats. *J Cell Biochem*, 1993 supplement 17 E: 137, R 506, (abstr).
52. Kröttsch-Gómez, FE; Furuzawa-Carballeda, J; Reytez-Márquez, R y Díaz de León, L: Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in skin biopsies from hipertrophic scars. (*Journal of Investigative Dermatology* 1998; en prensa).
53. Larsson, B: Effect of intraperitoneal instillation of 32% dextran 70 on postoperative adhesion formation after tubal surgery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985; **64**: 437-441.
54. Larsson, B; Aison, A; Bryman, I(Nordic Adhesion Prevention Study Group) et al: The efficacy of Interceed (TC7) for prevention of reformation of postoperative adhesions on ovaries, fallopian tubes, and fimbriae in microsurgical operations for fertility: a multicenter study. *Fertil Steril* 1995; **63**:709-714.
55. Lawrence, W; Sporn, M; Gorschboth, C et al: The reversal of an Adriamycin induced healing impariment with chemoattractants and growth factors. *Ann Surg* 1986; **203**: 142-147.
56. Lee, H; Choi, I y Pyun, K: Peritoneal lavage fluids stimulate NIH3T3 fibroblast proliferation and contain increased tumor necrosis factor and IL-6 in experimental silica-induced rat peritonitis. *Clin Exp Immunol* 1995; **100**:139-144.
57. Linsky, C: Adhesion reduction in the rabbit uterine horn model using an absorbable barrier, TC-7. *J Reprod Med* 1987; **32**: 1720.
58. Linsky, C; Stephen, M; Flanklin, R (Interceed (TC/ Adhesion Barrier Study Group): Prevention of surgical adhesions by Interceed (TC7) and absorbible adhesion barrier: a propective, randomized multicenter clinical study. *Fertil and Steril* 1989; **51**(6): 933-938.
59. Lynch, S; Nixon, J; Colvin, R; Antoniades, H: Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci* 1987; **84**: 7696-7700.
60. Majack, R; Cook, S; Bornstein, P: Platelet-derived growth factor and heparin like glucosaminoglycans regulate thrombospondin syntesis and deposition in the matrix smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1985; **101**: 159-170.
61. Majack, R; Milbrandt, J; Dixit, V: Induction of thrombospondin messenger RNA levels occurs as an immediate primary response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8821-8825.
62. Milligan, D y Raftery, A: Observations on the pathogenesis of peritoneal adhesions: a light and electron microscopical study. *Br J Sur.* 1974; **61**: 274-280.

63. Narayanan, A; Page, R: Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid human fibroblasts. *J Biol Chem* 1983; **258**: 11694-11699.
64. Nishimura, K; Bieniarz, A; di Zerega, G et al: Evaluation of oxidized regenerated cellulose for prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Jpn J Surg* 1983; **13**:159-63.
65. Naether, O; Fischer, R: Adhesion formation after laparoscopic electrocoagulation of the ovarian surface in polycystic ovary patients. *Fertil Steril* 1993, **60**:95-98.
66. Owen, A; Geyer, R; Antoniades; H: Human platelet-derived growth factor stimulates amino acid transport and protein synthesis by human diploid fibroblasts in plasma-free media. *Proc Natl Acad Sci* 1982; **79**: 319-326.
67. Pagidas, K y Tulandi, T: Effects of Ringer's lactate, Interceed (TC7) y Gore-Tex Surgical Membrane on postsurgical adhesion formation. *Fertil Steril* 1992; **57**:199-201.
68. Pierce, G; Mustoe, T; Altrock, B et al: Role of Platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem* 1991; **45**:319-326.
69. Pittaway, D; Daniell, J; Maxson, W: Ovarian surgery in an infertility patient as an indication for a short-interval second look laparoscopy: a preliminar study. *Fertil Steril* 1985; **44**:611-614.
70. Queralt, C; Laguens, G; Lozano, R: Prevention of peritonitis with oxidized regenerated cellulose. *Infect Surg.* 1987; **12**:659-60.
71. Raftery, A: Absorbible haemostatic materials and intraperitoneal adhesion formation. *Br J Surg* 1980; **67**: 57-8.
72. Raftery, A: Regeneration of parietal and visceral peritoneum: an electron microscopical study. *J Anat* 1973;**115**:375-392.
73. Revuelta, R; García-Runaldi, R; Val, F et al: Expanded politetrafluoroethylene surgical membrane for pericardial closure. *J Thorac Cardiovasc Surg.*1985; **89**:451-5.
74. Rubin, K; Terracio, L; Ronstrand, I et al: Expression of Plateled-derived growth factor receptors is induced on connective tissue cells during chronic synovial inflammation. *Scand J Immunol* 1988^a; **27**: 285-294.
75. Rubin, K; Hansson, G; Ronstrand, I et al: Induction of B type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesion *Lancet June* 1988b; **18**: 1353-1356.
76. Ruiz Lozano, MC; Hernández-Pérez, E y Díaz de León, L: Tratamiento de la contractura del tendón de Aquiles en pacientes con parálisis cerebral infantil con aplicación de colágeno líquido polimerizado (Fibroquel^{MR}) asociado con ejercicio terapéutico. *II Congreso Latinoamericano de Genética*, 1994, 06.
77. Ryan, G; Groberty, J; Majno, G: Mesothelial injury and recovery. *Am J Pathol* 1973; **71**: 93-112.
78. Saravelos, H et al: Physical Barriers in Adhesion Prevention. *J Reprod Med* 1996; **41**:42-51.
79. Shimanuki, T: Localized prevention of postsurgical adhesion formation and reformation with oxidized regenerated cellulose. *J Biomed Mater Res* 1987; **21**: 173-85.
80. Sporn, M y Roberts, A: Peptide Growth Factors and their Receptors 1. *Springer-Verlag*. 1990; Alemania, Berlin. Pags 173-242, 633-658.
81. Steis, R: Intraperitoneal lymphokine-anticated Killer-cell and interleukin-2 therapy for malignancies limited to the peritoneal cavity. *J Clin Oncol* 1990; **8**:16-18.
82. Surrey, M y Friedman, S: Second look laparoscopy after reconstructive pelvic surgery for infertility. *J Reprod Med* 1982; **27**:658-60.
83. Takehara, K; Grotendorst, G; Silver, R et al: Dipyridamoles dechses platelet-derived growth factor levels in

- human serum. *Arteriosclerosis* 1987; **7**:152-158.
84. Trimbos-Kemper T. Trimbos, J y vanHall, E: Adhesion formation after tubal surgery: result of the eight-day laparoscopy in 188 patients. *Fertil Steril* 1985; **43**: 395-400.
85. Urba, W; Clark, J; Steis, R et al: Intraperitoneal lymphokine activated Killer cell, Interleukin-2 therapy in patients with intra-abdominal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**:602.
86. Vlasveld, L; Tall, B; Kroon, B et al: Intestinal obstruction due to diffuse peritoneal fibrosis at 2 years after the successful treatment of malignant peritoneal mesothelioma with intraperitoneal mitoxantrone. *Can Chem Pharmacol* 1992; **29**: 405.
87. Watters, W y Buch, R: Scanning electron microscopy of mesothelial regeneration in the rat. *Lab Invest* 1972; **26**:604-609.
88. Wingerd, B: *Rat dissection manual*. The Johns Hopkins University Press. London, Baltimore. 1988: 43-47.
89. Yemini, M; Meshorer, A; Katz, Z et al: Prevention of reformation of pelvic adhesions: by "barrier" methods. *Int J Fertil* 1984; **29**:194-6.