

## Metodología para el estudio de las primeras fases del proceso de cicatrización. Resultados en cicatrices control

P. Múgica Barreiro\*, V. Portugal Porras\*\*, I. García-Alonso Montoya\*\*\*, I. López de Tejada\*\*\*, J. Bilbao Axpe\*\*\*\* y J. Méndez Martín\*\*\*\*\*

\* Jefe del Servicio de Cirugía General. Hospital San Eloy. \*\* MIR. \*\*\* Profesor Titular. \*\*\*\* Jefe de Sección. \*\*\*\*\* Catedrático y Jefe de Servicio. Laboratorio de Cirugía Experimental. Universidad del País Vasco y Servicio de Cirugía General "B" (Prof. J.J. Méndez-Martín). Hospital de Basurto. Bilbao.

### Resumen

Con el objetivo de poder estudiar el proceso de cicatrización en sus primeras fases y las alteraciones producidas en el mismo por diferentes tratamientos, hemos utilizado a 23 conejos de Nueva Zelanda de ambos sexos y de pesos comprendidos entre 2.000 y 2.500 g, divididos en tres series. La primera serie (n = 9) se ha utilizado para la elección del día óptimo de estudio, sacrificando a los animales en grupos de tres los días 5, 7 y 10. La segunda serie (n = 7) se ha utilizado para el estudio de la línea alba normal, y la tercera (n = 7) para el estudio de las cicatrices producidas sobre la línea alba. Se han cuantificado la densidad fibroblástica del tejido (línea alba 26,66 y cicatriz 13,16;  $p = 0,0003$ ), el porcentaje de área hística ocupada por vasos (alba, 0,404 y cicatriz 3,436;  $p = 0,0003$ ) y el índice de reduplicación de los fibroblastos (alba 10,29 y cicatriz 21,80;  $p = 0,018$ ). Así mismo se ha cuantificado la resistencia tensional de las cicatrices. Todas las determinaciones sobre las cicatrices se han realizado al séptimo día de producida la lesión. Se concluye que el modelo propuesto es adecuado para el estudio del proceso de cicatrización en sus primeras fases (día 7), en especial en referencia a la participación fibroblástica en las mismas.

**Palabras clave:** Cicatrización. Resistencia tensional. Fibroblastos. Vascularización. ADN.

### METHODOLOGY FOR THE STUDY OF THE FIRST PHASES IN THE PROCESS OF WOUND HEALING. RESULTS IN WOUND HEALING CONTROL

With the aim of studying the process of wound healing in its first phase and the alterations produced in the same by different treatments, 23 New Zealand rabbits of both sexes, weighing between 2000-2500 g and divided into 3 series were used. The first series (n = 9) was used to elect the prime study day, sacrificing the animals in groups of 3 at the fifth, seventh and tenth day. The second series (n = 7) was used to study the normal alba line and the third series (n = 7) to study the healing produced over the alba line. The fibroblastic density of the tissue (alba line 26.66 and healing 13.16;  $p = 0.0003$ ), the percentage of tissue area occupied by vessels (alba 0.404 and healing 3.436;  $p = 0.0003$ ) and the rate of fibroblast reduplication (alba 10.29 and healing 21.80;  $p = 0.018$ ) were quantified. The tensile strength of the healing was also quantified. All the determinations on wound healing were carried out the seventh day after production of the lesion. It is concluded that the model proposed is adequate for studying the first phases in the process of wound healing (7th day) specially with respect to the fibroblastic participation in the same.

**Key words:** Woung healing. Tensile strength. Fibroblasts. Vascularization. DNA.

### Introducción

La cicatrización de las heridas representa una serie integrada y altamente diferenciada de acontecimientos fisiológicos y bio-

químicos que tienen lugar de forma exclusiva en organismos completos.

Estos mecanismos que configuran el proceso de cicatrización se elaboran de manera progresiva en distintas fases y etapas perfectamente controladas e imbricadas entre sí, lo que sólo es posible mediante una absoluta interrelación de los diferentes estadios evolutivos, así como por la presencia de diversos servomecanismos reguladores de éstos.

De una manera muy esquemática, tras producirse la herida se produce una respuesta inflamatoria que permite, induce y modula la proliferación vascular y fibroblástica. Tras estos fenóme-

Correspondencia: Dr. P. Múgica Barreiro.  
Laboratorio de Cirugía Experimental.  
Facultad de Medicina y Odontología.  
B.º Sarriena, s/n. 480940 Lejona.

Aceptado para su publicación el 15 de abril de 1992.

nos proliferativos tiene lugar la síntesis y maduración del colágeno que proporciona la resistencia a la tracción propia de la cicatriz.

Los diferentes trabajos consultados evalúan los efectos de los distintos tratamientos en el período final de este proceso, es decir, se mide el depósito de hidroxiprolina<sup>1-5</sup> y la resistencia tensional de la cicatriz<sup>4,6</sup>. Prácticamente no hemos encontrado estudios que midan las alteraciones de la cicatrización en sus primeras fases.

El objetivo del presente trabajo es aportar una metodología que permite estudiar las alteraciones producidas en el proceso cicatrizal por los distintos tratamientos que se quieran emplear en las primeras fases de la cicatrización (día 7).

## Material y métodos

Se han utilizado 23 conejos de Nueva Zelanda, machos y hembras, con pesos comprendidos entre 2 y 2,5 kg, proporcionados por el animalario de la Universidad del País Vasco (UPV). La primera serie (n = 9) se utilizó para elegir el día de estudio de la cicatriz; la segunda serie (n = 7) se destinó al estudio de la línea alba normal y en la tercera (n = 7), se estudiaron los diferentes parámetros en cicatrices de la línea alba.

Los animales fueron premedicados con Combelén® (0,10 ml/kg i.m.). La anestesia se indujo con Ketamina® (50 mg/kg i.m.) y diazepam (2,5 mg/kg i.m., hasta un máximo de 5 mg). Tras practicar una pequeña incisión laparotómica de aproximadamente 4 cm de longitud, la pared abdominal se suturó con sutura continua de Vitalon 3/0 (How Medica Inc.). La piel se suturó con sutura continua de seda 3/0. Posteriormente los animales permanecieron en sus jaulas con libre acceso al pienso y al agua.

De la primera serie, tres animales fueron sacrificados el día 5, tres el día 7 y tres el día 10. Los animales de la segunda y tercera serie se sacrificaron al séptimo día. Todos fueron sacrificados mediante una sobredosis barbitúrica, siguiendo las normas dictadas por el Real Decreto 223/1988 sobre protección de los animales utilizados para experimentación. A continuación se extrajeron las cicatrices de la línea alba y las muestras destinadas a estudios histológicos, fijándose en formol al 10 % para su posterior inclusión en parafina. De cada muestra se obtuvieron 6 secciones histológicas de 5 µ de espesor, montándose tres cortes en cada portaobjetos. Uno de los portaobjetos fue teñido con hematoxilina-eosina, y el otro con reactivo de Schiff según el método de Feulgen.

Las muestras teñidas con hematoxilina-eosina se destinaron a la cuantificación de la densidad fibroblástica y del porcentaje de área ocupada por vasos, y las teñidas con el reactivo de Schiff al estudio del ADN nuclear de los fibroblastos.

### Densidad fibroblástica

Para llevar a cabo el recuento de fibroblastos en la cicatriz se ha utilizado un equipo compuesto por un microscopio óptico, una lente de proyección (Mipro 125 mm Kpl, Carl Zeiss) y una mesa digitalizadora (DT 1.000 Graphtec, Tokyo) controlada por un microprocesador (Olivetti M-20).

La densidad fibroblástica se ha valorado en tres campos de 622 µ de diámetro (salvo en los casos en los que el tamaño de la muestra no ha permitido considerar más que uno o dos). Para ello se ha contabilizado el número de fibroblastos directamente

sobre la imagen proyectada de dichos campos en la mesa digitalizadora. Dicha proyección se obtiene utilizando un objetivo 32x, que al proyectar la imagen sobre la mesa digitalizadora ha proporcionado un aumento global de 371x; de esta manera, los campos medidos (622 µ de diámetro real) se han visualizado en un círculo de 231 mm de diámetro. Sobre estas mismas proyecciones se ha cuantificado también el área correspondiente a tejido cicatrizal.

Para cada zona medida se ha calculado el número de fibroblastos por cada 1.000 unidades arbitrarias de área. La media de los tres valores obtenidos de cada cicatriz se ha utilizado como índice de la densidad fibroblástica de dicha cicatriz.

### Cuantificación del área cicatrizal ocupada por vasos

El estudio del desarrollo vascular en la cicatriz se ha realizado sobre las mismas preparaciones utilizadas para el recuento de fibroblastos y con idéntico equipamiento.

Utilizando una imagen proyectada similar a la descrita anteriormente (371x), se ha dibujado sobre la mesa digitalizadora el perfil de cada vaso y el de la cicatriz. A partir de estos dibujos, y por un método de integración, se ha calculado la superficie de cada vaso, así como el área vascular total y la correspondiente al tejido cicatrizal. Se obtiene así el porcentaje de área cicatrizal ocupada por vasos.

### Cuantificación del ADN nuclear

Para la cuantificación de la actividad reduplicativa de los fibroblastos se han teñido las muestras con el reactivo de Schiff según el método de Feulgen. Esta reacción tiene la característica de ser absolutamente específica del ADN nuclear y de tipo estequiométrico. Es decir, existe una relación directa entre la cantidad de colorante y la cantidad de ADN en el núcleo celular.

El contenido en ADN de los núcleos celulares se ha medido mediante un microespectrofotómetro VSM-0.5 (Carl Zeiss, Oberkochen) controlado *on line* por un ordenador Olivetti M-20, dotado de una platina monitorizada de 0,25 µ de resolución.

En cada preparación se han cuantificado 100 núcleos de fibroblastos, distribuyéndose los valores así obtenidos en un histograma de frecuencias. Sobre dicho histograma, y siguiendo el método de Bartel, se han ajustado dos curvas de Gauss. En la primera de ellas quedan incluidos los núcleos con un contenido de ADN 2C, englobándose en la segunda los que, por haber iniciado la reduplicación de su material genético, han alcanzado cifras superiores (fig. 1).

A continuación, y por un método de integración, se ha establecido la superficie de cada una de las curvas (S1 y S2), calculándose la proporción existente entre ambas; esto representa el porcentaje de fibroblastos en fase de síntesis:

$$\% \text{Fs} = \frac{S1}{S1 + S2} \times 100$$

### Tensiometría

Para el estudio tensiométrico se extrajeron de cada cicatriz, previo marcaje con una cinta métrica, dos tiras de un cm de anchura que se mantuvieron sumergidas en suero fisiológico para evitar retracciones hasta el momento de la medición,

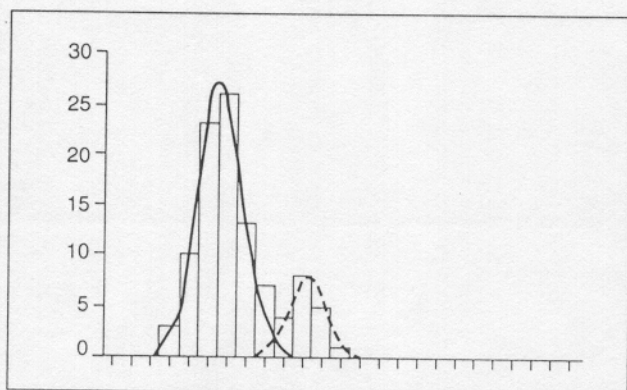


Fig. 1. Contenido de ADN nuclear de los fibroblastos. Histograma de frecuencias correspondiente a una cicatriz.

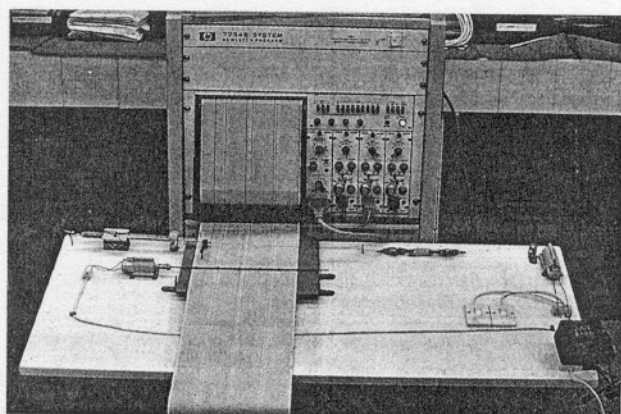


Fig. 2. Tensiómetro empleado para valoración de la resistencia tensional.

que siempre se realizó escasos minutos después de obtenida la muestra.

La resistencia tensional se ha valorado mediante un tensiómetro de diseño propio. El instrumento se fundamenta en un motor eléctrico que proporciona una fuerza de tracción constante de 0,147 Newtons/seg. En el otro extremo del aparato se encuentra fijado un dinamómetro, en cuya parte móvil está articulada una plumilla que se desplaza sobre un papel milimetrado que avanza a una velocidad constante de 0,25 cm/seg. Entre ambos elementos se fija la cicatriz mediante dos mordazas ancladas, una en el dinamómetro y otra en el motor (fig. 2).

Se consigue así una gráfica en la que en las ordenadas se representa la fuerza expresada en Newtons y en las abscisas el tiempo transcurrido. El instante de la rotura queda registrado por el brusco descenso de la gráfica (fig. 3).

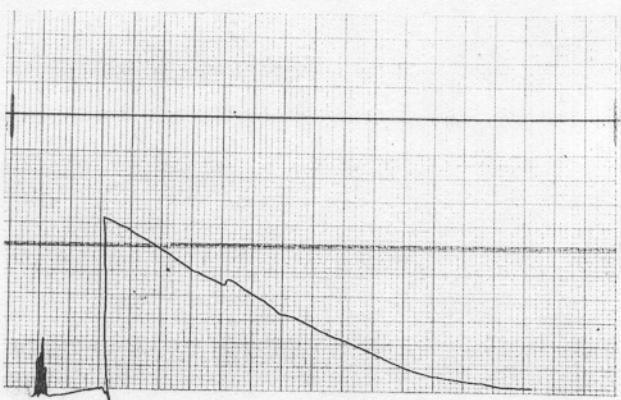


Fig. 3. Estudio tensiómetro de una cicatriz. Registro gráfico obtenido.

#### Análisis estadístico

Atendiendo a la distribución no normal de los resultados, las comparaciones realizadas entre las distintas series experimentales se han llevado a cabo utilizando un test no paramétrico: el *Rank Sum Test*. Se han considerado diferencias significativas aquellas con una  $p < 0,05$ .

#### Resultados

La primera serie de animales se utilizó para la elección del día de estudio del proceso cicatrizal. En las cicatrices de 5 días de evolución se observó un excesivo componente de células inflamatorias que dificultaba la identificación y el recuento de los fibroblastos, células objeto de estudio.

En cambio, en las preparaciones obtenidas a los 10 días de producida la herida, la respuesta inflamatoria había cedido. Sin embargo, para entonces el proceso de formación de fibras colágenas estaba muy avanzado, lo que dificultaba el exceso la cuantificación de los fibroblastos.

Las mejores imágenes correspondieron a las cicatrices estudiadas al final de la primera semana. En este momento, las células inflamatorias eran ya escasas, lo que permitía la medición de la población fibroblástica. Por otra parte, los fibroblastos apenas habían iniciado la síntesis de colágeno. Por todas estas razones, éste fue el día que resultó elegido para la realización de nuestro estudio.

Los resultados del recuento de fibroblastos se recogen en la tabla 1. Como puede apreciarse en dicha tabla, la mayor densidad fibroblástica se observa en la línea alba normal (26,66), mientras que en el séptimo día de evolución de la cicatriz este parámetro apareció disminuido de forma sensible (13,16), siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,0003$ ).

El porcentaje de duplicación de los fibroblastos, recogido en la tabla 2, muestra mayor actividad en las cicatrices al séptimo día (21,80) que la observada en la línea alba normal (10,29). La diferencia alcanza significación estadística ( $p = 0,0189$ ).

La tabla 3 refleja los resultados de la cuantificación del porcentaje del área total ocupada por vasos. Puede observarse la escasa vascularización de la línea alba normal en comparación con las cicatrices (0,404 vs 3,436;  $p = 0,0003$ ).

La cuantificación de la resistencia tensional en las cicatrices al séptimo día de evolución ha mostrado un margen de variación muy amplio entre los diferentes animales (tabla 4); sin embargo, las mediciones realizadas en muestras de una misma cicatriz han proporcionado resultados muy similares en todos los casos.

#### Discusión

La mayor parte de los estudios sobre cicatrización se han llevado a cabo en pequeños roedores (rata, ratón y cobayo), y

TABLA 1. Descriptores estadísticos del estudio de densidad fibroblástica en la cicatriz

	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Línea alba	26,66	5,736	27,30	19,00	32,70
Cicatriz	13,16	2,811	13,20	9,30	16,80

TABLA 2. Descriptores estadísticos del estudio de la actividad reduplicativa de los fibroblastos en la cicatriz

	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Línea alba	10,29	9,443	6,29	2,10	27,90
Cicatriz	21,80	6,330	21,60	13,98	32,30

TABLA 3. Descriptores estadísticos del estudio del porcentaje de área cicatrizal ocupada por vasos

	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Línea alba	0,404	0,189	0,423	0,128	0,668
Cicatriz	3,436	0,903	3,644	1,659	4,391

TABLA 4. Descriptores estadísticos del estudio de la resistencia tensional

	Media	DE	Mediana	Mínimo	Máximo
Control	7,642	3,325	7,25	2,80	12,00

Los valores se expresan en Newtons.

sobre heridas practicadas en el dorso de los mismos<sup>4</sup>. Los parámetros estudiados habitualmente en dichos trabajos son la cuantificación del depósito de hidroxiprolina en esponjas de polivinilo<sup>3,4</sup> y la medición de la resistencia tensional de la cicatriz cutánea<sup>6</sup>.

Este tipo de técnicas no condiciona el tamaño del animal, y la elección del dorso se justifica porque facilita el implante de las esponjas y la aplicación de los distintos tratamientos. Sin embargo, nuestro modelo se orienta de manera fundamental al estudio de las poblaciones celulares en el tejido cicatrizal. Por ello, resulta muy útil disponer de una muestra amplia de tejido, así como de unas referencias exactas para una buena orientación de las secciones histológicas.

A la luz de estas consideraciones optamos por utilizar animales de mayor tamaño (conejo de Nueva Zelanda), y trasladar la zona de estudio a la línea alba de la pared abdominal, ya que los fibroblastos son el único componente celular en esta región anatómica. Además, la cicatriz a estudiar queda aislada de una manera más efectiva de las influencias del medio externo.

Otro aspecto a considerar es la elección del momento evolutivo del proceso de cicatrización óptimo para el estudio de las poblaciones fibroblásticas. Mientras algunos autores estudian el proceso en el séptimo día<sup>3,6,7</sup> la gran mayoría lo retrasa hasta la segunda, tercera o cuarta semana<sup>1,2,4,5-7,9</sup>. Como nuestro objetivo se centra en buscar un modelo que permita el estudio de las poblaciones fibroblásticas, se hacía aconsejable la elección de un momento en que estas células predominaran, tanto sobre las células inflamatorias, como sobre los depósitos de colágena. Los

fibroblastos comienzan a aparecer en la herida al tercer día y alcanzan su máxima población celular al décimo día<sup>10,11</sup>.

Tras un estudio histológico de las cicatrices producidas en la línea alba del conejo de Nueva Zelanda en los días quinto, séptimo y décimo, pudimos constatar que las cicatrices al séptimo día eran las que mejor se ajustaban a los requerimientos anteriormente citados, siendo este día, por lo tanto, el momento elegido.

Todos los trabajos consultados estudian las modificaciones producidas en el tejido cicatrizal en las últimas fases del proceso, referidas sobre todo a las alteraciones en los depósitos de hidroxiprolina o de la resistencia tensional. No hemos encontrado trabajos en la literatura que realicen cuantificaciones morfológicas de la población fibroblástica del tejido cicatrizal.

En cuanto al índice de duplicación de los fibroblastos, sólo hemos encontrado una cita en la que se estudia la actividad proliferativa de los fibroblastos durante la cicatrización. Se trata de un trabajo publicado por Werbin et al en 1983, en el que estudian las modificaciones producidas por la esplenectomía en esta actividad<sup>12</sup>. Para ello se cuantificó la incorporación de timidina tritiada en cicatrices de laparotomía. Si bien es cierto que el uso de este isótopo como medidor de la síntesis de ADN está ampliamente aceptado, no carece de inconvenientes. Quizá el más importante sea su poca especificidad, ya que tal como se utiliza no permite distinguir la estirpe celular a la que corresponde dicha actividad. Por otra parte, exige variaciones importantes para alcanzar significación estadística.

Debido a estas consideraciones, hemos elegido una técnica que permite la cuantificación directa del ADN sobre células individuales, en este caso concreto sobre los fibroblastos. La citofotometría permite estudiar individualmente el contenido en ADN de los núcleos de cada uno de los fibroblastos, con exclusión de otras estirpes celulares que, estando presentes en la preparación, pudieran alterar los resultados.

Los diferentes tratamientos utilizados de forma experimental en la literatura para alterar el proceso de cicatrización, anticuerpos monoclonales antilinfocitos T<sup>1,13</sup>, animales congénitamente atímicos<sup>2,5</sup>, fármacos inmunosupresores<sup>3,4,6,9</sup>, estimuladores de los linfocitos T como la arginina<sup>14</sup>, ejercen su acción, o al menos la instauran, de forma previa o simultánea a la producción de la cicatriz. Sin embargo, sus efectos se han valorado en el extremo final de la cadena mediante la cuantificación del depósito de hidroxiprolina (indicador de la síntesis de colágeno) y de la resistencia tensional que refleja la combinación entre la producción y la maduración de colágeno. Es decir, reflejan las alteraciones finales del colágeno, y no cuál es el punto de la cadena de producción del mismo que se encuentra afectado.

Dicho de otra forma, estas cuantificaciones no detectan si las posibles alteraciones que se pudieran producir en la síntesis de colágeno se deben a una alteración en el número de fibroblastos o si se trata de una producción alterada de colágeno por un número normal de fibroblastos.

Y lo mismo cabe considerar respecto de la angiogénesis en el tejido cicatrizal. El desarrollo de una trama vascular adecuada es imprescindible tanto para la proliferación de los fibroblastos como para la producción de colágeno por los mismos. La técnica empleada en este trabajo permite valorar este aspecto del proceso cicatrizal de una manera objetiva y numérica, lo que aumenta la expresividad de los estudios al permitir la utilización de análisis estadísticos más potentes.

Con respecto al último parámetro estudiado (la resistencia tensional), llama la atención la gran variación individual. Es

cierto que, desde un punto de vista conceptual, resulta útil, ya que "enjuicia" la eficacia de la cicatrización en su conjunto. Ahora bien, al diseñar el tamaño de las series experimentales es necesario tener en cuenta la importante desviación estándar que presenta: o bien sólo se aceptan como significativas modificaciones muy amplias, o bien se utilizan grandes cantidades de animales.

Con el modelo experimental propuesto, podremos detectar, mediante la cuantificación de la resistencia tensional, alteraciones globales en la cicatrización. Utilizando, además, los valores de densidad fibroblástica y del índice de reduplicación de los fibroblastos es posible estudiar si dichas alteraciones en la resistencia tensional se deben a modificaciones de estas células. Por otra parte, caso de confirmarse alguna alteración, ésta podría estar influenciada por posibles modificaciones en la neovascularización de la cicatriz, modificaciones que se estudian cuantificando la superficie vascular ocupada por vasos.

Por todo ello nos parece interesante el modelo experimental que proponemos, ya que puede aportar conclusiones de interés en cuanto a qué niveles del proceso cicatrizal se producen las alteraciones inducidas por los distintos mecanismos que podemos utilizar para su estudio.

#### Bibliografía

1. Barbul A, Breslin RJ, Woodyard JP, Wasserkrug HL, Efron G. The effect of *in vivo* T Helper and T suppressor lymphocyte depletion on wound healing. *Ann Surg* 1989; 209:479-483.
2. Barbul A, Shawe T, Rotter SM, Efron JE, Wasserkrug HL, Badawy SB. Wound healing in nude mice: A study on the regulatory role of lymphocytes in fibroplasia. *Surgery* 1989; 105:764-769.
3. Nemlander A, Ahonen J, Wiktorowicz K et al. Effect of cyclosporine on wound healing. *Transplantation* 1983; 36:1-6.
4. Fishel R, Barbul A, Wasserkrug HL, Penberthy LT, Rettura G, Efron G. Cyclosporine A impairs wound healing in rats. *J Surg Res* 1983; 34:572-575.
5. Barbul A, Shawe T, Frankel HL, Efron JE, Wasserkrug HL. Inhibition of wound repair by thymic hormones. *Surgery* 1989; 106:373-377.
6. Eisinger ER, Sheil AG. A comparison of the effects of cyclosporin A and standard agents on primary wound healing in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1985; 160:135-138.
7. Recker F, Marquardt K, Redha F, Uhlshmid G, Largaider F. Cyclosporine A impairs wound healing of ureterocystoneostomy in rats. Scanning electron microscopic examination. *Urol Res* 1989; 17:21-26.
8. Breslin RJ, Wasserkrug HL, Efron G, Barbul A. Suppressor cell generation during normal wound healing. *J Surg Res* 1988; 44:321-325.
9. Goldberg M, Lima O, Morgan E et al. A comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 85:821-826.
10. Falanga V, Zitelli JA, Eaglstein WH. Wound healing. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19:559-566.
11. Kenyon AJ, Ramos L, Michaels EB. Histamine-induced suppressor macrophage inhibits fibroblast growth and wound healing. *Am J Vet Res* 1983; 44:2.164-2.166.
12. Werbin N. The spleen and wound healing. *Eur Surg Res* 1983; 15:73-78.
13. Abrham D, Ince T, Muir H, Olsen I. Fibroblast matrix and surface components that mediate cell-to-cell interaction with lymphocytes. *J Invest Dermatol* 1989; 93:335-340.
14. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* 1990; 108:331-337.