

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS**

**DEPÓSITO DE COLÁGENO EN LA REPARACIÓN DE LESIONES TÉRMICAS EN  
PIEL DE CERDOS TRATADAS CON PELÍCULAS DE QUITOSANO O  
TEGADERM®.**

Memoria de Título presentada como parte  
de los requisitos para optar al TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO

**NICOLÁS IGNACIO PORRAS JIMÉNEZ**

**VALDIVIA-CHILE**

**2010**

**PROFESOR PATROCINANTE**

Dr. Javier Ojeda O.

Nombre

Firma

**PROFESOR COPATROCINANTE**

Dr. Enrique Paredes H.

Nombre

Firma

**PROFESOR COLABORADOR**

Dr. Manuel Moroni R.

Nombre

Firma

**PROFESORES CALIFICADORES**

Dra. Sara Rodríguez C.

Nombre

Firma

Dra. Ana Alfaro O.

Nombre

Firma

**FECHA DE APROBACIÓN:**

22 de Septiembre de 2010

Dedicado a mis padres: María Virginia y Pedro Antonio.

## ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
5. RESULTADOS.....	14
6. DISCUSIÓN.....	22
7. BIBLIOGRAFÍA.....	27
8. AGRADECIMIENTOS.....	31

## 1. RESUMEN

Quitosano es un biopolímero derivado de la quitina, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Ha sido ampliamente estudiado en diferentes áreas de la biotecnología debido a su estructura, que le otorga propiedades múltiples como biomaterial. En la ingeniería de tejidos se ha descrito su uso como matriz para el cultivo de diferentes tipos celulares y se le atribuyen importantes propiedades reparadoras, tales como: acelerar el tejido de granulación, la reepitelización y promover la liberación de factores de crecimiento.

El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad de quitosano para acelerar el depósito de colágeno, disminuir el área de retracción cicatrizal e influir en el infiltrado leucocitario de lesiones térmicas en un modelo animal. Para tal efecto, se utilizaron 4 cerdos de raza Landrace con un peso promedio de 22 kg. Previamente anestesiados, se les realizó 8 quemaduras parciales a profundas (tipo II/III) de 4 cm<sup>2</sup> cada una en la zona del lomo, 4 en el lado izquierdo y 4 en el lado derecho. Luego, se aplicaron películas de quitosano de producción nacional sobre las quemaduras del lado izquierdo, mientras que en el lado derecho, se utilizaron apósitos de Tegaderm<sup>®</sup>, poliuretano utilizado como cobertura cutánea oclusiva en pacientes con quemaduras parciales a profundas, a fin de comparar su efecto con las películas de quitosano. En los días 7, 21, 60 y 90 posterior a las quemaduras se midió el área de retracción cicatrizal y se realizaron biopsias a fin de establecer el depósito de colágeno utilizando la tinción Tricrómico de Masson y el infiltrado leucocitario con Hematoxilina Eosina. Se determinó, que las películas de quitosano no indujeron rechazo por parte del tejido, presentando una buena adhesión y degradación. Además no se presentaron procesos patológicos fibroproliferativos como queloides y cicatrices hipertróficas. También se estableció que las películas de quitosano y los apósitos de Tegaderm<sup>®</sup> no presentaron diferencias significativas en el depósito de colágeno y el área de retracción cicatrizal durante el ensayo ( $P > 0,05$ ), y que además los tratamientos no tuvieron mayor influencia sobre el infiltrado leucocitario. Los resultados sugieren, que la reparación de quemaduras tipo II/III en cerdos tratados con quitosano o Tegaderm<sup>®</sup> son similares. Aun así, se debe continuar con las investigaciones, sobre todo *in vivo*, con el fin de reunir más antecedentes y mejorar la acción de las películas de quitosano.

**Palabras claves:** quitosano, Tegaderm<sup>®</sup>, quemaduras, colágeno, área de retracción cicatrizal, cerdos.

## 2. SUMMARY

### COLLAGEN DEPOSITION IN BURNED PIGS TREATED WITH CHITOSAN FILMS OR TEGADERM®

Chitosan is a biopolymer derived from chitin, the second most abundant polysaccharide in nature after cellulose. It has been widely studied in different areas of biotechnology because of its structure, which gives multiple properties as a biomaterial. In tissue engineering described its use as a matrix for culture of different cell types and is attributed to important repair properties, such as accelerating granulation tissue, reepithelialization and promote the release of growth factors. The aim of this study was to determine the ability of chitosan to accelerate collagen deposition, reduce the scar retraction area and also measure the leukocyte infiltrate. For this purpose, used 4 Landrace pigs with an average weight of 22 kg. Previously anesthetized, 8 burns of 4 cm<sup>2</sup> were performed (type II / III) on the back, 4 on the left side and 4 on the right side. Then, national chitosan films were applied on the left side, while on the right side were used Tegaderm® dressings, a polyurethane cover first elected in patients with partial-deep thickness burns, to compare the effect of chitosan films. On days 7, 21, 60 and 90 after of injury, the scar retraction was measured and biopsies were performed to establish collagen deposition using Masson's Trichrome staining and leukocyte infiltration using Hematoxylin Eosin. It was found that films did not induce tissue rejection, showing a good adhesion and degradation. In addition there were no pathologic fibroproliferative reaction as keloids and hypertrophic scars. It was also established that the films of chitosan and Tegaderm® dressings showed no significant differences in collagen deposition and scar retraction area during the test ( $P > 0.05$ ), also treatments did not have much influence on leukocyte infiltration. The results suggest that repair of burns treated with chitosan can be as good as those treated with Tegaderm®, nevertheless, is necessary to continue with the investigations, especially *in vivo*, in order to gather more background and improve the action of the chitosan films.

**Keywords** : chitosan, Tegaderm®, burns, collagen, scar retraction area, pigs.

### 3. INTRODUCCIÓN

Las lesiones por quemaduras producen un reto fisiológico y psicológico más que otro tipo de lesión. Se define quemadura como la destrucción de los tegumentos, incluso de los tejidos subyacentes, bajo efecto de un agente térmico, eléctrico, químico o radiactivo (Gallardo y col 2000). Cuando ocurre un accidente de este tipo el primer órgano afectado es la piel, por lo tanto, es fundamental conocer su estructura y función para preveer los posibles cambios que ocurrirán en el organismo (Garcés 1995).

#### 3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA PIEL

La piel es un órgano de vital importancia. Es el más grande del cuerpo, llegando a representar casi 2 m<sup>2</sup> de superficie y el 30% del peso total en un hombre adulto (Cordero 1996). Ocupa una posición de frontera o interfase limitando el cuerpo del medio externo y desempeña varias funciones importantes, en especial de protección:

- Actúa como barrera que se opone a las pérdidas hidroprotéicas manteniendo el medio interno y protege al organismo de las agresiones físicas, químicas y microbiológicas.
- Importante en la termorregulación pues conserva el calor mediante vasoconstricción y su propia estructura aislante; enfría por vasodilatación y evaporación del sudor.
- Constituye una considerable protección contra los rayos ultravioleta potencialmente peligrosos, gracias a la melanina, pigmento producido por los melanocitos, y la queratina, producida por los queratinocitos (Cordero 1996, Pastrana 2002).
- Posee millares de terminaciones nerviosas distribuidas en su superficie, fundamental para la percepción.
- Interviene en el metabolismo de importantes moléculas, entre ellas, la síntesis de vitamina D, y participa en la vigilancia inmunológica (Pastrana 2002, McCalmont 2007).

Histológicamente está constituida por tres capas superpuestas, que de la superficie a la profundidad son: la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido subcutáneo (Cordero 1996, Pastrana 2002). La epidermis se encuentra en contacto directo con el aire relativamente seco, es un epitelio escamoso estratificado queratinizado, avascular, en constante regeneración. Posee varios tipos celulares, sin embargo predominan los queratinocitos (90%) cuya función primordial consiste en formar la capa córnea (barrera epidérmica) desde el punto de vista anatómico, y en sintetizar una serie de queratinas desde el punto de vista bioquímico (Cordero 1996). La dermis, también llamada corion, representa un tejido conectivo diferenciado constituido por células, fibras y sustancia fundamental amorfa. Se encuentra vascularizada,

brindando el soporte nutricional a la epidermis. Es rica en anexos cutáneos (aparatos pilosebáceos, glándulas sudoríparas) y estructuras nerviosas. Se une a la epidermis a través de la membrana basal que se dispone en una modalidad ondulatoria para incrementar la superficie de unión entre las dos estructuras (Pastrana 2002, McCalmont 2007). El fibroblasto representa la población celular principal y característica de la dermis. Mantiene la cantidad relativa normal de todos los componentes de la matriz extracelular (fibras y sustancia fundamental amorfa), interviene también en las reacciones inflamatorias y en la formación-contracción del tejido de granulación durante el proceso de cicatrización de heridas. La mayor parte de las proteínas fibrosas estructurales de la dermis están compuestas de colágeno tipo I, principalmente en dermis reticular o profunda, y colágeno tipo III, en la dermis papilar o superficial. Una red de microfibrillas elásticas también está entretrejida en todo el grosor dérmico. La sustancia fundamental amorfa está compuesta de agua, electrolitos, proteínas plasmáticas y mucopolisacáridos. La hipodermis por su parte, está constituida por voluminosos lóbulos de adipositos o lipocitos, separados por tractos conjuntivos. Entre sus funciones destacan: la de protección física contra el trauma, aislante en cuanto a la temperatura y de reserva energética (Cordero 1996, Pastrana 2002).

### **3.1.1. Reparación de heridas en piel**

La reparación de heridas en piel es un proceso dinámico, que involucra la interacción de mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células del parénquima. Las etapas de la reparación se dividen básicamente en: inflamación, formación del tejido y remodelación del tejido, las cuales van ocurriendo simultáneamente (Martin 1997, Singer y col 1999).

Cuando se produce una lesión en la piel, muchas veces se pierde la integridad de los vasos sanguíneos de la zona, con la consecuente extravasación de los componentes sanguíneos. La formación de un coágulo restablece la hemostasis y provee de un medio provisorio para la migración celular (Singer y col 1999). Las plaquetas se activan y secretan factores de crecimiento denominados factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF) que atraen y activan macrófagos y fibroblastos a la zona. La activación de macrófagos en la lesión conlleva a la liberación de mediadores como: factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas 1 y 8 (IL 1, IL8), factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante  $\alpha$  y  $\beta$  (TGF  $\alpha$  y  $\beta$ ), entre otros, que atraen y activan leucocitos inflamatorios y células del parénquima, iniciando la formación del tejido de granulación (Martin 1997, Singer y col 1999).

La reepitelización comienza pocas horas después de la herida. Ocurren cambios fenotípicos importantes en las células epidérmicas circundantes, principalmente hay disolución de desmosomas y hemidesmosomas, formación de filamentos de actina citoplasmáticos y expresión de receptores integrinas, todo lo cual facilita el movimiento celular y la interacción con proteínas de la matriz, como fibronectina y vitronectina, permitiendo finalmente separar la herida en costra y tejido viable (Martin 1997, Singer y col 1999).

En el proceso de formación de nuevo estroma, cuyo objetivo final es la producción de colágeno, ocurre migración de macrófagos, células endoteliales y fibroblastos, los cuales



permiten la expresión de factores crecimiento como PDGF, TGF  $\beta$ , vascular-endotelial (VEGF) que estimulan la fibroplasia y la angiogénesis. Cuando la producción de colágeno se detiene, el proceso finaliza y ocurre apoptosis de fibroblastos (Singer 1999).

En la contracción de la herida, los fibroblastos cambian fenotípicamente a miofibroblastos, que interactúan con la matriz extracelular y citoquinas, comenzando con la compactación del tejido conectivo. La liberación de metaloproteinasas por parte de los fibroblastos, macrófagos, células epidérmicas y endoteliales colabora con la degradación y remodelación del colágeno (Martin 1997, Singer y col 1999).

### **3.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS QUEMADURAS**

El daño en la piel por quemaduras, especialmente las profundas y extensas, provocan un importante cambio en la homeostasis del organismo. La quemadura es una lesión tisular de carácter inflamatorio y que además puede involucrar la destrucción de los tejidos en distintos grados (Garcés 1995, Iribarren 1996). La muerte celular puede ocurrir por dos mecanismos: la coagulación protoplasmática por acción directa del agente y por isquemia prolongada secundaria a la coagulación intravascular (Garcés 1995). En la zona amagada hay una serie de alteraciones fisiopatológicas que inicialmente afectan al espacio vascular. La liberación masiva de sustancias vasoactivas condicionan alteraciones que en orden progresivo se traducen en vasodilatación, alteración de la permeabilidad de los endotelios capilares y, en los grados máximos, la coagulación intravascular (Garcés 1995, Hettiaratchy y Dziewulski 2004). Estos fenómenos suelen entremezclarse, y marcan las características semiológicas de la quemadura, su evolución y también su curso destructivo o reversible. Cuando las sustancias vasoactivas locales entran en circulación pueden producir fenómenos similares en el resto del organismo (Hettiaratchy y Dziewulski 2004). Su magnitud está en relación directa con la extensión de la quemadura. Cuando la superficie quemada es muy extensa, por lo general sobre un 25% en adultos, estos fenómenos son de tal intensidad que llevan a un desequilibrio hemodinámico y metabólico tal que, sin una reposición oportuna y equilibrada en cuanto a volumen y velocidad, se pueden hacer irreversibles llevando a la muerte (Iribarren 1996, Hettiaratchy y Dziewulski 2004).

La valoración de la profundidad y extensión de la quemadura son relevantes. La profundidad se puede establecer básicamente a través de evaluación clínica y parámetros generalmente reconocidos. Existen 4 niveles de clasificación (Atiyeh y col 2005): epidérmicas (tipo I), dérmicas superficiales (tipo IIa), dérmicas profundas (tipo IIb) y subdérmicas (tipo III). En las epidérmicas hay destrucción de la capa más superficial de la piel, se caracteriza por ser eritematosa, no exudativa, pruriginosa y sin ampollas. En las dérmicas superficiales se conservan generalmente los folículos pilosos y glándulas sebáceas, son de aspecto hiperémico, exudativo, con formación de ampollas y muy dolorosas. En tanto, las dérmicas profundas se conservan escasos restos de folículos pilosos y glándulas sebáceas, son exudativas, forman menos ampollas y el fondo es moteado con áreas eritematosas y otras nacaradas. Las subdérmicas tienen un aspecto que oscila dependiendo del mecanismo de producción, entre el aspecto carbonáceo y blanco anacarado, son indoloras debido a la pérdida total de terminaciones nerviosas. La extensión se puede determinar por medio de la regla de los “9” de

Wallace, mediante la cual se considera que las distintas regiones anatómicas de un hombre adulto representan un 9% cada una o un múltiplo de 9% de la superficie corporal total. Posteriormente Lund y Browder adaptaron esta escala para clasificar la extensión de las quemaduras en pacientes pediátricos (Figura 1a, b) (Garcés 1995, Gallardo y col 2000). Otra forma práctica de estimar la extensión es por medio de la palma cerrada del paciente, que representa el 1% de la superficie corporal (Gallardo y col 2000).

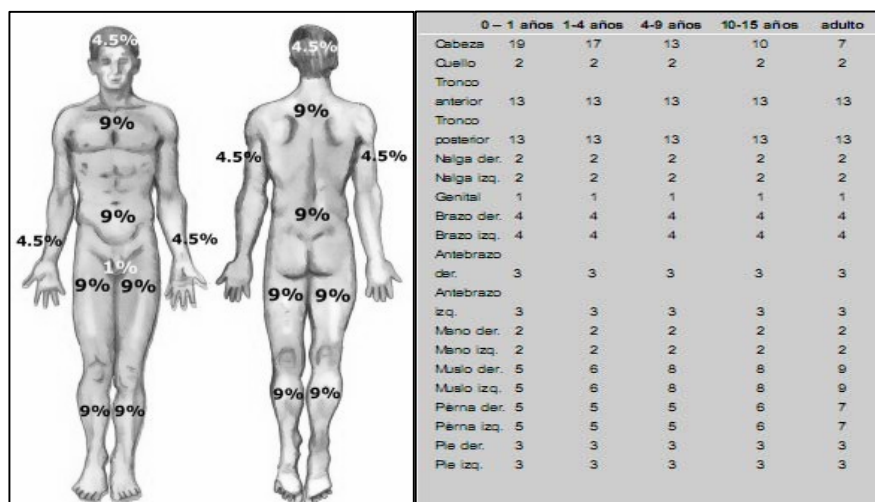


Figura 1. a) Regla de los "9" de Wallace. b) Escala de Lund-Browder.

### 3.3. COBERTURAS CUTÁNEAS

Con el conocimiento existente sobre las consecuencias hemodinámicas que pueden provocar las quemaduras extensas, ha disminuido considerablemente la mortalidad en estos pacientes. Las complicaciones sépticas y metabólicas como consecuencia de la permanencia de la escara en la lesión, que invariablemente cursa con infección de mayor o menor importancia, resultan actualmente en la mayor causa de morbimortalidad (Čakir y Yeğen 2004). Para solucionar este problema es que hoy en día, junto con las medidas de tipo general, se favorece la epitelización de lesiones superficiales e intermedias, se practica la resección de la escara y se realiza la cobertura precoz de las quemaduras profundas mediante injertos de piel o sustitutos de ella, determinando así la solución del principal problema local del quemado extenso, causa de sus importantes problemas sistémicos (Singer y col 1999, Čakir y Yeğen 2004).

Está comprobado desde hace años, que la mantención de un medio ambiente húmedo en las lesiones favorece una cicatrización más rápida que un medio ambiente seco, es por esto que se hace necesario evitar las pérdidas por evaporación y exposición del tejido dañado al aire relativamente seco (Singer y col 2000<sup>a</sup>). Para la cobertura de la lesión existen diferentes alternativas. Una de ellas es el autoinjerto, usado principalmente en quemaduras profundas. Implica la transferencia de piel del mismo individuo a la zona lesionada, permitiendo un cierre cutáneo definitivo. También, como cobertura cutánea definitiva, se utiliza epidermis cultivada (cultivo de queratinocitos) del propio individuo (Azócar 1995, Atiyeh y col 2005). Otra

alternativa es el aloinjerto que corresponde a piel de otra persona (donante vivo, muerto o cultivo epidérmico) y el xenoinjerto que corresponde a piel de otra especie (comúnmente piel de cerdo), ambas también se utilizan en lesiones profundas, permitiendo una cobertura cutánea transitoria a la espera de un autoinjerto o de epidermis cultivada (Azócar 1995, Atiyeh y col 2005).

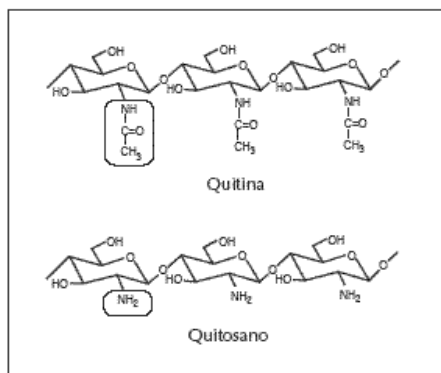
Existe también una serie de biomateriales y elementos sintéticos que se utilizan como sustitutos de piel. Proveen una cobertura cutánea transitoria a la espera de autoinjertos o cultivos epidérmicos. Aun así, su uso está dirigido principalmente en quemaduras de tipo superficial o intermedio, favoreciendo su epitelización y la mantención de un medio ambiente adecuado para tal proceso (Jones y col 2002, Atiyeh y col 2005). Pueden estar estructurados de forma uni o bilaminar, y tener presentaciones tan variadas como: películas (films) preformadas o en spray, geles, espumas, poliuretanos, etc. (Azócar 1995, Atiyeh y col 2005). Pueden ser utilizados también en combinación con fibroblastos cultivados, colágeno, queratinocitos o sustancias de liberación prolongada (Jones y col 2002, Atiyeh y col 2005).

La evolución de estos materiales es constante. Aparecen nuevos compuestos y combinaciones que mejoran sus capacidades de cobertura, oclusión, epitelización y manipulación. Fundamental es entonces que estos tipos de cobertura reúnan, para permitir una buena reparación, ciertas características como: mantener una correcta oxigenación para crear una buena integración de los tejidos y una apropiada vascularización; debe ser biodegradable, para que el tejido a reparar o reemplazar cubra totalmente la cobertura transitoria; debe otorgar apropiadas condiciones químicas y de humedad para permitir la agregación, proliferación y diferenciación celular; debe poseer propiedades mecánicas adecuadas que permitan movilidad y expansión al tejido ha reconstruir; no debe inducir reacciones de rechazo y debe ser fácilmente fabricado en distintos tipos y tamaños (Hutmacher y col 2001).

### **3.3.1. Quitosano como biomaterial en la cobertura cutánea**

El quitosano es un biopolímero obtenido de la desacetilación alcalina de la quitina. La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Se puede encontrar formando parte como material de soporte del exoesqueleto de insectos y crustáceos, así como también de la pared celular de algunas bacterias y hongos (Şenel y McClure 2004, Freier y col 2005<sup>b</sup>). En la década del 50 se realizaron los primeros estudios que describieron algunas cualidades que presentaba la quitina para reparar heridas. Aun así, pasaron más de 40 años para que este biopolímero y sus derivados despertaran el interés de la comunidad científica por sus potenciales aplicaciones biomédicas (Khor y Lim 2003).

El quitosano y la quitina están compuestos por unidades de N-acetil-glucosamina y N-glucosamina (Figura 2), amino azúcares precursoras de componentes como el ácido hialurónico y otros mucopolisacáridos del tejido conectivo. Cuando el número de unidades de N-glucosamina es mayor al 50%, el biopolímero asume la denominación de quitosano (Khor y Lim 2003, Freier y col 2005<sup>b</sup>).



**Figura 2.** Estructura química de quitina y quitosano.

Quitosano tiene una estructura que le otorga propiedades interesantes para su utilización como biomaterial. Ha sido descrito en importantes aplicaciones farmacéuticas tanto en formulaciones convencionales (como vehículo para la compresión directa de comprimidos, matrices de liberación prolongada de drogas, agente de granulación, preparación de microesferas) como en aplicaciones más novedosas (vacunas, liberación de péptidos, transporte de drogas a través de la mucosa y en terapia génica) (Prahakaran y Mano 2005). De acuerdo al grado de desacetilación (presencia de grupos N-acetil-glucosamina) y su propia estructura lineal, presenta facilidad para ser combinado con una variedad importante de sustancias como alginato, acetato, hidroxiapatita, ácido láctico, polimetilmetacrilato, fosfato de calcio, entre otros (Agnihotri y col 2004, Şenel y McClure 2004). A pH ácido se presenta como un polielectrolito catiónico con alta densidad de carga, lo que le permite interactuar con moléculas cargadas negativamente, incluyendo proteínas, polisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos, varios de los cuales están ubicados en la piel (Şenel y McClure 2004).

En la ingeniería de tejidos se ha utilizado como matriz para el cultivo de variados tipos celulares como fibroblastos, queratinocitos, incluso de células madres, permitiendo una adecuada adhesión, proliferación y viabilidad del tejido. También se ha utilizado en combinación con factores de crecimiento, antibióticos, colágeno, ácido hialurónico, y otras sustancias de la matriz extracelular. Es biodegradable, no tóxico y puede ser fabricado en diversas presentaciones (geles, películas, polvo, fibras, etc.) (Khor y Lim 2003, Freier y col 2005<sup>a</sup>, Alemdaroğlu y col 2006, Shi y col 2006).

En la reparación de heridas varios autores le atribuyen a quitosano y a sus derivados propiedades para acelerar los procesos regenerativos. Ueno y col (2001<sup>a,b</sup>) postulan que las heridas tratadas con quitosano presentan un mayor número de células inflamatorias, lo cual incrementa la remoción del tejido dañado y provee de una mayor cantidad de factores de crecimiento, acelerando la formación del tejido de granulación y la reepitelización. Por su parte, Muzzarelli (2009) postula que las heridas presentan una mejor hemostasis en presencia de quitosano, ya que este material activaría un mayor número de plaquetas para la agregación. Shi y col (2006) por su parte, aseguran que quitosano presenta propiedades antimicrobianas frente a un número importante de bacterias y hongos, aunque su mecanismo de acción no está del todo claro.

De acuerdo con lo descrito en la literatura, quitosano reúne características importantes para ser utilizado como sustituto de piel en la reparación de heridas. Sin embargo, los estudios que describen las propiedades beneficiosas de quitosano fueron realizados en su mayoría en animales de experimentación como roedores e *in vitro*, por lo tanto existe una escasez de estudios comparativos, sobre todo *in vivo*, de este material en la reparación y una escasez de resultados extrapolables a los seres humanos. A partir de estos antecedentes, es que se propone la siguiente investigación.

### **3.4. HIPÓTESIS**

- La aplicación de películas de quitosano sobre lesiones térmicas en piel de cerdos, aumenta el depósito de colágeno.

### **3.5. OBJETIVOS**

#### **3.5.1. Objetivos generales**

- Evaluar la capacidad de las películas de quitosano para acelerar el depósito de colágeno en el tratamiento de lesiones térmicas en piel de cerdo.

#### **3.5.2. Objetivos específicos**

- Demostrar mediante la tinción Tricrómico de Masson el mayor depósito de colágeno en las muestras tratadas con películas de quitosano frente a las tratadas con Tegaderm®.
- Medir y comparar las áreas de retracción cicatrizal de las quemaduras tratadas con películas de quitosano frente a las tratadas con Tegaderm®.
- Medir y comparar el infiltrado leucocitario de las lesiones tratadas con películas de quitosano frente a las tratadas con Tegaderm®.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en las dependencias del Hospital Clínico Veterinario perteneciente al Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile. Todo el trabajo fue realizado bajo la aprobación del comité “Uso de animales en la investigación” de la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile.

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1. Material biológico

Se utilizaron 4 cerdos de raza Landrace con un peso promedio de 22 kg. Los cerdos fueron mantenidos en corrales de 3,6 m x 2,6 m, con piso de viruta y limpieza diaria. Se alimentaron con concentrado tipo crianza y agua *ad libitum*, a excepción de la mañana de los días de procedimiento. El alimento fue ajustado semanalmente de acuerdo al peso (kg) de los cerdos.

La elección del cerdo como animal de investigación se basó principalmente en la similitud que existe entre su piel y la piel del hombre (Sullivan 2001, Hollander y col 2003, Middelkoop y col 2004), lo cual permite generalizar los resultados a los seres humanos, obviamente guardando las proporciones frente a un ensayo clínico en pacientes. Esta similitud es tanto anatómica como fisiológica, pues ambos poseen una gruesa capa epidérmica; poseen un desarrollo importante de crestas epidérmicas y papilas dérmicas; carecen de *panniculus carnosus*; la distribución, tamaño y orientación de los vasos sanguíneos presentes en la dermis es similar; bioquímicamente el colágeno dérmico es muy parecido; y en la reparación de heridas en ambos se favorece la migración de las células epidérmicas para la reepitelización, a diferencia de los pequeños mamíferos en donde se favorece la contracción de la herida (Sullivan y col 2001). La concordancia entre humanos frente a cerdos en la reparación de heridas es de un 78%, superior a los pequeños mamíferos que presentan un 53% y frente a estudios *in vitro* con un 57% (Sullivan y col 2001).

#### 4.1.2. Material de procedimiento

- Películas de Quitosano<sup>1</sup>.
- Apósitos de poliuretano<sup>2</sup>.
- Azaperona<sup>3</sup>.
- Isoflurano.
- Tramadol.
- Clorhexidina 2%.

---

<sup>1</sup> Centro de investigación de polímeros avanzados de la Universidad de Concepción.

<sup>2</sup> Tegaderm® 3M.

<sup>3</sup> Stresnil®, Laboratorio Drag Pharma.

- Suero fisiológico.
- Formalina 10%.
- Máquinas de afeitarse desechables.
- Hojas de bisturí.
- Pinza hemostática curva.
- Plancha de ropa común.
- Indicador de temperatura digital.
- Barra de aluminio.
- Frascos recolectores de muestras con tapa de 100 ml.
- Jeringas de 3 ml y 10 ml.
- Balanza.
- Tubos endotraqueales 9,5 mm.
- Collar isabelino n° 15.
- Algodón.
- Gasa (90x90).

## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.1. Preparación de los animales**

Los cerdos fueron preanestesiados en la sala de preparación del pabellón de cirugía. Para tal efecto, se utilizó Stresnil<sup>®</sup> en dosis de 4mg/kg, aplicación intramuscular. Luego, fueron entubados endotraquealmente para la posterior inducción anestésica. Se administró Tramadol prequirúrgico 4mg/kg intramuscular, para mejorar la analgesia post-quemadura. La zona de los flancos y el lomo fueron afeitadas y la piel fue lavada con clorhexidina al 2%.

### **4.2.2. Realización de las quemaduras**

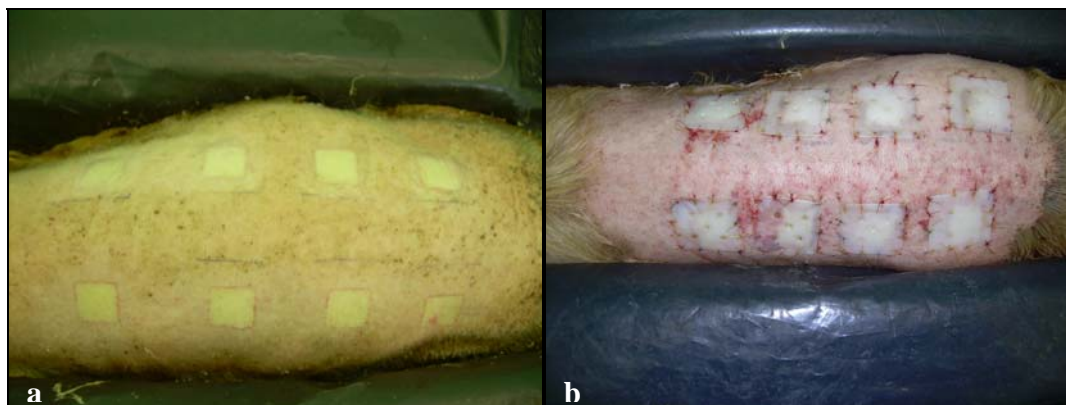
En el pabellón de cirugía, los cerdos se mantuvieron bajo un plano anestésico profundo con isoflurano (0,5% - 2,5%) a temperatura ambiente.

Para la realización de las quemaduras se utilizó una barra de aluminio con un largo de 50 cm y un extremo que toma contacto con la piel de 4 cm<sup>2</sup>. La barra fue calentada con una plancha de ropa común. Cuando el extremo de la barra alcanzó los 100°C se colocó de forma vertical y perpendicular sobre la piel durante 20 segundos con una presión suficiente para que la barra no se cayera y/o se desplazase. Se realizaron en total 8 quemaduras en la zona del lomo, 4 al lado derecho y 4 al lado izquierdo con una separación de 5 cm aproximados entre las lesiones (Figura 3a). Este modelo permite una quemadura de tipo II/III, que afecta al 5% de la superficie corporal (adaptado de Singer y col 2000<sup>b</sup>).

### **4.2.3. Tratamiento de las quemaduras**

Previo al tratamiento, se limpiaron las quemaduras con suero fisiológico para eliminar los restos de piel presentes. Las lesiones provocadas en el lado derecho se trataron con apósitos de Tegaderm<sup>®</sup>, poliuretano utilizado habitualmente como cobertura cutánea oclusiva en pacientes quemados (Singer y col 2000<sup>a</sup>, Phan y col 2005), mientras que las quemaduras del lado izquierdo fueron tratadas con películas de quitosano. Los apósitos de Tegaderm<sup>®</sup> y películas de quitosano respectivamente, fueron cubiertos con gasa estéril y un plástico

fenestrado con una dimensión de 8 cm<sup>2</sup>. Este plástico fue hecho a partir de un collar isabelino n° 15 y fue fijado a la piel con 12 puntos de sutura, 4 en las esquinas y 2 por cada lado (Figura 3b). Posteriormente, para la analgesia los cerdos se trataron con Tramadol 4mg/kg administrados intramuscularmente cada 8 horas durante 5 días.



**Figura 3.** a) Quemaduras en la zona del lomo. b) Quemaduras cubiertas con los productos y el plástico fenestrado.

#### 4.2.4. Biopsias

Para la toma de muestras los cerdos fueron sedados profundamente con Stresnil® (4-6 mg/kg intramuscular). Las biopsias se tomaron los días 7, 21, 60 y 90 posterior a la inducción de las lesiones. Se realizó un corte rectangular con hoja de bisturí que abarcara en los extremos piel sana y en su centro la quemadura, además de la totalidad de su profundidad (hasta el tejido subcutáneo). Por cada día se tomó una muestra de quemadura tratada con apósito de Tegaderm® y una tratada con película de quitosano, las cuales fueron mantenidas en formalina tamponada al 10%.

#### 4.2.5. Área de retracción cicatrizal

En los días 7, 21, 60 y 90 posterior a las quemaduras, se calcularon con un papel transparente (papel diamante) los contornos de las áreas de retracción cicatrizal. Para cada día, al igual que las biopsias, se tomó una muestra de quemadura tratada con apósito de Tegaderm® y una tratada con película de quitosano.

#### 4.2.6. Evaluación histopatológica

Las biopsias fueron procesadas en el Instituto de Patología Animal perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile. Las muestras fueron embebidas en parafina y posteriormente cortadas y teñidas con Hematoxilina Eosina y Tricrómico de Masson.

Las muestras teñidas con Tricrómico de Masson se utilizaron para determinar el depósito de colágeno de las lesiones, en tanto, las muestras teñidas con Hematoxilina Eosina se utilizaron para determinar el infiltrado leucocitario de las quemaduras.



Las muestras de Tricrómico de Masson fueron fotografiadas con la cámara digital Nikon coolpix L4 para su posterior evaluación con el programa Autocad® 2006. Este programa permite discriminar la superficie de verde del resto de la superficie del campo. Con esto, se puede determinar un porcentaje del depósito de colágeno en los distintos días de muestreo.

Los criterios de evaluación para ambas tinciones se describen en el Cuadro 1.

<b>Evaluación</b>	<b>Criterios</b>		
Infiltración Leucocitaria 10 campos a 400x (adaptado de Margulis y col 2007)	<b>Puntajes</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
	<5 por campo	6-15 por campo	> 16 por campo
Depósito de colágeno 5 campos a 400x (adaptado de Montera y col 2009)	área verde/área de campo*100		

**Cuadro 1.** Criterios microscópicos de evaluación.

Los puntajes para la infiltración leucocitaria fueron interpretados de la siguiente manera de acuerdo a los distintos días de medición y evolución de las quemaduras:

- 1= respuesta inflamatoria inadecuada o en regresión.
- 2= respuesta inflamatoria adecuada.
- 3= respuesta inflamatoria exagerada o prolongada.

#### **4.2.7. Evaluación planimétrica**

Para determinar el área de retracción cicatrizal de las muestras, se utilizó el software Autocad® 2006. Este software permite determinar con mayor exactitud el área expresada en mm<sup>2</sup> por medio de un sistema de colocación de puntos sobre los bordes de la imagen, que finalmente se unen y determinan el área de la figura.

#### **4.2.8. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en cada día de muestreo para el depósito de colágeno, área de retracción cicatrizal e infiltración leucocitaria fueron expresados como medias aritméticas, desviaciones estándares de la media y errores estándares de la media, a partir de la utilización de estadística descriptiva e inferencial.

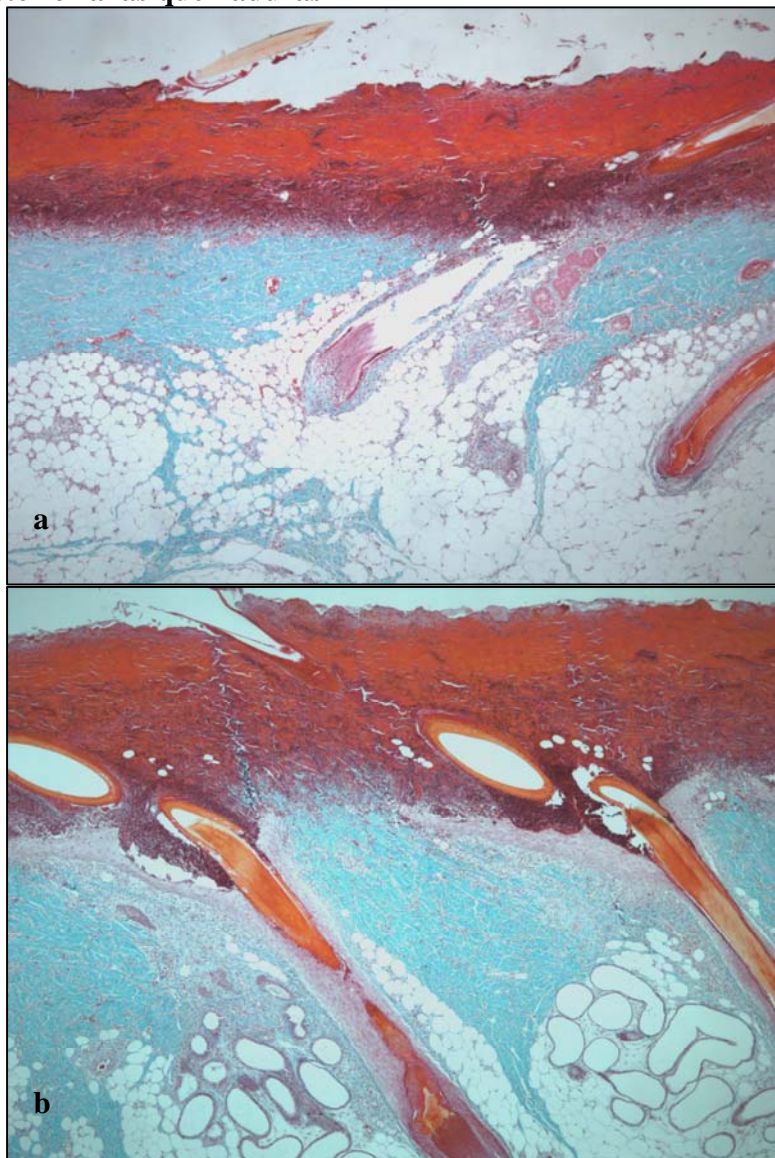
La distribución de las variables paramétricas, es decir, depósito de colágeno y área de retracción cicatrizal, fue determinada a través de la prueba de Shapiro Wilk. Para evaluar las diferencias entre tratamientos se utilizó Análisis de varianza de medidas repetidas y el método de comparación múltiple de Tukey. Para la evaluación de los datos categóricos (infiltración leucocitaria) se utilizó la prueba de Ji Cuadrado.

Statistix® 8.0 fue el programa estadístico utilizado para el análisis de los resultados, considerando significativo un valor de  $P < 0,05$ .

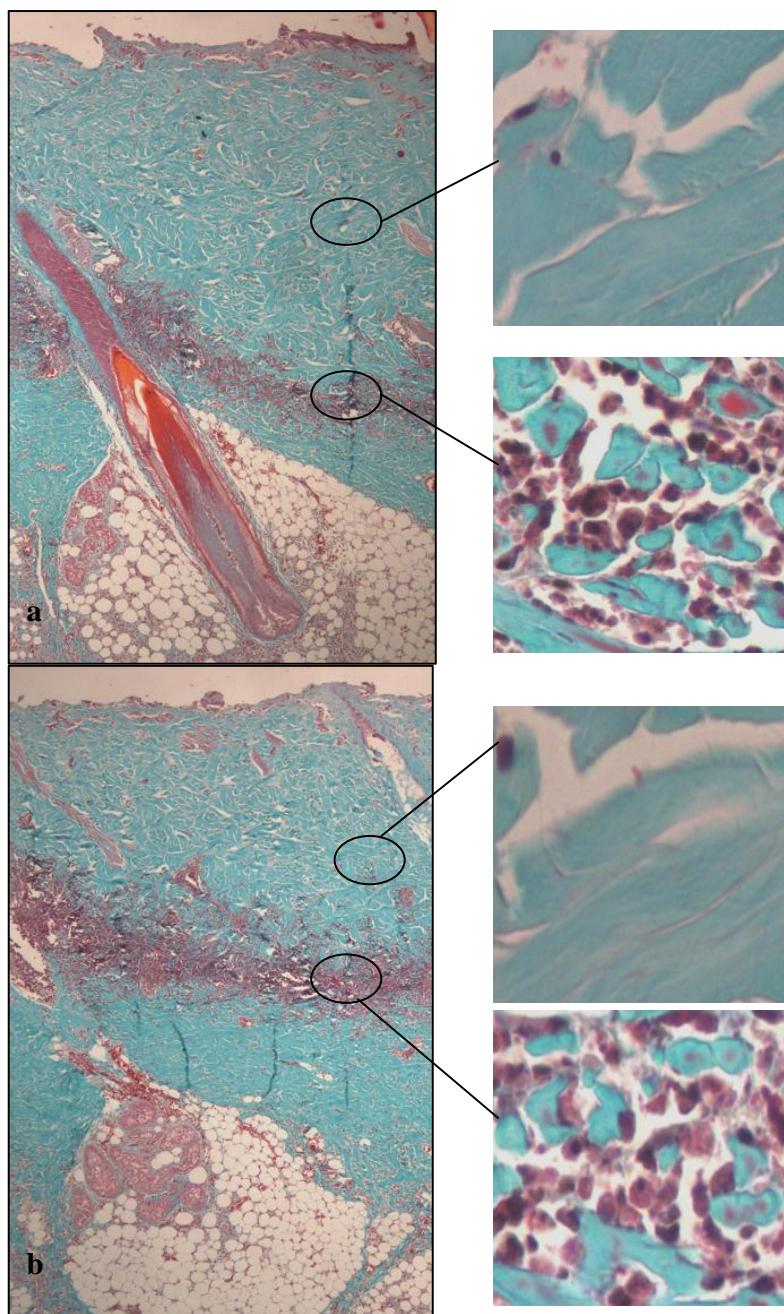
## 5. RESULTADOS

### 5.1. HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS

#### 5.1.1. Día 7 posterior a las quemaduras



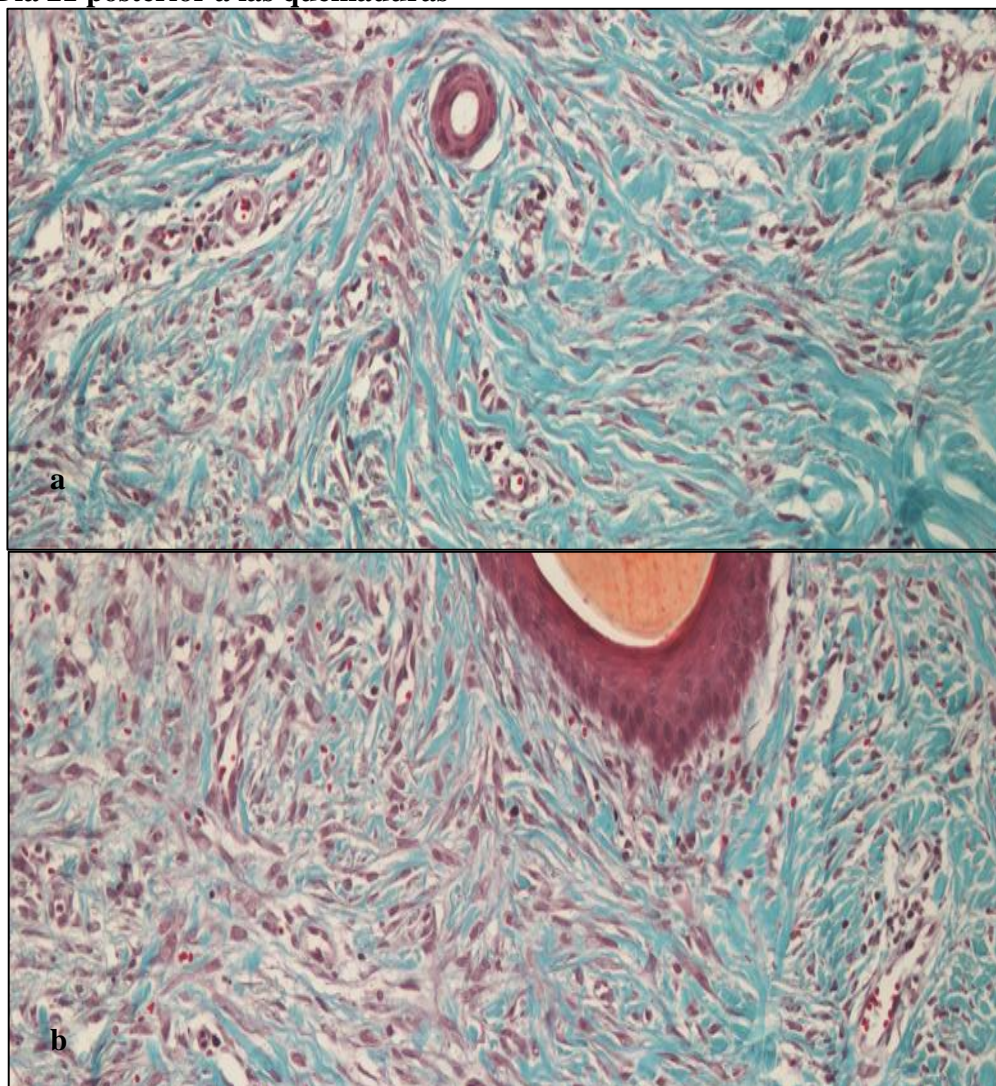
**Figura 4.** Se observa necrosis del estrato epidérmico y dermis papilar en las muestras de quitosano y Tegaderm<sup>®</sup> respectivamente. En la dermis profunda de ambos tratamientos se observa presencia de colágeno reaccionante a la tinción. a) Tratamiento quitosano. b) Tratamiento Tegaderm<sup>®</sup>. Tinción: Tricrómico de Masson. 40x.



**Figura 5.** Se observa una banda inflamatoria que atraviesa la dermis profunda de ambos tratamientos. Las porciones que se encuentran por encima de esta banda reaccionan frente a la tinción y tienen moderada presencia de núcleos picnóticos. a) Tratamiento quitosano. b) Tratamiento Tegaderm<sup>®</sup>. Tinción: Tricrómico de Masson. 40x, 400x.



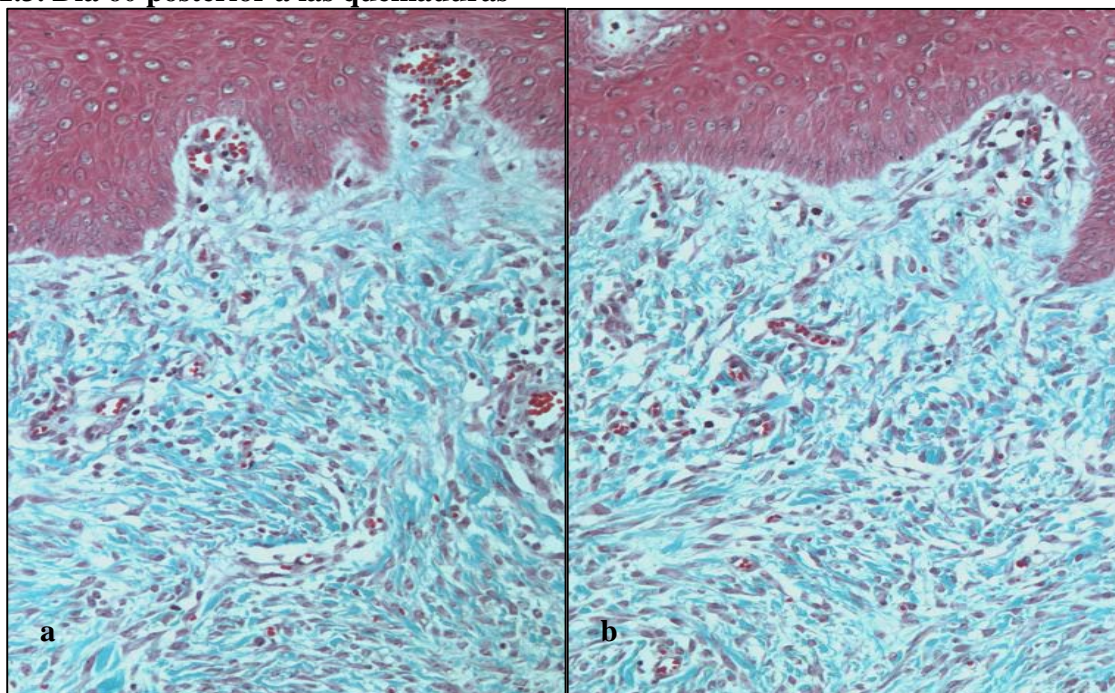
### 5.1.2. Día 21 posterior a las quemaduras



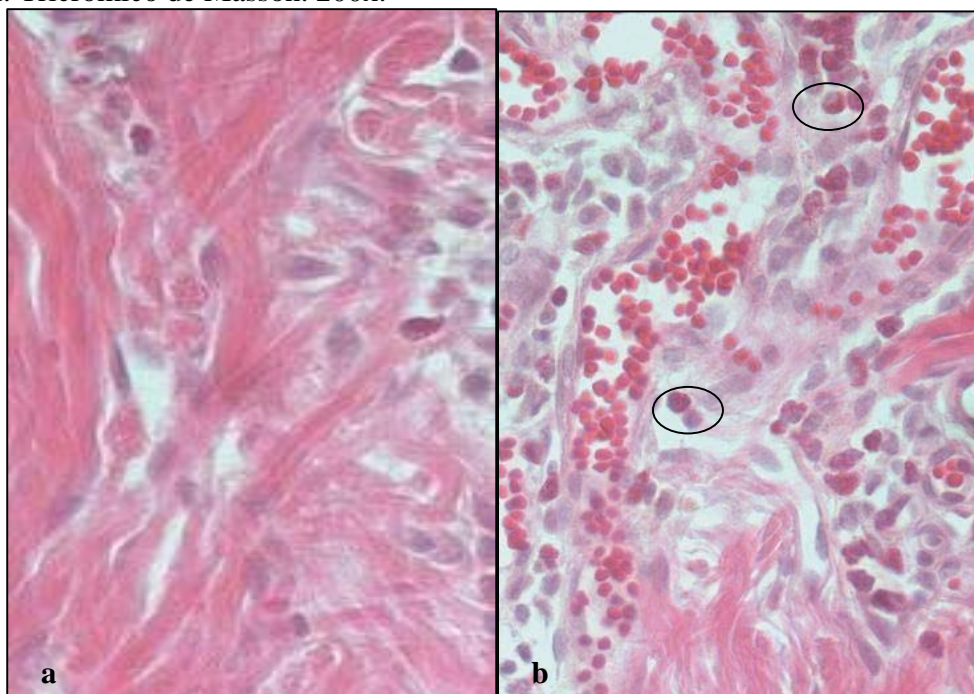
**Figura 6.** Una marcada presencia de fibroblastos y una disminución de colágeno organizado caracteriza las muestras del día 21 para quitosano y Tegaderm<sup>®</sup> respectivamente. a) Tratamiento quitosano. b) Tratamiento Tegaderm<sup>®</sup>. Tinción: Tricrómico de Masson. 200x.



### 5.1.3. Día 60 posterior a las quemaduras



**Figura 7.** Se observa una presencia moderada de fibroblastos y un aumento leve del colágeno en las muestras de ambos tratamientos. a) Tratamiento quitosano. b) Tratamiento Tegaderm®. Tinción: Tricrómico de Masson. 200x.

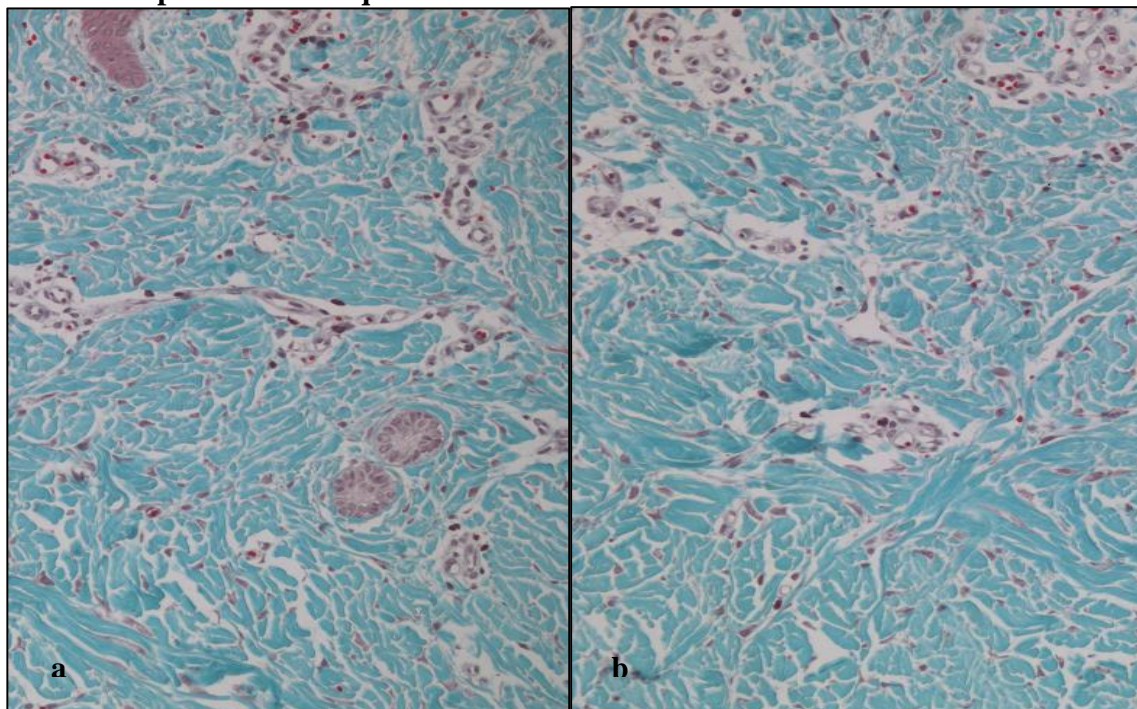


**Figura 8.** Se advierte una mayor presencia de leucocitos, predominantemente eosinófilos, en las muestras

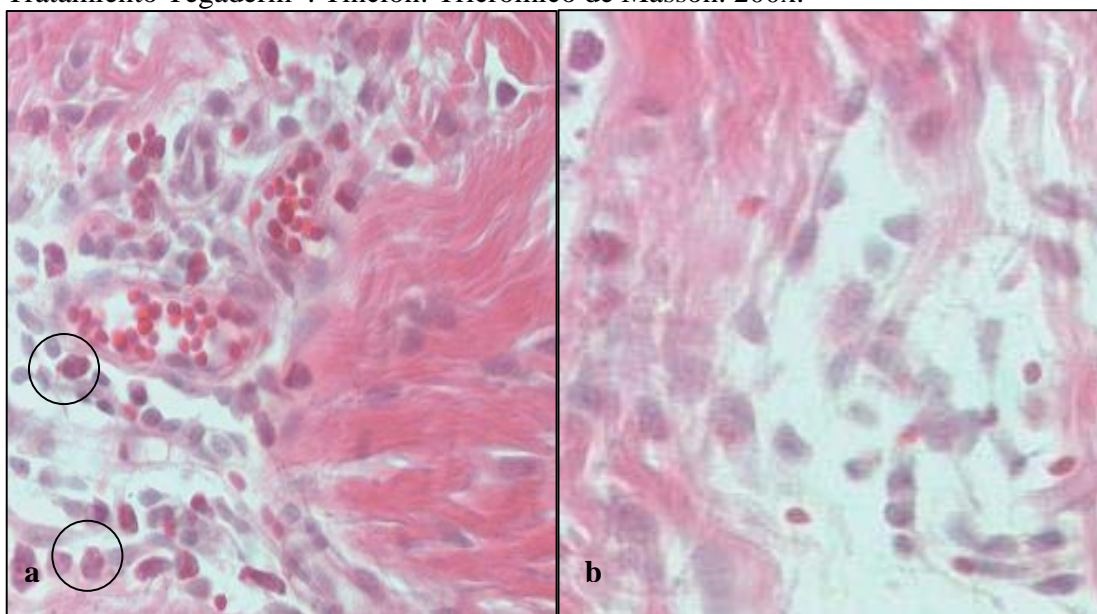


de Tegaderm<sup>®</sup> en comparación con las de quitosano. a) Tratamiento quitosano. b) Tratamiento Tegaderm<sup>®</sup>. Tinción: Hematoxilina Eosina. 400x.

#### 5.1.4. Día 90 posterior a las quemaduras



**Figura 9.** Se observa abundante presencia de colágeno en paquetes organizados y una baja cantidad de fibroblastos en las muestras de ambos tratamientos. a) Tratamiento quitosano. b) Tratamiento Tegaderm<sup>®</sup>. Tinción: Tricrómico de Masson. 200x.



**Figura 10.** Se advierte una mayor presencia de leucocitos, predominantemente eosinófilos, en

las muestras de quitosano en comparación con las de Tegaderm<sup>®</sup>. a) Tratamiento quitosano. b) Tratamiento Tegaderm<sup>®</sup>. Tinción: Hematoxilina Eosina. 400x.

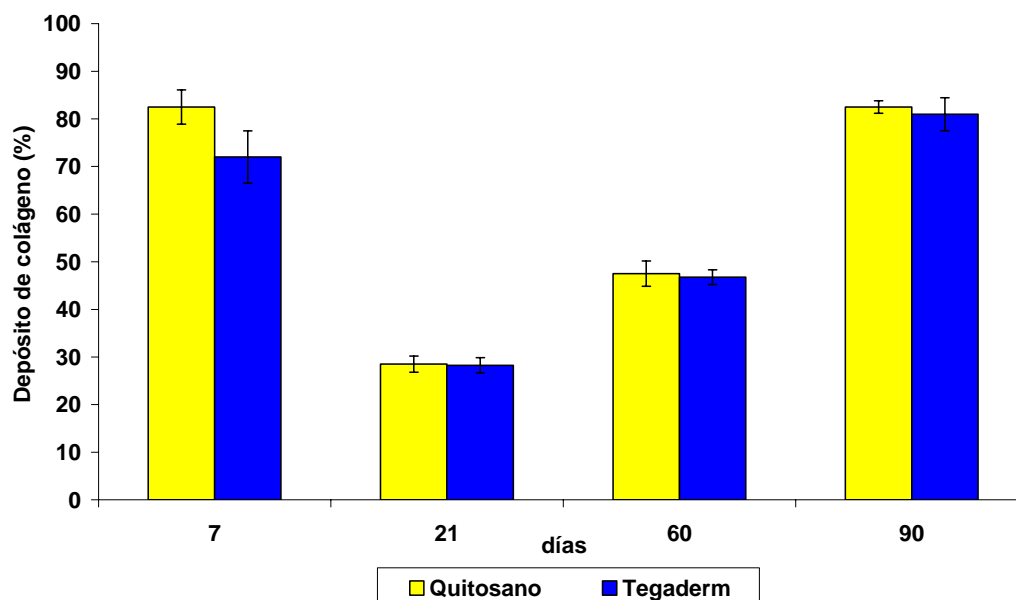
## 5.2. DEPÓSITO DE COLÁGENO

Se estableció que el tratamiento con películas de quitosano presentó un promedio mayor en el depósito de colágeno en comparación a Tegaderm<sup>®</sup> (Cuadro 2). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ) (Figura 11).

Al comparar la relación tratamiento-día, hubo similitud entre quitosano día 7, Tegaderm<sup>®</sup> día 7, quitosano día 90 y Tegaderm<sup>®</sup> día 90 (Figura 11). Se determinó también, semejanza entre quitosano día 21 y Tegaderm<sup>®</sup> día 21 (Figura 11); y por último entre quitosano día 60 y Tegaderm<sup>®</sup> día 60 (Figura 11).

Depósito de Colágeno (%)		
Día	Quitosano	Tegaderm <sup>®</sup>
7	83	72
21	29	28
60	48	47
90	83	81

**Cuadro 2.** Promedio del depósito de colágeno en los días 7, 21, 60 y 90, posterior a las quemaduras realizadas a los cerdos, tratadas con películas de quitosano o Tegaderm<sup>®</sup>.



**Figura 11.** Depósito de colágeno promedio ( $\pm$  EE) para quitosano y Tegaderm<sup>®</sup> en los diferentes días de muestreo posterior a las quemaduras realizadas a los cerdos.  $P > 0,05$ .

### 5.3. ÁREA DE RETRACCIÓN CICATRIZAL

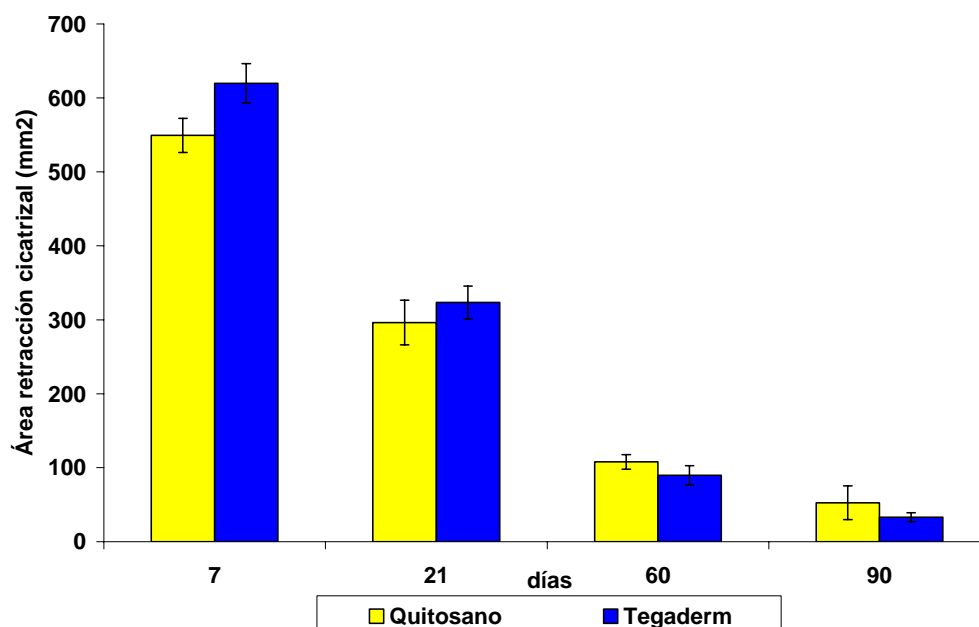
Con relación al área de retracción cicatrizal los tratamientos presentaron diferencias entre sí los días de medición, pero esta no fue estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ) (Cuadro 3, Figura 12).

El tratamiento con quitosano presentó un promedio de área menor que Tegaderm® los dos primeros días de muestreo. No obstante, esta relación cambia los días 60 y 90, presentando Tegaderm® un área menor (Figura 12).

En la relación tratamiento-día, hubo semejanza entre quitosano día 7 y Tegaderm® día 7; entre quitosano día 21 y Tegaderm® día 21; y entre quitosano día 60, Tegaderm® día 60, quitosano día 90 y Tegaderm® día 90 (Figura 12).

Área de retracción cicatrizal(mm <sup>2</sup> )		
Día	Quitosano	Tegaderm®
7	549,26	619,64
21	296,34	323,36
60	107,88	89,83
90	52,68	33,17

**Cuadro 3.** Área de retracción cicatrizal promedio en los diferentes días de muestreo para quitosano y Tegaderm® respectivamente.



**Figura 12:** Área de retracción cicatrizal promedio ( $\pm$  EE) para quitosano y Tegaderm® en los diferentes días de muestreo posterior a las quemaduras realizadas a los cerdos.  $P > 0,05$ .



#### 5.4. INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA

Los tratamientos no tuvieron una influencia significativa en la infiltración leucocitaria observada ( $P>0,05$ ), es decir, presentaron una semejanza en los puntajes establecidos (Cuadro 4).

<b>Promedio Infiltración leucocitaria</b>		
<b>Día</b>	<b>Quitosano</b>	<b>Tegaderm<sup>®</sup></b>
7	2	2
21	1	1
60	1	2
90	2	1

**Cuadro 4.** Puntaje promedio en el infiltrado leucocitario para los días de muestreo posterior a las quemaduras realizadas a los cerdos, tratadas con películas de quitosano o Tegaderm<sup>®</sup>.

## 6. DISCUSIÓN

En el presente estudio, las películas de quitosano y los apósitos de Tegaderm<sup>®</sup> se utilizaron como coberturas cutáneas oclusivas para el tratamiento de quemaduras de tipo II/III realizadas en un modelo porcino. Este tipo de cobertura cutánea es muy usada y de primera elección en el tratamiento de quemaduras parciales a profundas (Atiyeh y col 2005). Está comprobado desde hace años, que la mantención de un medio ambiente húmedo en la lesión, favorece una reparación más rápida que un medio ambiente seco (Singer y col 2000<sup>a</sup>). Para tal propósito, las coberturas oclusivas deben reunir ciertas características como: retener el exudado que se forma en las quemaduras, de tipo II principalmente, el cual proveerá de un medio ambiente húmedo a la herida; deben permitir la movilidad y expansión del tejido en construcción; y deben presentar permeabilidad a ciertos gases como el oxígeno, lo cual facilita una correcta integración de los tejidos y una apropiada vascularización (Hutmacher y col 2001). Todo este medio, permeable al oxígeno y semipermeable al agua, favorece la retención de anticuerpos, factores de crecimiento, glucosa, electrolitos, fibronectina e impide posibles infecciones, estimulando la migración y sobrevivencia de las poblaciones celulares, favoreciendo la reparación del tejido (Hutmacher y col 2001).

La aplicación de las películas de quitosano sobre las quemaduras fue sencilla. Presentó una buena adhesión al tejido debido al pH ácido que proporciona el lactato de quitosano utilizado como componente principal de las películas, el cual permite la expresión del quitosano como polielectrolito catiónico con alta densidad de carga, solubilidad y flexibilidad (Şenel y McClure 2004); propiedades que le posibilitan interactuar con moléculas aniónicas presentes en la piel (Şenel y McClure 2004). De esta manera las películas aseguran una buena adhesión de forma natural y cumplen con las propiedades de una buena cobertura oclusiva. Lo observado coincide con lo descrito por Ishihara y col (2002), en donde utilizaron películas de quitosano en incisiones realizadas en el lomo de ratas, logrando una buena adhesión y oclusión. Tegaderm<sup>®</sup> por su parte, también presentó una buena adhesión y oclusión, similar a los resultados descritos por Singer y col (2000<sup>a</sup>), quienes compararon la capacidad de Tegaderm<sup>®</sup> frente a Octylcyanoacrylate, un spray con capacidad de cobertura oclusiva. De todos modos, para aplicar Tegaderm<sup>®</sup> de forma correcta se requiere de una pequeña capacitación. La piel debe estar completamente ausente de pelos y totalmente seca, ya que el pegamento que está sobre el poliuretano no adhiere bien y pierde efectividad como cobertura oclusiva; a diferencia de quitosano, cuya adhesión es de forma natural.

Los tratamientos no presentaron una diferencia estadísticamente significativa en el depósito de colágeno a lo largo del ensayo. El patrón de reparación se concentró principalmente en la reepitelización, observándose en el día 21 una delgada capa de epidermis reparada, una disminución en los grandes paquetes de fibras colágenas por colágeno fibrilar y un aumento considerable de fibroblastos en la zona de la quemadura. Según Singer y col (1999), se estima que en las primeras tres semanas el tejido reparado ha ganado un 20% de su fuerza de tracción original, el colágeno fibrilar se ha acumulado relativamente rápido y ha sido

remodelado por la contracción de la herida. Posteriormente la ganancia de fuerza se vuelve más lenta, reflejando una tasa más pausada en la acumulación de colágeno y lo más importante, la remodelación y formación de grandes paquetes de fibras y un aumento en el número de uniones intermoleculares. Este fenómeno coincide precisamente con la lenta acumulación de colágeno que se observa en el lapso del día 21 al día 60. Probablemente también explique el importante aumento de fibras organizadas en grandes paquetes y el aumento del grosor del tejido en reparación en los días 60 y 90, a diferencia del día 21 en donde las fibras de colágeno se observan en bandas más pequeñas. Otro hecho importante, es la similitud en el depósito de colágeno observado en los días 7 y 90 para ambos tratamientos. Seguramente esto se explique porque el colágeno de la zona circundante más próxima a la quemadura, relacionada precisamente a la banda inflamatoria delimitante presente en las muestras del día 7, aun no perdía por completo sus características a la tinción Tricrómico de Masson. La presencia en esta zona de núcleos picnóticos indica muerte celular y por lo tanto inviabilidad del tejido (Singer y col 1999). El organismo reacciona delimitando y retirando este tejido no viable a través de los neutrófilos y macrófagos en una primera instancia, para que posteriormente sea reemplazado por nuevas células (Singer y col 1999). Aunque se observa colágeno viable con la tinción Tricrómico de Masson en la zona, este probablemente perdió su característica a los pocos días. Finalmente esta área fue infiltrada por fibroblastos y reemplazada por nuevo colágeno (día 21). En el resto de los días se observa un depósito pausado pero progresivo, con un infiltrado fibroblástico similar entre quitosano y Tegaderm<sup>®</sup>, con paquetes de colágeno organizados.

A lo largo del ensayo, tampoco se observaron procesos patológicos fibroproliferativos como queloides, cicatrices hipertróficas, ni procesos granulomatosos, posiblemente porque quitosano no provocó rechazo por parte del tejido y no alteró la modulación en el depósito de colágeno. Estas características concuerdan con lo descrito por Diamond y col (2003) y Shi y col (2006) sobre la baja capacidad de rechazo que provoca quitosano en los tejidos en reparación, su baja toxicidad y ausencia de procesos relacionados con depósitos de fibras colágenas aberrantes.

En varios estudios se ha reportado la capacidad de quitosano de aumentar el tejido de granulación y acelerar el depósito de colágeno (Ueno y col 2001<sup>a,b</sup>, Ishihara y col 2002, Muzzarelli y col 2005, Alemdaroğlu y col 2006). De acuerdo a lo observado en este ensayo, quitosano no presentó un depósito de colágeno significativamente mayor que su control, claro que a diferencia de otros estudios, se comparó con una cobertura oclusiva de primera elección, que tiene la capacidad de cicatrizar en ambiente húmedo al igual que quitosano. Además, los materiales de quitosano utilizados y los animales de experimentación también difieren de lo descrito en la literatura. Ueno y col (2001<sup>b</sup>) encontraron mayor depósito de colágeno en las lesiones tratadas con quitosano frente a los controles, claro que utilizaron quitosano algodón y como animales de ensayo perros beagles.

El mecanismo subyacente entre quitosano y los fibroblastos aun no está del todo claro. Ueno y col (2001<sup>a</sup>) postulan que la producción de matriz extracelular en las heridas no se debe a una acción directa de este material sobre los fibroblastos, sino que a través de una acción indirecta por medio de factores de crecimiento (TGF  $\beta$ 1, PDGF) producidos en mayor

cantidad por los macrófagos en presencia de quitosano. Asimismo, postulan que la producción de IL- 8 por parte de los fibroblastos actuaría como estimulador angiogénico y quimiotáctico para neutrófilos. Por otra parte, la similitud de la estructura de quitosano con el ácido hialurónico, uno de los glucosaminoglicanos más importantes presentes en la piel, también se atribuye como posible mecanismo de acción en el depósito de colágeno por parte de quitosano (Mariappan y col 1999, Şenel y McClure 2004). En dermatología se ha demostrado la acción pro angiogénica del ácido hialurónico, además de su acción como agente acelerador de la reparación y modulador del depósito de colágeno (Price y col 2005). De igual forma, se cree que factores de crecimiento como TGF  $\beta$ 1, PDGF y b-FGF (basic fibroblast growth factor) secretados por macrófagos y fibroblastos, estimulan la producción de ácido hialurónico por parte de los fibroblastos y que por este camino se regularía también la proliferación y migración de estas células (Mariappan y col 1999, Price y col 2005).

Con respecto al área de retracción cicatrizal, hubo variaciones durante los días de medición. Quitosano presentó un promedio de área menor los dos primeros días y mayor los últimos dos, que finalmente no presentaron significancia estadística. Estos resultados no coinciden con lo obtenido por Ishihara y col (2002), que probando películas de quitosano sobre piel de ratas, observaron un cierre más prematuro en aquellas que fueron tratadas con respecto a los controles (sin tratamiento). Por otro lado, Stone y col (2000), en uno de los escasos trabajos realizados en pacientes humanos, demostraron que la velocidad de cierre de la herida por parte de quitosano no fue significativamente mayor que el otro tratamiento aunque sí el color de la zona reparada por quitosano era más cercano al color de la piel normal.

En el presente trabajo llama la atención los resultados en el promedio de los tratamientos para el día 7. En este día se produce la mayor diferencia en las áreas de retracción,  $70.8 \text{ mm}^2$ , período que tiene importancia pues las películas de quitosano aun están presentes en la piel, completando su absorción aproximadamente en el día 10 de tratamiento. Posteriormente, esta relación se hace más estrecha, hasta que finalmente en los últimos días se invierte. Si lo relacionamos con el depósito de colágeno, en el día 7 quitosano también presenta una diferencia interesante en relación a su control (11%). Aunque a lo largo del ensayo esta diferencia se hace no significativa, se podría suponer, que la primera semana marcaría la mayor acción de las películas de quitosano sobre las heridas, pero que no se perpetuaría por un tiempo muy prolongado.

En relación a la infiltración leucocitaria, quitosano no presentó una influencia significativa a lo largo del ensayo, al igual que su control. En el día 7, se puede observar un proceso inflamatorio, en donde predominan los neutrófilos y los macrófagos. En el resto de los días hay una baja considerable de estos tipos celulares. En el día 60 para Tegaderm® y día 90 para quitosano se observa una presencia mayoritaria de eosinófilos en las muestras, lo cual hace aumentar el puntaje en esos días a los tratamientos respectivos. Se ha descrito la presencia de estos polimorfonucleares en los procesos reparativos y de remodelación tisular, atribuyéndole la liberación de TGF  $\beta$  (Singer y col 1999). Sin embargo, el nivel de importancia en la liberación de este factor y su rol específico no está del todo claro, a diferencia de otros granulocitos como los neutrófilos. Los mecanismos de acción mejor estudiados de los eosinófilos tienen que ver con los procesos alérgicos y en la defensa contra

los parásitos. Para Quitosano de origen animal, se han descrito reacciones alérgicas principalmente por una mala desproteinización de las materias primas (Cardoso y col 2010).

Ueno y col (2001<sup>b</sup>) señalan que quitosano acelera y aumenta la migración de polimorfonucleares (PMN) a partir del día 3, en relación a los grupos control (sin tratamiento). Agregan además, que una vez activados secretan mediadores de la inflamación como TFN- $\alpha$ , IL-1, IL-8 favoreciendo la fagocitosis. Señalan también que este efecto, sumado a la producción de osteopontina y por parte de los macrófagos de TGF  $\beta$ 1, PDGF e IL-1, estimula la granulación y la organización. Agregando más antecedentes sobre el mecanismo subyacente entre quitosano y los neutrófilos, Park y col (2009), determinaron el efecto de quitosano sobre este tipo celular. Los resultados aclararon que la interacción entre quitosano y los neutrófilos se produce por medio de la IL-8, potente quimiotáctico, producido precisamente por estas células en presencia de quitosano. También determinaron que cuando aumenta la desacetilación de quitosano aumenta igualmente la producción de IL-8 por parte de los neutrófilos, que como consecuencia conlleva a un aumento de esta población celular. A partir de estos resultados, queda claro que la interacción entre neutrófilos y quitosano está dada por la IL-8 y las propiedades físicas de las películas de quitosano. En el presente ensayo, no se evidenció un aumento sustancial de neutrófilos por parte de quitosano, de hecho su comportamiento fue similar a su tratamiento control. Otros signos inflamatorios como eritema, fiebre o formación de abscesos tampoco se observaron en los cerdos. Se puede establecer entonces, que quitosano no provocó una respuesta excesiva de PMN, lo cual es indicativo de una buena aceptación por parte del tejido a los materiales del producto. No obstante, la mayor migración de PMN por parte de quitosano es una de las propiedades que se le atribuye a este biomaterial en la reparación más rápida de heridas. Si se aumenta el grado de desacetilación entonces, se puede conseguir un aumento de neutrófilos por una mayor producción de IL-8 y posteriormente toda la secuencia de eventos que esto conlleva, sin embargo, se estaría disminuyendo dos propiedades importantes que posee este material, como son la solubilidad y la carga positiva que le permiten una buena adhesión e interacción con moléculas de la piel. Por lo tanto, es fundamental seguir sumando antecedentes sobre la interacción de quitosano y los leucocitos en la reparación de heridas y determinar un porcentaje de desacetilación conveniente para tener una migración adecuada de PMN y con esto una reparación más acelerada, sin perder otras propiedades importantes que posee quitosano, como son su carácter catiónico y su solubilidad.

Los resultados del presente estudio sugieren que la reparación de quemaduras tipo II/III en cerdos tratados con quitosano y Tegaderm<sup>®</sup> son similares. Aunque los resultados no señalan un aumento considerable en el depósito de colágeno en las muestras de quitosano, no se puede restar importancia a la acción reparadora de este material como cobertura oclusiva, que fue tan buena como Tegaderm<sup>®</sup>, poliuretano utilizado frecuentemente en pacientes con quemaduras II/III (Stone y col 2000, Chua y col 2008) y que en otros estudios ha demostrado ser una excelente opción como cobertura oclusiva (Singer y col 2000<sup>a</sup>). Quitosano tuvo una buena adhesión al tejido, no presentando rechazo ni procesos inflamatorios prolongados; fue fácilmente biodegradado y no se observaron procesos fibroproliferativos anormales como queloides, ni cicatrices hipertróficas. Sumado a esto, su costo de producción es muy bajo, pues las materias primas se obtienen principalmente de los desechos de la industria del camarón,

que en el caso nacional se obtendrían de la industria de la centolla y otros crustáceos (Uribe 2003). Por lo tanto, las películas de quitosano podrían ser una alternativa más como material en la reparación de quemaduras. Aun así, es importante seguir con los estudios sobre los efectos de quitosano, sobre todo *in vivo*, además de continuar con las investigaciones referentes a las consecuencias de la desacetilación sobre las propiedades de las películas, además de otros procesos que involucran, por ejemplo, la cantidad de residuos minerales y proteicos, los cuales también se ha comprobado que están envueltos en las características de los materiales y en la interacción con fibroblastos (Hamilton y col 2006). De esta forma, se puede llegar a obtener películas de quitosano de calidad superior con mejores efectos en la reparación.

## 6.1. CONCLUSIONES

- Las películas de quitosano y apósitos de Tegaderm<sup>®</sup> presentaron un depósito de colágeno similar a lo largo del ensayo.
- El área de retracción cicatrizal de quitosano a lo largo del ensayo fue similar a Tegaderm<sup>®</sup>.
- Los tratamientos no presentaron mayor influencia sobre el infiltrado leucocitario.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alemdaroğlu C, Z Değim, N Çelebi, F Zor, S Öztürk, D Erdoğan. 2006. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns* 32, 319–327.
- Agnihotri SA, NN Mallikarjuna, TM Aminabhavi. 2004. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release* 100, 5-28.
- Atiyeh B, W Gunn, S Hayek. 2005. State of the art in burn treatment. *World J Surg* 29, 131-148.
- Azócar D. 1995. Cobertura cutánea en quemados. En: Garcés M, R Artigas (eds.). *Quemaduras*. Sociedad Chilena de Quemaduras: Sociedad de Cirujanos de Chile, Santiago de Chile, Pp. 91-122.
- Çakir B, B Yeğen. 2004. Systemic Responses to burn injury. *Turk J Med Sci* 34, 215-226.
- Chua A, D Ma, I Song, T Phan, S Lee, C Song. 2008. In vitro evaluation of fibrin mat and Tegaderm® wound dressing for the delivery of keratinocytes. Implications of their use to treat burns. *Burns* 34, 175-180.
- Cordero A. 1996. *Biología de la Piel*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Cardoso A, A Marques, C Matos, G Campos-Takaki. 2010. Potencial de rhizopus arrhizus ucp 402 na produção de quitina e quitosana. En: V Simpósio Ibero-americano de Quitina Sociedade Ibero-americana de Quitina. Santiago, Chile.
- Diamond M, A Luciano, D Johns, R Dunn, P Young, E Bieber. 2003. Reduction of postoperative adhesions by N,O-carboxymethylchitosan: a pilot study. *Fertil Steril* 80, 631-636.
- Freier T, R Montenegro, H Koha, M Shoichet. 2005<sup>a</sup>. Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials* 26, 4624–4632.
- Freier T, HS Koh, K Kazazian, MS Shoichet. 2005<sup>b</sup>. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. *Biomaterials* 26, 5872-5878.
- Gallardo R, J Ruiz, R Torres, J Diaz. 2000. Estado Actual del manejo urgente de las quemaduras. *Emergencias* 13, 122-129.

- Garcés M. 1995. Fisiopatología de las quemaduras. En: Garcés M, R Artigas (eds.). *Quemaduras*. Sociedad Chilena de Quemaduras: Sociedad de Cirujanos de Chile, Santiago de Chile, Pp. 43-51.
- Hamilton V, Y Yuan, D Rigney, A Puckett, J, Ong, Y Yang, S Elder, J Bumgardner. 2006. Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *J Mater Sci: Mater Med* 17, 1373-1381.
- Hettiaratchy S, P Dziewulski. 2004. Pathophysiology and types of burns. *Brit Med J* 328, 1427-1429.
- Hollander D, H Erli, A Theisen, S Falk, T Krek, S Müller. 2003. Standardized qualitative evaluation of scar tissue properties in an animal wound healing model. *Wound Rep Reg* 11, 150-157.
- Hutmacher D, T Schantz, I Zein, K Nig, S Teoh, K Tan. 2001. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J Biomed Mater Res* 55, 203-216.
- Iribarren O. 1996. Fisiopatología y reposición de volumen en el paciente quemado agudo. *Rev Chilena de Cirugía* 48, 523-532.
- Ishihara M, K Nakanishi, K Ono. 2002. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials* 23, 833-840.
- Jones I, L Currie, R Martin. 2002. A guide to biological skin substitutes. *Brit J Plastic Surg* 55, 185-193.
- Khor E, L Lim. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24, 2339-2349.
- Mariappan M, E Alas, J Williams, M Prager. 1999. Chitosan and chitosan sulfate have opposing effects on collagen-fibroblast interactions. *Wound Rep Reg* 7, 400-406.
- Margulis A, M Chaouat, H Ben-Bassat, A Eldad, M Icekson, S Breiterman, R Neuman. 2007. Comparison of topical iodine and silver sulfadiazine as therapies against sulfur mustard burns in a pig model. *Wound Rep Reg* 15, 916-921.
- Martin P. 1997. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- McCalmont T. 2007. Enfermedades Cútaneas. En: McPhee S, W Ganong (eds.). *Fisiopatología Médica: Introducción a la Medicina Clínica*. Editorial Manual Moderno, México D.F., México, Pp. 189-192.



- Middelkoop E, A va den Bogaerdt, E Lamme, M Hoekstra, K Brandsma, M Ulrich. 2004. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials* 25, 1559–1567.
- Montera M, C Drumond, C Takiya, C Tinoco, H Dohmann, C Mady. 2009. Correlation of myocardial interstitial collagen in the right ventricular septum with ventricular function of patients with ischemic cardiomyopathy. *Arq Bras Cardiol* 92, 53-61.
- Muzzarelli R, M Guerrieri, G Goteri, C Muzzarelli, T Armeni, R Ghiselli. 2005. The biocompatibility of dibutyl chitin in the context of wound dressings. *Biomaterials* 26, 5844–5854.
- Muzzarelli R. 2009. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carb Polym* 76, 167–182.
- Park C, N Gabrielson, D Pack, R Jamison, A Wagoner. 2009. The effect of chitosan on the migration of neutrophil-like HL60 cells, mediated by IL-8. *Biomaterials* 30, 436-444.
- Pastrana F. 2002. Propedéutica Dermatológica. En: Manzúr J, J Díaz, M Cortés (eds.). *Dermatología*. Editorial Ciencias Médicas, La Habana, Cuba, Pp. 1-9.
- Phan T, Lim I, E Tan, B Bay, S Lee. 2005. Evaluation of cell culture on the polyurethane-based membrane (Tegaderm®): implication for tissue engineering of skin. *Cell and Tissue Banking* 6, 91–97.
- Prabaharan M, J Mano. 2005. Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Deliv* 12, 41-57.
- Price R, S Myers, I Leigh, H Navsaria. 2005. The Role of Hyaluronic Acid in Wound Healing. *Am J Clin Dermatol* 6, 393-402.
- Şenel S, S McClure. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1467–1480.
- Shi C, Y Zhu, X Ran, M Wang, Y Su, T Cheng. 2006. Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine. *J Surg Res* 133, 185–192.
- Singer A, R Clark. 1999. Cutaneous Wound Healing. *New Engl J Med* 341, 738-746.
- Singer A, M Mohammad, H Thode Jr, S McClain. 2000<sup>a</sup>. Octylcyanoacrylate versus polyurethane for treatment of burns in swine: a randomized trial. *Burns* 26, 388-392.
- Singer A, H Thode, S McClain. 2000<sup>b</sup>. Development of a histomorphologic scale to quantify cutaneous scars after burns. *Acad Emerg Med* 7, 1083-1088.

- Stone C, H Wright, T Clarke, R Powell, V Devaraj. 2000. Healing at skin graft donor sites dressed with chitosan. *Brit J Plastic Surg* 53, 601-606.
- Sullivan T, W Eaglstein, S Davis, P Mertz. 2001. The pig as a model for the human wound healing. *Wound Rep Reg* 9, 66-76.
- Ueno H, F Nakamura, M Murakami, M Okumura, T Kadosawa, T Fujinaga. 2001<sup>a</sup>. Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials* 22, 2125–2130.
- Ueno H , T Mori, T Fujinaga. 2001<sup>b</sup>. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev* 52, 105–115.
- Uribe NO. 2003. Preparación y caracterización de films de quitosano útiles como apósitos en el tratamiento de quemaduras. *Tesis Pregrado*, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

## 8. AGRADECIMIENTOS

A Javier Ojeda, por el constante apoyo y sus importantes consejos en el desarrollo de este ensayo.

A Daniel Herzberg y Karl Alfsen, quienes colaboraron en la realización de las quemaduras.

A Enrique Paredes y Manuel Moroni, por su fundamental apoyo en la elaboración y análisis de las muestras.

A Betsaida Yupanqui, por su paciencia, apoyo y colaboración desinteresada en la utilización del programa Autocad<sup>®</sup> 2006.

A Mirela Noro, Claudia Campillo y Oscar Alocilla, por sus consejos y colaboración en el análisis estadístico.

Y a mi familia y amigos, que han sido fundamental en mi desarrollo académico y personal. De verdad, muchas gracias.