

Artículos de Revisión

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos

MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN CICATRIZANTE DE MEDICAMENTOS

Raimara González Escobar¹

RESUMEN

Los intentos del organismo para reparar las lesiones inducidas por agresiones locales comienzan muy precozmente en el proceso de la inflamación, y finalmente concluyen con la reparación y sustitución de las células lesionadas por células sanas. El proceso de cicatrización de una herida en la piel involucra la compleja interacción de muchos tipos de células y ocurre como una cascada secuencial de procesos solapados e íntimamente relacionados. Existen varios modelos farmacológicos experimentales que permiten evaluar la acción cicatrizante de un principio activo, profundizando en los eventos específicos de la cicatrización. En este trabajo se presentarán los detalles de algunos de estos modelos, los cuales son: modelo de lesión inducida por quemadura en curieles, modelo de 6 heridas asépticas en cerdos, promoción de cicatrización por segunda intención en ratas y modelo para predecir la distribución de un medicamento aplicado tópicamente en heridas. Estos ensayos permiten el estudio de múltiples elementos histológicos, bioquímicos, celulares y clínicos, característicos del proceso de cicatrización.

DeCS: CICATRIZACION DE HERIDAS; ENSAYOS CLINICOS/métodos; ANIMALES DE LABORATORIO; PREPARACIONES FARMACEUTICAS.

Nuestro organismo posee mecanismos protectores, como son la inflamación y la reparación, sin las cuales las heridas no llegarían a cicatrizar, no se frenarían las infecciones bacterianas y los tejidos de órganos lesionados pudieran conservar defectos permanentemente.

La cicatrización empiezan muy precozmente en el curso de la inflamación, cuando los macrófagos comienzan a digerir los microorganismos que han sobrevivido al ataque de los neutrófilos y *detritus* de las células parenquimatosas y neutrófilos muertos. Generalmente 24 h después de

¹ Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

la lesión, comienzan a proliferar los fibroblastos y las células endoteliales, que forman en un período de 3 a 5 d, un tejido especializado (tejido de granulación) que es el rasgo fundamental de la curación de la inflamación.

El tejido de granulación tiene un aspecto granular blando en la superficie de las heridas; su característica histopatológica fundamental es la proliferación de pequeños vasos de neoformaciones y fibroblastos. Finalmente este tejido da lugar a una cicatriz formada por fibroblastos fusiformes, colágeno, denso, fragmentos de tejido elástico, matriz extracelular y vasos relativamente escasos.¹

Son varios los mecanismos implicados en la cicatrización de las heridas, ya que se trata de un fenómeno extremadamente complejo, que implica a una serie de procesos bien orquestados que se mencionan a continuación: reparación de las células parenquimatosas, emigración y proliferación de las células parenquimatosas y conjuntivas, síntesis de proteínas de la matriz extracelular, remodelación del tejido conjuntivo y elementos parenquimatosos, colagenización y aumento de la resistencia de la cicatriz.

Conjuntamente a estos mecanismos influyen factores muy importantes, como el papel de los factores de crecimiento, que es central para el crecimiento de los fibroblastos, vasos sanguíneos y la regeneración de las células epiteliales, las interacciones entre las células y entre las células y la matriz, la síntesis de matriz extracelular y su colagenización.¹

Los estudios de cicatrización en humanos son dificultosos por la variabilidad en las heridas de los pacientes. Existen numerosos factores que pueden influir en el fracaso de los ensayos clínicos, como lo son el tamaño de la herida, la profundidad, la localización, la vascularización, la dura-

ción, las causas, los tratamientos previos, la salud general del paciente, el estado nutricional, y el uso de otros medicamentos, etc. Por toda esta variabilidad, se debe incluir un gran número de pacientes en el estudio. Sin embargo, en contraste con esto, todas estas condiciones pueden ser controladas en los estudios con animales de experimentación.² Existen varios modelos experimentales que permiten evaluar la acción cicatrizante de un principio activo, profundizando en los eventos específicos de la cicatrización. Estos ensayos posibilitan el estudio de múltiples elementos histológicos, bioquímicos, celulares y clínicos, característicos del proceso de cicatrización. En este trabajo se presentarán los detalles de algunos de estos modelos.

MODELOS EXPERIMENTALES

MODELO DE LESIÓN INDUCIDA POR QUEMADURA EN CURIELES³

Se ha reportado que entre los animales de laboratorio, los curieles presentan la menor variabilidad en el grosor de la piel,^{4,5} por lo tanto es un animal apropiado para el estudio de heridas por quemaduras.

En este modelo se utilizan curieles Hartley de 400 g. Luego de ser anestesiados se les produce una quemadura, con un área de 16 cm², que cubre el 3 % de la superficie corporal. La quemadura se logra por contacto directo de un disco caliente, sobre el área dorsal del animal, previamente depilada, en el ángulo inferior de las escápulas. El plato se mantiene a 250 °C y se controla con termostato, por un período de contacto estandarizado de 6 s.⁶

Al sexto día de inducida la quemadura, se realiza una biopsia a la parte central de la superficie de cada quemadura con un biótomo cutáneo de 3 mm de diámetro, pre-

viamente esterilizado. Con estas muestras se realizan cultivos para la cuantificación bacteriana de las quemaduras.^{7,8} Los parámetros que se miden son el tiempo para la total cicatrización, conteo de bacterias en la herida, además de tenerse en cuenta el tamaño y la apariencia de cada herida hasta su completa cicatrización. Estas determinaciones permiten saber si la sustancia de prueba tiene algún efecto antimicrobiano, lo cual constituye uno de los mecanismos más importantes de los productos naturales en su acción cicatrizante; así como valorar posibles mecanismos implicados en la rápida cicatrización de quemaduras, como lo es la prevención de la necrosis isquémica progresiva del daño térmico, que mitiga así la producción desbalanceada de tromboxanos.

El análisis estadístico de las diferencias entre los grupos en cuanto al conteo bacteriano de las heridas se lleva a cabo mediante la prueba exacta de Fisher, para la comparación de las proporciones. El análisis del tiempo requerido para la completa cicatrización se realiza por medio de la prueba de la t de Student para la comparación de las medias entre cada grupo y el control.³

MODELO DE 6 HERIDAS ASÉPTICAS EN CERDO²

La presencia de tejido debilitado en las heridas incrementa el crecimiento bacteriano, reduce la resistencia del hospedero a la infección, y disminuye la formación del tejido de granulación y el proceso de reepitelización.⁹ La eliminación de este tejido (o limpieza de la herida), constituye un paso esencial en el tratamiento de las heridas necróticas, como las úlceras de las piernas, tanto arteriales como venosas, llagas por presión, o quemaduras.^{10,11} El objetivo principal de este modelo experi-

mental es investigar la capacidad de la sustancia de prueba de eliminar el tejido necrótico.² En la clínica, uno de los tratamientos que se utiliza para la limpieza de la herida es la escisión quirúrgica,^{12,13} pero no siempre puede realizarse en todos los tipos de heridas, como es el caso de las úlceras venosas de las piernas, ya que podría incrementar la profundidad de estas. En los últimos 20 años, numerosos productos enzimáticos han sido utilizados en este tipo de tratamiento.^{11,13} Frecuentemente los 2 productos comerciales más usados son Elase (fibrinolisisina/DNAasa) y Novuxol (colagenasa), cuya función principal es la desintegración del material necrótico.

Con el fin de probar el efecto de sustancias activas en la cicatrización de heridas a través del mecanismo previamente explicado, se realiza este modelo que se utiliza como animal experimental cerdos de 20 kg de peso corporal, anestesiados con una mezcla de halotano, oxígeno y óxido nitroso a través de una máscara facial, y depilados en el área dorsal. Así se garantiza que esta zona quede completamente aséptica, para realizar 6 úlceras necróticas artificiales que midan 4 cm de longitud y 2,5 mm de profundidad, tres en cada hemisferio de la línea media del animal. La distancia entre las heridas es de 4 a 5 cm y luego son cubiertas con vendaje no adhesivo. El tejido remanente se hace necrótico por la aplicación de ácido tricloroacético 20 % durante 4 min en la herida. Después de este procedimiento, las heridas se cubren con gaza hidrofílica y protectores adicionales contra el trauma. Estas no son tratadas durante 3 d, para asegurar el efecto deseado del ácido. Al cabo de este tiempo se presenta una gruesa capa de tejido necrótico que contiene tanto el tejido necrótico dérmico conectivo, como el tejido graso subcutáneo. El tratamiento se aplica 2 veces al día, durante 7 d con compri- midos de gasa (5 x 5 cm), impregnados

exactamente con 3,5 mL de la solución de prueba. La profundidad de la necrosis se controla histológicamente mediante un método de tinción especial (tinción Martius-Scarlet-Blue MSB), en el cual el tejido necrótico se colorea de rojo y el tejido no dañado se colorea de azul.^{14,15}

En el análisis de las heridas el parámetro principal que se mide es la cantidad de tejido necrótico presente en los días cero, 7, 9 y 11, donde se toman fotografías de estas y además se representan en una lámina transparente. Luego se estima la cantidad de tejido de granulación o de tejido necrótico (representados en la fotografía por las áreas rojas y amarillas de la herida respectivamente) y el tamaño de la herida, a través de métodos computadorizados.^{16,17} Todos los días las heridas se revisan cuando se cambia el vendaje. De la misma forma se evalúa el eritema causado por la irritación de la piel circundante y la limpieza de estas a través de la presencia de despojos o tejido de granulación.¹⁸

Para evaluar la eliminación del tejido necrótico se determina el número de días necesarios para remover este. Además de estas determinaciones, se analizan colonias bacterianas de todas las heridas antes y después del tratamiento. Para el examen histopatológico, antes del tratamiento y en los días 4, 7 y 11, se realizan biopsias de 6 mm bajo total anestesia, con toma de muestras en las posiciones siguientes: día cero: centro del cuadrante izquierdo superior; día 4: cuadrante derecho superior; día 7: cuadrante izquierdo inferior; día 11: cuadrante derecho inferior. Estas muestras son procesadas histológicamente para las observaciones de rutina; tinciones especiales para fibrina y colágeno; diferenciación entre el nuevo tejido y viejo tejido.^{14,15}

El examen histológico incluye la determinación de la incorporación de

bromodeuxiridina (BrdU) con el fin de detectar la proliferación celular. En 4 animales, después de 7 d de tratamiento, se administra 1 g de 5-bromodeuxiridina (sustancia se incorpora al ADN de las células en proliferación) en la vena yugular 1 h antes de tomar las muestras para las biopsias.^{19,20} Las muestras se toman del cuadrante izquierdo inferior de las úlceras y se fraccionan a la mitad con un bisturí. Una mitad se congela con nitrógeno líquido y se tiñe con el uso de un anticuerpo monoclonal contra BrdU. La otra mitad se fija en formalina y se le realizan las técnicas de tinción de rutina mencionadas anteriormente.

En resumen, los parámetros que se determinan para llegar a conclusiones sobre el tratamiento que se prueba con este mecanismo de cicatrización son, la cantidad de tejido necrótico en las úlceras, la determinación diaria del área cubierta por tejido necrótico estimado por análisis computadorizado de la herida, el eritema de la piel circundante, la contaminación bacteriana con cadenas de estreptococos no patogénicos, y la proliferación de células, como los fibroblastos y células endoteliales. Para comparar las diferencias entre los resultados del parámetro principal medido, es decir, la cantidad absoluta de tejido necrótico de cada día durante el tratamiento, se utiliza la prueba t de Student.

El cerdo doméstico se considera un animal apropiado para los estudios de cicatrización, pues la estructura de su piel se parece a la de la piel humana más que cualquier otro animal de laboratorio.²¹ En este estudio es factible remover primero gran parte de la dermis y luego la epidermis, para crear una mayor capa superficial de necrosis, al nivel de la interfase de la dermis y la grasa subcutánea, ya que así se asemeja a la profundidad y extensión de la necrosis en pacientes con úlceras venosas en las piernas.²

PROMOCIÓN DE CICATRIZACIÓN POR SEGUNDA INTENCIÓN EN RATAS²²

En este modelo se utilizan ratas de la línea Wistar de 300 g de peso corporal, anestesiadas y depiladas en el área dorsal, donde se realizan 6 heridas asépticas de 6 mm de diámetro, con un biótomo cutáneo. Las heridas se realizan 1,25 cm a la derecha y a la izquierda de la línea media, separadas 2,5 cm de la zona craneal. Los tratamientos se distribuyen aleatoriamente, de forma tal que cada uno pase por las diferentes posiciones de las heridas en cada animal. Veinticuatro horas después de la operación se aplican los tratamientos sobre cada herida y alrededor de ella, en un área lateral de 3 mm de diámetro.

La aplicación de las sustancias de pruebas se realiza 2 veces al día durante 5 d. Para determinar el área superficial se determina midiendo los bordes de la herida en dirección craneocaudal y lateral media. Un promedio de estas 2 determinaciones se utiliza para determinar el radio y el área de cada herida. En los estudios histológicos se remueve el tejido después del sacrificio, se fija en formalina y se incluye en parafina. Se mide la distancia entre el epitelio queratinizado, los márgenes del epitelio escamoso estratificado y entre los extremos organizados del tejido de granulación.²²

El análisis de varianza se realiza mediante la prueba de Friedman para verificar la existencia de diferencias estadísticas entre los grupos.^{22,23}

MODELO PARA PREDECIR LA DISTRIBUCIÓN DE UN MEDICAMENTO APLICADO TÓPICAMENTE EN HERIDAS²⁴

Se conoce que la habilidad de los solutos aplicados tópicamente para penetrar la barrera del estrato córneo de una piel

normal y extenderse en las subcapas de la piel, está determinado por un número de factores, principalmente aquellos relacionados con:

- las propiedades físico-químicas del soluto.
- la razón por la cual la circulación sanguínea local aclara el soluto desde el tejido hasta la circulación sistémica.^{25,26}

Sin embargo, la absorción y distribución en, y alrededor de las heridas seguida de una administración tópica aún está por ser determinada.

La absorción del soluto a través del sitio de la herida se conoce que es más rápida que a través de la piel normal, por la pérdida de las propiedades de barrera de la piel primaria.²⁷ A medida que evoluciona la cicatrización, el medio a través del cual el soluto aplicado tópicamente debe difundir, está cambiando constantemente.²⁸

En este modelo se realiza una sola herida de 15 x 15 mm en el lado izquierdo del abdomen de las ratas, aproximadamente 2 cm debajo de la columna espinal, de una forma idéntica a la ya publicada por Cross y otros, 1995, 1996.^{29,30} Las ratas se anestesian con una inyección intraperitoneal (60 mg/kg) de pentobarbital sódico. La zona dorsal se depila y se desinfecta con una solución de clorhexidina, luego se seca. La escisión del tejido se realiza hasta el nivel del tejido subcutáneo con tijeras y pinzas de disección. Los animales se dejan reposar durante 48 h. Los estudios de absorción se realizan a los 2, 7 y 12 d después de producida la herida en cada animal. Nuevamente se anestesian las ratas y en una película de acetato transparente se marca por triplicado cada herida, para posteriormente determinar el área de estas mediante un programa computadorizado.

Con el fin de prevenir cualquier absorción de solutos en la piel intacta circundante a las heridas, estas se cubren con un vendaje, solamente abierto en la superficie de las heridas. Sobre la herida se coloca una celda de difusión de vidrio, con un diámetro interno de 1,8 cm que se asegura con adhesivo. En el tiempo cero se le adiciona 1 mL de *buffer* de fosfato salino (PBS), con un pH de 7,4, se completa con el soluto de interés radiomarcado, y se deja por un tiempo de 4 h para que difunda dentro de la herida. Durante este tiempo se toman muestras de sangre (250-300 μ L) en un intervalo de 60 min, se centrifuga por 15 min a $13\ 000 \times g$ y el sobrenadante se utiliza para el ensayo de radiactividad.

Finalmente se toma una muestra de sangre a las 4 h y se sacrifica al animal. Con una pipeta de transferencia se extrae el contenido de la celda de difusión, y la superficie de la herida se seca para remover cualquier exceso de la solución. El abdomen se abre y el contenido de la vejiga se extrae hacia unos tubos previamente pesados, para la determinación de la radiactividad excretada en la orina. Las heridas son disecadas verticalmente colocándose en tubos eppendorf previamente pesados, para obtener muestras de la costra de la herida, la matriz del tejido de granulación, el tejido subcutáneo, el músculo superficial, el músculo profundo y la grasa abdominal.

También se toman muestras de estos tejidos del lado contralateral del abdomen para la determinación de la extensión de la distribución sistémica de los solutos marcados. Finalmente se procede a la determinación del contenido radiactivo de cada muestra mediante equipos contadores de centelleos.

Con este modelo se puede determinar y comparar la absorción y distribución de varios solutos en el sitio de granulación de las heridas, y también es útil para determinar si los perfiles de estos parámetros cambian entre períodos de administraciones tempranas (2 d), medias (7 d) y tardías (12 d) al cierre de las heridas en ratas.

CONCLUSIONES

Estos modelos experimentales brindan diversas posibilidades para estudiar el proceso de cicatrización en sus diferentes eventos, y en varios tipos de lesión: quemadura, herida abierta o úlcera. Son herramientas muy importantes para el investigador en la evaluación del mecanismo de acción por el cual un medicamento presenta un efecto cicatrizante, y aportan información sobre las ventajas del uso de algunos animales de experimentación en estos modelos, por las características propias de la piel que presentan.

SUMMARY

The attempts of the organism to repair injuries induced by local aggressions begin very early in the inflammation process and conclude finally with the reparation and substitution of those cells damaged by sound cells. The healing process of a skin wound involves the complex interaction of many types of cells and a sequence of sneaky and closely related processes take place. There are various pharmacological experimental models allowing to evaluate the healing action of an active principle and to go deep into the specific healing events. Details are given in this paper about the following models: model of injury induced by burn in guinea pigs, model of 6 aseptic wounds in pigs, promotion of healing by second intention in rats and a model to predict the distribution of a

drug topically applied in wounds. These assays make possible the study of multiple histological, biochemical, cellular and clinical elements, which are characteristic of the healing process.

Subject headings: WOUND HEALING; CLINICAL TRIALS/methods; ANIMALS, LABORATORY; PHARMACEUTICAL PREPARATIONS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cotran RS, Komar V, Collins T. Reparación de los tejidos: proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: MC Graw-Hill, ed. Patología estructural y funcional. 6 ed. Madrid. Interamericana; 2000; cap 4:95-120.
2. Mekkes JR, Le Poole C. Efficient debridement of necrotic wounds using proteolytic enzymes derived from Antarctic krill: a double-blind, placebo-controlled study in a standardized animal wound model. *Wound Rep Reg* 1998;6(1):50-7.
3. Rodríguez-Bigas M, Cruz N, Suárez A. Comparative evaluation of *Aloe vera* in the management of burn wounds in guinea pigs. *Plastic Reconst Sur* 1998;81(3):387-9.
4. Zawacki BE, Jones RJ. Standard depth burns in the rat: The importance of the hair growth cycle. *Br J Plast Surg* 1967;20:347.
5. Zawacki BE. Reversal capillary stasis and prevention of necrosis in burns. *Ann surg* 1974;180:98.
6. Walker HL, Mason AD. A standard animal burn. *J Trauma* 1968;8:1049.
7. Robson MC, Duke WF, Krizek TJ. Rapid bacterial screening in the treatment of civilian wounds. *J Surg Res* 1973;14:426.
8. Robson MC, Heggors JP. Bacterial quantification of open wounds. *Milit Med* 1969;134:19.
9. Clark RAF. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol* 1985;13:701-25.
10. Nanninga PB, Mekkes JR, Westerhof W. Clinical management of venous leg ulcers. *Wounds* 1990;2:205-12.
11. Hellgren L, Vincent J. Debridement: an essential step in wound healing. En: Westerhof W, eds. *Leg ulcers: diagnosis and treatment*. Amsterdam: Elsevier Science; 1993:305-12.
12. Haury B, Rodeheaver G, Vensko J. Debridement: an essential component of traumatic wound care. *Am J Surg* 1978;135:238-42.
13. Westerhof W, Mekkes JR. Krill and other enzymes in enzymatic wound debridement. En: Wadstrom T, Eliasson I, Holder I, Ljungh A, eds. *Pathogenesis of wound and biomaterial-associated infections*. London: Springer Verlag; 1990:180-8.
14. Lendrum AC. Studies on the character and staining of fibrin. *J Clin Pathol* 1962;15:401-13.
15. James J, Bosch KS, Zuiderhoudt FHJ, Houtkoper JN, Van Gool J. Histophotometric estimation of volume density of collagen as an indication of fibrosis in rat liver. *Histochemistry* 1986;85:129-33.
16. Stotts NA. Seeing red, yellow and black: the three-colour concept of wound care. *Nursing* 1990;20:59-61.
17. Mekkes JR, Westerhof W. Image processing in the study of wound healing. *Clin Dermatol* 1995;13:401-7.
18. Westerhof W, Jansen FC, de Wit FS, Cormane RH. Controlled double blind trial fibronilysin-desoxyribonuclease (Elastase) solution in patients with chronic leg ulcers who are treated before autologous skin grafting. *J Am Acad Dermatol* 1987;17:32-9.
19. Oku T, Takigawa M, Yamada M. Cell proliferation of cultured human keratinocytes and fibroblasts measured using monoclonal antibody. *Br J Dermatol* 1987;116:673-9.
20. Frederiks WM, Marx F, Chamuleau RAF M, van Noorden CJF, James J. Immunocytochemical determination of ploidy class-dependent bromodeoxyuridine incorporation in rat liver cells after partial hepatectomy. *Histochemistry* 1990;93:627-30.
21. Meyer W, Schwarz R, Neurand K. The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig. *Curr Probl Dermatol* 1978;7:39-52.
22. Politis MJ. Dmytrowich. Promotion of second intention wound healing by Emu Oil Lotion: comparative results with Furacin, Polysporin, and cortisone. *Plast Reconstr Surg* 1998;1-3.
23. Lees M. Principles of second intention wound healing. *Compend Contin Edu Dent* 1989;11:857.
24. Cross SE, Roberts MS. Defining a model to predict the distribution of topically applied growth factors and other solutes in excisional full-thickness wounds. *J Invest Derm* 1999;112(1):34-41.

25. Cross SE, Roberts MS. Subcutaneous absorption kinetics of interferon and other solutes. *J Pharm Pharmacol* 1993;45:606-9.
26. Singh P, Roberts MS. Effects of vasoconstriction on dermal pharmacokinetics and local tissue distribution of compounds. *J Pharm Sci* 1994;83:774-82.
27. Gibeault JD, Cravens RB, Chvapil M. Transport of b-aminopropionitrile through intact skin or scar tissue. *J Surg Res* 1989;47:155-8.
28. Singh P, Roberts MS. Local deep tissue penetration of compounds after dermal application: Structure-tissue penetration relationships. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;279:908-17.
29. Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, Teo TC. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg* 1995;48:189-97.
30. Cross SE, Thompson MJ, Roberts MS. The distribution of systemically administered ampicillin, benzylpenicillin and flucoxacillin into excisional wounds in diabetic and normal rats and the effects of local topical vasodilator treatment. *Antimicrob Agent Chemother* 1996;40:1703-10.

Recibido: 15 de mayo de 2002. Aprobado: 20 de junio de 2002.

Lic. *Raimara González Escobar*. Calle 17 No. 6208 entre 62 y 64, municipio Playa, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba.