

Evaluación del uso tópico de factores de crecimiento derivados de plaquetas en el tratamiento de úlcera de córnea en conejos

ALEJO VERCESI¹, GUILLERMO ATILIO GRANDE², GUSTAVO ECHEVARRÍA¹,
ARIEL NAVES³, MATÍAS DÉCIMA¹, JOSÉ ASTORQUIA², ROSARIO BURGOS², MELINA ECHANIZ²

¹Cátedra de Oftalmología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

²Cátedra de Clínica Equina, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral

³Instituto de Patología de Rosario

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar la eficacia de factores de crecimiento derivados de plaquetas tópicos en úlceras de córnea en conejos, analizándose el efecto antiinflamatorio, cicatricial y conservación de la transparencia corneal y otros efectos sobre la superficie ocular.

MÉTODO: Se utilizaron 30 conejos divididos en tratados y no tratados, subdivididos en tres grupos de 10 animales cada uno sacrificados a los 9, 15 y 30 días posterior a la queratectomía laminar. Los ojos fueron evaluados por los efectos observados clínicamente en la superficie ocular y córnea y por análisis histopatológico.

RESULTADOS: No se observaron diferencias estadísticas significativas entre conejos tratados vs. testigos entre las variables clínicas evaluadas, salvo en el opacidad corneal donde sí se observó una diferencia significativa. El estudio histopatológico mostró una mejor organización laminar del colágeno y los fibroblastos que llevaron a una más eficiente cicatrización.

CONCLUSIÓN: La utilización del uso tópico de factores de crecimiento puede constituirse en una herramienta útil para el manejo de úlceras de córnea de difícil tratamiento.

PALABRAS CLAVE: enturbiamiento corneal, úlcera de córnea, factores de crecimiento.

Evaluation of topical use of growth factors derived from platelets in the treatment of corneal ulcers in rabbits

ABSTRACT

PURPOSE: To determine the efficiency of topical growth factors derived from platelets in experimental cornea ulcers in rabbits.

METHODS: Thirty rabbits divided into two groups, treated and untreated, which were then subdivided into three groups of 10 animals each, were used. The rabbits were sacrificed 9, 15 and 30 days later to keratectomy. This laminar-type surgery was carried out on the right eye. The eyes were evaluated according to the effects observed clinically and histopathologically. Variables included were anti-inflammatory and cicatricial effect as well as the preservation of corneal transparency and other effects on the eye surface.

RESULTS: No significant statistical differences of the evaluated clinical variables were observed between treated and untreated rabbits. The difference in the degree of corneal clouding between the groups was statistically significant. Histopathological examination revealed a better laminar organization of collagen and fibroblasts leading to a more efficient healing.

CONCLUSION: The topical use of growth factors may become a useful tool to manage cornea ulcers of difficult treatment.

KEYWORDS: corneal clouding, cornea ulcer, growth factors.

Recibido:
9 julio 2008
Aceptado:
3 mayo 2009
Dr. Alejo Vercesi
Cátedra de Oftalmología
Universidad Nacional de
Rosario
Entre Ríos 286 2000
Rosario, Santa Fe
alvercesi@fibertel.com.ar

Las úlceras corneales pueden causar pérdida importante de la visión debido a la opacificación cicatricial y astigmatismos secuenciales. Sin embargo, el tratamiento precoz puede limitar los efectos posteriores a la lesión y mejorar los resultados.

Las úlceras infecciosas pueden resolverse con tratamiento antimicrobiano, a diferencia de las

úlceras no infecciosas que representan un desafío diagnóstico y terapéutico. El uso de sustancias que puedan acelerar y coadyuvar para una cicatrización anatómico-funcional corneal más eficiente, se constituye en factores fundamentales en el tratamiento de las úlceras corneales.

El propósito de este trabajo fue evaluar la eficacia de factores de crecimiento derivados

de plaquetas tópicos en úlceras de córnea en conejos, analizándose el efecto antiinflamatorio, cicatricial y conservación de la transparencia corneal y otros efectos sobre la superficie ocular.

Material y método

Se utilizaron 30 conejos sanos, machos y hembras con un peso entre 2.200 y 3.000 g. Los animales fueron divididos en tres grupos de 10 individuos cada uno de acuerdo con el período de recolección de las córneas para evaluación histopatológicas de las mismas a los 9, 15 y 30 días luego de la lesión. La mitad de cada grupo recibió tratamiento en un ojo y la otra mitad fue utilizada como control. Se realizó un examen oftalmológico individual para la exclusión de animales que presentasen cualquier alteración de la córnea y de la superficie ocular. Los animales fueron identificados con tatuaje en la oreja y mantenidos en jaulas individuales durante el estudio.

Bajo anestesia general fueron sometidos a una queratectomía laminar del ojo derecho que intereso 1/3 del espesor total corneal bajo medición paquimétrica ultrasónica. Se procedió a realizar una queratectomía laminar, demarcándose la córnea con un punch corneal de 6 mm de diámetro, removiéndose el botón mediante pinzas colibrí y delaminador corneal.

Los animales fueron tratados en forma tópica 4 veces por día con plasma rico en factores de crecimiento en el ojo derecho. Los animales control fueron tratados con lágrimas artificiales sin conservante como placebo 4 veces al día.

Los animales fueron evaluados diariamente con biomicroscopía sobre los siguientes signos clínicos: enturbiamiento corneal, superficie ocular (evaluación con fluoresceína), pannus, inflamación conjuntival, congestión conjuntival y secreción conjuntival. Las alteraciones fueron cuantificadas en 0 = ausente, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = intenso, 4 = grave¹.

Al final de cada período los animales fueron nuevamente anestesiados y sacrificados para enucleación y posterior recolección de las córneas. Para el estudio histopatológico los ojos de los conejos se fijaron en formol al 10% por más de 48 horas. Se procedió luego a extraer cortes de córnea efectuando dos resecciones paralelas separadas entre sí por una distancia de 2 mm que pasaban por el polo anterior corneal y que incluían periféricamente en sus bordes la zona limbar y algo del cuerpo ciliar, y se realizaron 4 cortes sucesivos de cada córnea que fueron coloreadas con hematoxilina y eosina. Fueron evaluados el epitelio, la interfase estroma-epitelial, estroma y neovascularización corneal.

La diferentes variables fueron analizadas separadamente con los respectivos tests de aleatoriedad que permiten usar, a pesar del pequeño tamaño de la muestra —N = 5—, toda la información disponible.

Resultados

En la figura 1 se pueden observar los valores promedio de las variables en conejos tratados y no tratados. Solamente para la variable enturbiamiento corneal se detectó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el Grupo 2 (con un seguimiento de 15 días) y un valor límite ($p = 0.06$) para la variable superficie ocular en el Grupo 3 (con un seguimiento de 30 días). La variable enturbiamiento corneal resulta ser una de las más importantes, ya que se refiere al mantenimiento de la transparencia corneal, hecho que indicaría una cicatrización más "armoniosa" u ordenada (fig. 2).

Los otros cruces de variables entre conejos tratados y conejos testigos, tanto si se tiene en cuenta los distintos períodos de seguimiento como si se compara entre conejos tratados vs testigos, no arrojaron diferencias estadísticamente significativas.

El estudio anatomopatológico mostró en la primera semana alteraciones epiteliales similares; el límite estroma-epitelial fue algo más irregular en los testigos y los testigos tenían mayor tendencia a la colagenización precoz (fig. 3a), tanto entre los fibroblastos como en forma de depósitos hialinos amorfos. En la segunda semana se encontraron las diferencias más evidentes en la formación de la cicatriz estromal. Los testigos tenían una mayor tendencia a presentar un límite estroma-epitelial irregular y a mostrar colagenización densa precoz, incluso con formación de masas irregulares de material colágeno que no se observó en ninguno de los casos tratados.

A los 30 días: en todos los casos evaluables de tratados siempre hubo áreas irregulares de colagenización, como si hubiera mala secuencia para una cicatriz ordenada. Dos de los conejos tratados tuvieron cicatrices casi perfectas, con ordenamiento en fibras paralelas del colágeno subepitelial reparado. Pero hubo otras dos que tuvieron persistencia de lesión.

Como observación general el estudio anátomo-patológico reveló que a los 7 días ya se había reconstruido en forma completa el epitelio corneal, la re-epitelización se realizó en parte por agrandamiento de las células epiteliales y en algunos casos se pudo documentar, además, la presencia de mitosis paracentrales y las complicaciones se atribuyeron a infección o bien a traumatismo y en casos de inflamación o de vascularización. En todos los casos, menos uno que se interpretó como complicado, no hubo vascularización corneal.

Discusión

La variable clínica enturbiamiento corneal indicó que a los 15 días los conejos tratados mantuvieron una transparencia corneal mayor que los no tratados; hecho que se corresponde con los hallazgos anatomopatológicos de me-

FIGURA 1

Valores promedios en conejos Tratados y No tratados, en los distintos periodos.

	9 días	
	Prom Trat.	Prom.No Trat.
Enturb. corneal	1,40	1,60
Sup. ocular	1,13	0,90
Panus	0,98	1,00
Inflam.conjunt.	0,96	0,98
Cong. conjunt.	1,36	1,27
Descarga conjunt.	0,71	0,98

Los valores promedios de ambos grupos NO evidencian diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables medidas



	15 días	
	Prom Trat.	Prom.No Trat.
Enturb. corneal	1,13	1,93
Sup. ocular	0,81	0,69
Panus	0,83	1,05
Inflam.conjunt.	0,64	1,05
Cong. conjunt.	0,89	1,15
Descarga conjunt.	0,53	0,63



	30 días	
	Prom Trat.	Prom.No Trat.
Enturb. corneal	2,07	1,53
Sup. ocular	0,23	0,44
Panus	0,94	0,92
Inflam. conjunt.	0,84	0,56
Cong. conjunt.	0,96	0,89
Descarga conjunt.	0,41	0,23

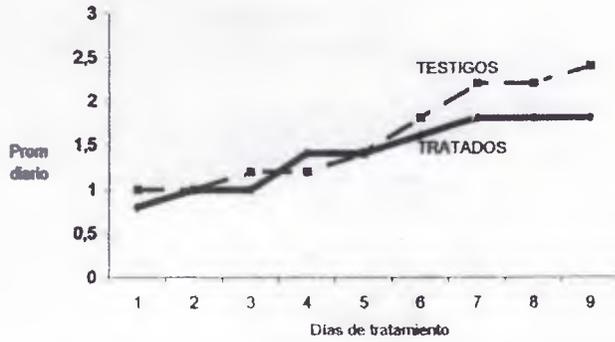


Figura 1. Valores promedio en conejos tratados y no tratados en los distintos periodos. En el gráfico correspondiente a los 15 días se observa que el enturbamiento corneal es mayor en los conejos no tratados que en los tratados.

FIGURA 2

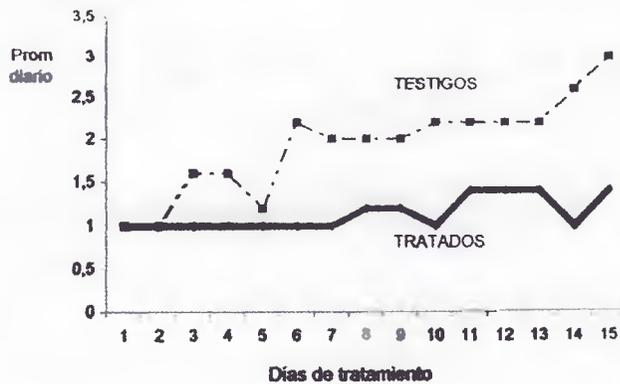
Promedio diario de enturbiamiento corneal según días de tratamiento
(conejos tratados vs. testigos)

Enturbiamiento corneal Grupo 1 (Tratados 9 días)



El tratamiento mantiene la transparencia corneal a pesar de la injuria provocada.

Grupo 2 (15 días de tratam)



La observación realizada en el Grupo 1 se mantiene, aumentando el enturbiamiento en los últimos tres días.

El efecto "protector" se acentúa entre el 13º y 15º día de evolución.

Grupo 3 (30 días de tratamiento)



Se pone en evidencia el efecto "protector" de la transparencia corneal. A partir del 15º día el efecto es inverso.

Las diferencias entre ambos grupos son estadísticamente significativas en los días 6to., 10º, 14º y 15º.

Figura 2. Promedio diario de enturbiamiento corneal según días de tratamiento (conejos tratados vs. testigos). En el Grupo 2 (15 días de tratamiento) se observa que el efecto protector de la transparencia corneal se acentúa entre el 13º y 15º día de evolución.

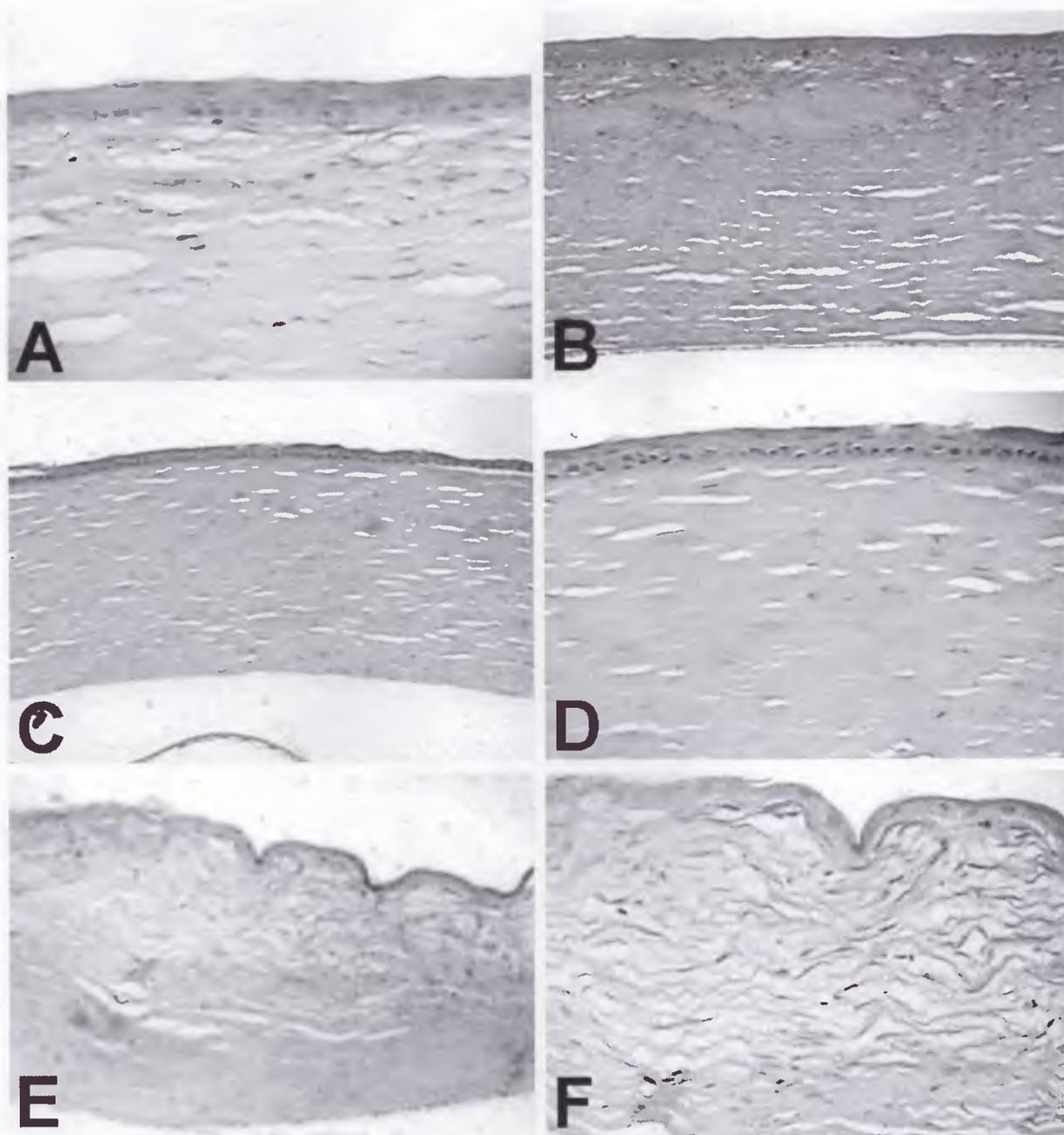


Figura 3. A. Lesión corneal a los 7 días. B. 14 días epitelizada con depósitos irregulares. C. 28 días tratado con regularidad del estroma. D. 28 días, a mayor aumento con regularidad de la cicatriz. E. 28 días no tratado con cicatrización activa. F. Detalle de córnea no tratada donde se observa cicatriz con actividad fibroblástica.

jor organización laminar del colágeno y de los fibroblastos, que llevan a una cicatrización más eficiente en el mismo período. Parecería que el tratamiento mantuviera más tiempo una respuesta fibroblástica activa con colagenización retardada y menor daño en epitelio y en la interfase. Estos hallazgos coinciden con los referidos por otros autores en cuanto a que se logra en los animales tratados una mejor organización laminar del colágeno y de los fibroblastos, llevando a una cicatrización más eficiente.

Se debe considerar el presente trabajo como una muestra piloto, puntal para un posterior trabajo de investigación que al ampliar el tamaño muestra pudiera corroborar los resultados hallados dando un marco conceptual para la aplicación de la técnica propuesta.

El tratamiento de las úlceras y erosiones corneales que tienden a cronificarse son de muy difícil tratamiento. Usualmente pueden ser tratadas eliminando los medicamentos tóxicos cuando constituyen la causa de las mismas

y proveyendo agentes inhibitorios de las colagenasas. Pero las úlceras más resistentes al tratamiento inicial pueden necesitar el uso de lentes de contacto, suero autólogo, tarsorrafias, membranas biológicas como la membrana amniótica, recubrimiento conjuntival u otros procedimientos quirúrgicos². En casos de úlceras crónicas e inactivas se ha utilizado plasma autólogo rico en plaquetas³.

Los esteroides tópicos pueden ser útiles cuando la ulceración es secundaria a mediadores inflamatorios, pero está contraindicada en los casos de "melting" corneal con mínima inflamación, como los casos asociados a síndrome de Sjögren. En presencia de enfermedades autoinmunes podría ser necesaria una terapia de inmunomodulación además de la tópica. El conocimiento de los procesos patológicos que originan los distintos tipos de úlceras corneales es esencial para la formulación de un tratamiento efectivo⁴.

La utilización de cianoacrilato glue es un efectivo método para el tratamiento de pequeñas perforaciones corneales pero no posee factores de crecimiento⁵. Últimamente se han utilizado "pegamentos" biológicos como el Fibrin Glue para producir la adherencia de la membrana amniótica a la córnea⁶.

¿Cómo actuarían los factores de crecimiento en su efecto antiinflamatorio, disminución de la colagenización precoz y mejora en la organización del colágeno? Como hipótesis probable, disminuirían las proteasas y aumentarían las interleuquinas-1, que son las que inhiben la apoptosis de queratocitos. Además, el plasma rico en factores de crecimiento aportaría factor de crecimiento epidérmico, vitamina A, factor de crecimiento transformador beta, fibronectina, factores de crecimiento nervioso y otras citoquinas que son esenciales para la proliferación, diferenciación y maduración del epitelio normal de la superficie ocular⁷.

Como conclusión, se puede expresar que el abordaje de las úlceras corneales de carácter crónico implica un desafío diagnóstico y terapéutico para el médico oftalmólogo que lo obliga a conocer los distintos tipos de tratamientos clásicos y actuales. En ese sentido, se estima que la utilización del uso tópico de factores de crecimiento como el utilizado en este trabajo podría constituirse en una herramienta útil para el manejo de esta difícil y complicada patología ocular.

Referencias

1. Munger R. Veterinary ophthalmology in laboratory animal studies. *J Vet Ophthalmol* 2002; 5: 167-175.
2. Tuli SS, Schultz GS, Downer DM. Science and strategy for preventing and managing corneal ulceration. *Ocul Surf* 2007; 5: 23-29.
3. Alio JL, Abad M, Artola A, Rodriguez-Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology* 2007; 114: 1286-1293.
4. Baudouin C. Un nouveau schéma pour mieux comprendre les maladies de la surface oculaires. *J Fr Ophthalmol* 2007; 30: 239-246.
5. Singh R, Umopathy T, Abedin A, Eatamadi H, Maharaja S, Dua HS. Choroidal detachment in perforated corneal ulcers: frequency and management. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 1111-4.
6. Hick S, Demers PE, Brunette I, La C, Mabon M, Duchesne B. Amniotic membrane transplantation and fibrin glue in the management of corneal ulcer and perforations: a review of 33 cases. *Cornea* 2005; 24: 369-77.
7. Yoon K-C, You I-C, Im S-K. Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 2007; 114: 1637-1642.