

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y SUS ESPECIALIDADES

**“EFECTO DEL BLOQUEO DEL FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL ALFA (ETANERCEPT) SOBRE LA CURACIÓN DE
LAS HERIDAS QUIRÚRGICAS. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN
RATONES SWISS-OF1”**

**Tesis doctoral presentada por Estíbaliz Iglesias Jiménez, Licenciada
en Medicina y Cirugía, por la que opta al grado de Doctor en Medicina.**

Directores de la Tesis Doctoral:

Prf. Dr. P. Hernández Cortés.
Dr. Juan Salvatierra Ossorio.
Prf. Dr. F.J. O´Valle Ravassa.

Informe favorable de la Tesis Doctoral: Prf. Dr. G. Herrero-Beaumont (Profesor
Titular de Reumatología de la Universidad Autónoma de Madrid).

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
ARTRITIS REUMATOIDE.....	6
PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	9
CITOQUINAS.....	12
PAPEL DE LAS CITOQUINAS ES EL SISTEMA INMUNE.....	12
PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	13
IMPLICACIONES PARA EL TRATAMIENTO EN LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS.....	14
TRATAMIENTO ANTI TNF- α : ETANERCEPT.....	20
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.....	24
MANEJO PERIOPERATORIO DE LOS PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.....	28
ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS Y CORTICOIDES.....	29
FÁRMACOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD.....	30
MODIFICADORES DE RESPUESTA BIOLÓGICA.....	31
ANTI TNF- α Y CIRUGÍA ORTOPÉDICA.....	31
INFLIXIMAB Y ENFERMEDAD DE CROHN.....	33
ANTI TNF- α Y CICATRIZACIÓN EN MODELOS ANIMALES.....	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	43
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
MATERIAL UTILIZADO.....	50
ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.....	50
ETANERCEPT.....	51
QUIRÓFANO Y MATERIAL DE MICROCIRUGÍA.....	51
MÉTODO DE EXPERIMENTACIÓN.....	52
TRATAMIENTO CON ETANERCEPT.....	52

REALIZACIÓN DE HERIDAS Y TOMA DE MUESTRAS.....	52
CRONOGRAMA.....	53
ANÁLISIS MACROSCÓPICO, MICROSCÓPICO Y DIGITAL.....	57
ANÁLISIS MACROSCÓPICO.....	57
PROCEDIMIENTO.....	57
DEFINICIÓN DE VARIABLES DE MACROSCOPIA.....	59
ANÁLISIS MICROSCÓPICO.....	59
PROCEDIMIENTO.....	59
DEFINICIÓN DE VARIABLES DE MICROSCOPIA.....	67
ANÁLISIS DIGITAL DE IMAGEN.....	72
PROCEDIMIENTO.....	72
DEFINICIÓN DE VARIABLES DE ANÁLISIS DIGITAL.....	84
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	84
RESULTADOS.....	86
PÉRDIDA DE ANIMALES A LO LARGO DEL EXPERIMENTO.....	87
ESTUDIO BIVARIANTE.....	87
ANÁLISIS MACROSCÓPICO.....	87
ANÁLISIS MICROSCÓPICO.....	94
ANÁLISIS DIGITAL DE IMAGEN.....	129
RESUMEN DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS BIVARIANTE.....	133
ESTUDIO MULTIVARIANTE.....	135
VARIABLE RESULTADO: LONGITUD DE LA HERIDA.....	135
VARIABLE RESULTADO: COLAGENIZACIÓN DE LA HERIDA.....	138
RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO MULTIVARIANTE.....	143
CORRELACIONES.....	144
IMÁGENES A DESTACAR.....	145

DISCUSIÓN.....	147
DISCUSIÓN GENERAL.....	149
DISCUSIÓN METODOLÓGICA.....	152
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	160
APLICACIÓN CLÍNICA.....	168
CONCLUSIONES.....	170
BIBLIOGRAFÍA.....	173

INTRODUCCIÓN

ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria sistémica que afecta predominantemente a las pequeñas articulaciones de las manos de mujeres de mediana edad de forma simétrica. La paciente suele referir dolor, rigidez matutina superior a una hora de duración (Lineker, S, Badley, E, Charles, C, et al. 1999), y tumefacción articular (Lee, DM, Weinblatt, ME. 2001). Otras articulaciones frecuentemente afectadas son los codos, hombros, tobillos y rodillas (Fleming, A, Crown, JM, Corbett, M. 1976; Jacoby, RK, Jayson, MIV, Cosh, JA. 1973).

La mayor parte de los pacientes presentan una enfermedad de curso fluctuante con periodos de poca actividad, incluso asintomáticos, de semanas o meses de duración (Pinals, RS, Masi, AF, Larsen, RA, et al. 1982). (Massi, AT, Feigenbaum, SL, Kaplan, SB. 1983), pero si no existe un buen control de la enfermedad con un inicio precoz del tratamiento suele progresar a destrucción articular con grandes deformidades.

Existen una serie de características clínicas, analíticas y radiológicas que sirven de factores pronósticos de respuesta de la enfermedad a los denominados fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs). Son factores de buen pronóstico niveles bajos de reactantes de fase aguda, de factor reumatoide (FR) y de autoanticuerpos contra péptidos citrulinados (Anti-CCP) (Gossec, L, Dougados, M, Goupille, P, et al. 2004).

El concepto de actividad de la enfermedad se basa en la persistencia de la respuesta inflamatoria biológica y varía principalmente por la acción del tratamiento. El proceso destructivo articular está influenciado por la actividad inflamatoria y por la respuesta reparadora (Wolfe, F, Sharp, JT. 1998), por lo que en ocasiones la remisión clínica no evita el desarrollo de nuevas lesiones erosivas (Molenaar, ET, Voskuyl, AE, Dinant, HJ, et al. 2004; PJW Venables, MA, MB BChir, MD, FRCP; RN Maini, BA, MB BChir, FRCP, FMedSci. 2007).



Deformidad característica con desviación cubital de los dedos y deformidad en cuello de cisne de los mismos. [UpToDate@2007](#), cortesía de Robert M Bennett, MD



Tumefacción bilateral de ambos carpos en paciente con artritis reumatoide. [Fondo de imágenes de la SER](#)



Proyección posteroanterior de mano de paciente con artritis reumatoide. Erosiones, deformidad y osteopenia yuxtarticulillar. [Fondo de imágenes de la SER](#)



Proyección lateral del codo de un paciente con AR que muestra tumefacción de tejidos blandos y osteopenia con destrucción de la articulación (flechas). Hay también cambios óseos proliferativos secundarios. [UpToDate®2007](#), cortesía de Jonathan Kruskal, MD

PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Posiblemente el primer evento patogénico que tiene lugar en la artritis reumatoide es la activación antígeno dependiente de las células T. Esto da lugar a la activación y proliferación de células sinoviales y endoteliales, reclutamiento y activación de otras células inflamatorias, secreción de citoquinas y proteasas por macrófagos y células sinoviales, y producción de autoanticuerpos. Esto hará que el tejido sinovial se convierta en una sinovitis invasiva que puede degradar cartílago y hueso, con características de una invasión local maligna.

La respuesta reumatoide está centrada en la sinovial y es totalmente dependiente de la angiogénesis (Colville-Nash, PR, Scott, DL. 1992; Firestein, GS. 1999). La formación de nuevos vasos en la sinovial facilitará su crecimiento y la trans migración de linfocitos y PMN al líquido sinovial. La angiogénesis está controlada por distintas citocinas (factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Nagashima, M, Asano, G, Yoshino, S. 2000; Koch, AE, Harlow, LA, Haines, GK, et al. 1994), prostaglandinas (Pg)-E1 y E2 (Form, DM, Auerbach, R. 1983), interleucina 8 (Koch, A, Polverini, S, Kunkel, S, et al. 1992)...) cuya producción está aumentada por el factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa. A su vez esta respuesta será contrarrestada por el interferón (INF)-gamma (Dayer, JM, Arend, WP. 1997), TGFbeta e interleucina (IL)-1 (Norloka, K, Hara, M, Kitani, A, et al. 1987) entre otros. En el pasado se utilizaron fármacos con capacidad para inhibir la angiogénesis para conseguir controlar la enfermedad (D-penicilamina, sales de oro...).

El TNF-alfa estimula también distintas citocinas que activarán a las células endoteliales para producir adhesinas como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1), P-selectina y E-selectina (Gerritsen, ME, Kelley, KA, Ligon, G, et al. 1993; Lally, F, Smith, E, Filer, A, et al. 2005) que facilitarán la extravasación de leucocitos al líquido sinovial y a la médula ósea yuxtaarticular.

Tras pocos meses del inicio de esta neovascularización y migración leucocitaria, la sinovial ha proliferado y existen acúmulos de linfocitos y diversas células inflamatorias alrededor de los capilares (Soden M, Rooney, M, Whelan, A, et al. 2005), que originan una respuesta proliferativa invasiva

semiautónoma de la sinovial. Una de las principales citocinas que generan esta sinovitis es el TNF-alfa; entre sus acciones destacan la inducción de la producción de factor estimulador de colonias granulocitos-macrófagos (GM-CSF), la proliferación de células T, la diferenciación y proliferación de células B, la expresión de moléculas de adhesión del endotelio, de colagenasas, metaloproteinasa de matriz 3 y prostaglandinas en las células sinoviales (Brennan, FM, Maini, RN, Feldmann, M. 1992); además interfiere en los efectos supresores del antígeno en las células T (Valencia, X, Stephens, G, Goldbach-Manski, R, et al. 2006) e induce la síntesis de IL-1b en células sinoviales. La administración de anticuerpos anti TNF-alfa o receptor soluble del TNF-alfa disminuirá la actividad de la enfermedad y la resorción local de hueso (Catrina, AI, af Klint, E, Ernestam, S, et al. 2006).

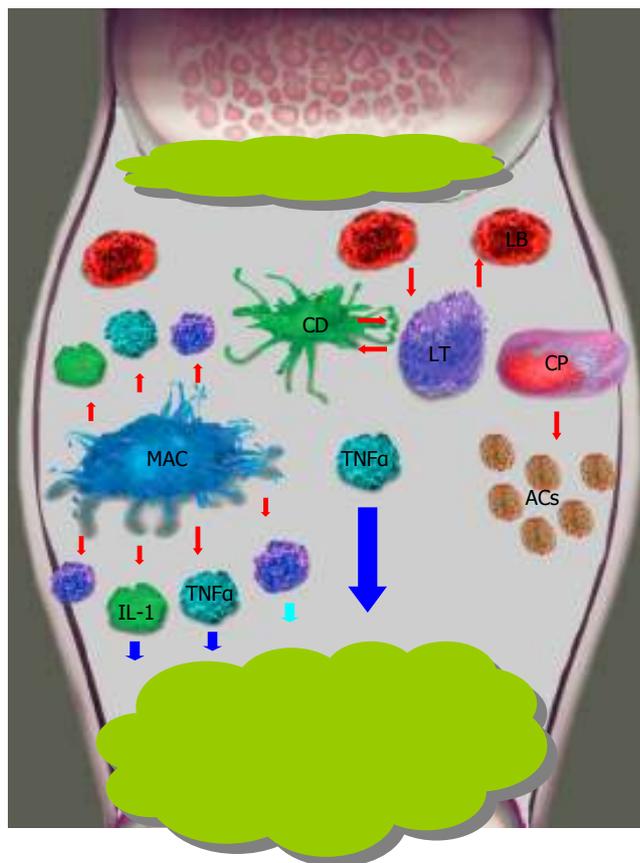
Además de la proliferación e invasión de la sinovial, la acumulación de polimorfonucleares (PMN) en el líquido sinovial liberarán distintas sustancias (mieloperoxidasa, elastasa, lisozima...) con producción de radicales libres de oxígeno que dañarán a las articulaciones (Konttinen, YT, Ainola, M, Valleala, H, et al. 1999; Konttinen, YT, Salo, T, Hanemaaijer, R, et al. 1999).

Por su parte, los linfocitos B, cada vez considerados más importantes en la patogenia de la artritis reumatoide, producen autoanticuerpos (factor reumatoide, anticuerpos antipéptidos citrulinados) con efectos sobre la enfermedad. El papel de las células B en esta enfermedad se ha demostrado con la mejoría clínica y prolongada que ocurre en estos pacientes al administrar anticuerpos monoclonales quiméricos anti CD20 (rituximab).

El complemento activado también tiene actividad inflamatoria intrínseca, y el depósito de inmunocomplejos en la superficie articular parece contribuir a la invasión sinovial del cartílago. La actividad del complemento se reduce durante el tratamiento con anticuerpos monoclonales quiméricos anti TNF-alfa (infliximab) (Familian, A, Voskul, AE, van Mierlo, GJ, et al. 2005).

Factores no propiamente inmunológicos juegan también un papel importante en la patogénesis de la artritis reumatoide: el óxido nítrico sintetizado en mayor cantidad en pacientes con artritis reumatoide debe interactuar con el superóxido para producir peroxinitrito tóxico con efecto tóxico sobre las células

endoteliales, a pesar de su efecto relajante endotelial (Halliwell, B. 1995; Bratt, J, Gyllenhammar, H. 1995); neuropéptidos como la sustancia P, detectada en mayor cantidad en la sinovial de los pacientes con artritis reumatoide (O'Connor, TM, O'Connell, J, O'Brien, DI, et al. 2004), aumentan la expresión de citocinas, estimulan macrófagos y diferenciación de células B, producen proliferación de fibroblastos y atraen neutrófilos. Los metabolitos del ácido araquidónico aumentan la respuesta inflamatoria y la resorción ósea articular antes del desarrollo de erosiones óseas (Carney, DH, Mann, R, Redlin, WR, et al. 1992); los factores de la coagulación y el activador del plasminógeno, presentes en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide (Kikuchi, H, Tanaka, S, Matsuo, O. 1987) estimulan las metaloproteinasas para la degradación articular (Edward D Harris, Jr, MD, FRCP, MACR; Meter H Schur, MD. 2007).



Interacción de distintos tipos celulares en la articulación reumatoide para producir una proliferación semiautónoma de la sinovial (verde). Imagen adaptada de original de Roche labs

CITOQUINAS

1.-PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune es una red diseñada para proteger al huésped de las amenazas externas (bacterias y virus) e internas (transformación maligna) que puede dividirse en: inmunidad humoral, con la producción de anticuerpos por las células B y células plasmáticas, y celular, con las interacciones entre los linfocitos T helper (Th) y citotóxicos con varias células diana.

Las células del sistema inmune producen diversas sustancias que les permiten comunicarse entre sí para dar lugar a un ataque organizado y autolimitado. Las citoquinas son potentes mediadores con propiedades para coordinar la respuesta inmunológica, ser liberadas a la circulación sistémica y unirse a receptores de superficie con alta afinidad, pudiendo también ser liberadas por células no inmunitarias (fibroblastos, células endoteliales...).

El primer paso de la respuesta inmunitaria normal es la presentación antigénica que consiste en la internalización del antígeno por la célula presentadora de antígeno (macrófagos, células dendríticas...) y su degradación en pequeños péptidos para expresarse en el complejo mayor de histocompatibilidad y poder ser presentado a la célula T.

El perfil de citoquinas producido depende del tipo de antígeno, citoquinas del lugar donde se desarrolla la respuesta inmune, y prevalencia del subtipo de células T. Así, los linfocitos Th1 producen INF gamma e IL-2, pero no IL-4, y los linfocitos Th2 producen IL-4 y 10, pero no IL-2 o INF gamma. Los linfocitos Th0 no tienen perfil restringido de citoquinas. A su vez, en función del tipo de respuesta inmunitaria que tenga lugar, la coordinación la llevará a cabo uno u otro tipo de linfocito Th. Así, los tipo 1 coordinarán las reacciones de hipersensibilidad retardada mientras que los tipo 2 se encargarán de regular la respuesta alérgica y mediada por anticuerpos (Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, et al. 1986; Firestein, GS, Roeder, WD, Laxer, JA, et al. 1989).

Los linfocitos T reguladores tienen propiedades supresoras a través de la liberación de otras citoquinas, entre las que destaca TGF-beta (Wahl, SM, Allen,

JB, Wong, HL, et al.1990) e IL-10 (Moore, KW, O´Garra, A, de Waal Malefyt, R, et al. 1993), que permite prevenir que un exceso de respuesta inmune dañe al huésped. Ésto demuestra que las citoquinas son tan importantes para iniciar la respuesta inmunitaria como para terminarla (Firestein, GS. 1995).

Las respuestas inmunológicas aberrantes como la que se produce en la AR pueden producirse por un desbalance Th1/Th2 (Iain B McInnes, FRCP, PhD. 2007).

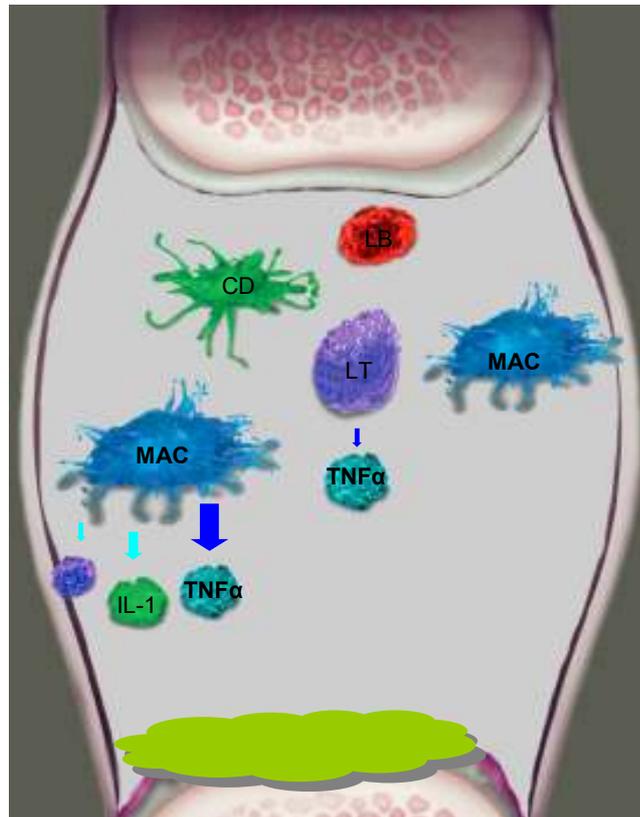
2.-PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

En el momento actual, desde el punto de vista de la patogenia, los factores sintetizados por células T se consideran menos importantes que los producidos por los macrófagos o fibroblastos, demostrado ésto con la eficacia clínica del tratamiento anti TNF-alfa (secretado principalmente por macrófagos y fibroblastos) claramente superior al de otros tratamientos anticitoquina.

El TNF-alfa, que fue originariamente caracterizado por su capacidad para necrosar tumores en ratones, es un potente regulador proinflamatorio e inmunomodulador con importancia considerable en las enfermedades reumáticas. Estimula la producción de colagenasas y prostaglandina E2 por las células sinoviales (Dayer, JM, Beutler, B, Cerami, A. 1985), induce la resorción ósea (Bertolini, DR, Nedwin, GE, Bringman, TS, et al. 1986), inhibe la formación ósea y síntesis de proteoglicanos (Saklatvala, J. 1986) y estimula la resorción de estos últimos. Comparte muchas actividades con la IL-1 (la otra principal citoquina proinflamatoria de la artritis reumatoide, derivada también del macrófago), incluyendo la capacidad para aumentar la producción de citoquinas, expresión de moléculas de adhesión, proliferación y producción de metaloproteinasas por los sinoviocitos. Está presente en líquido sinovial y en suero, y sus niveles se correlacionan con la velocidad de sedimentación globular y recuento leucocitario en líquido.

El bloqueo del TNF-alfa ha demostrado eficacia en modelos murinos de artritis como la artritis inducida por colágeno (Williams, RO, Mason, LJ, Feldmann, M, Maini, RN. 1994). Estudios usando anticuerpos monoclonales que inhiben el TNF-alfa sugerían su utilidad en la artritis reumatoide (Elliott, MJ, Maini, RN,

Feldmann, M, et al. 1994 ; Ulfgren, AK, Andersson, U, Engstrom, M, et al. 2000). Ensayos clínicos posteriores han demostrado la eficacia del anti TNF-alfa en esta enfermedad (Iain B McInnes, FRCP, PhD. 2007).



Predominancia de las citoquinas proinflamatorias secretadas por el macrófago en la sinovial reumatoide, en particular, del TNFalfa. Imagen adaptada de original de Roche labs

3.- IMPLICACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS

El conocimiento del perfil de citoquinas en las enfermedades reumáticas ofrece unas opciones de tratamiento previamente no disponibles, sobre todo en la artritis reumatoide donde su conocimiento es más preciso. Tenemos cinco posibilidades de tratamiento basándonos en la patogenia y perfil de citoquinas de la enfermedad:

1) Inhibición de la producción de citoquinas:

Puede realizarse de tres formas distintas: Mediante la inhibición de su transcripción (los glucocorticoides son potentes inhibidores de la transcripción de interleucina (IL)-1 y TNF-alfa), inhibiendo el proceso postraslacional o inhibiendo las señales intracelulares que regulan la producción de estos mediadores (estas dos últimas opciones se encuentran todavía en investigación).

2) Inhibición de la acción de citoquinas:

Una vez que el gen de la citoquina se ha expresado y su producto se ha sintetizado, una alternativa terapéutica es neutralizar el factor liberado.

Las formas de disminuir o inhibir las funciones de estas citoquinas son cuatro: mediante una proteína antagonista del receptor de superficie celular (Arend, WP. 1991), mediante un antagonista del receptor soluble (Fernandez-Botran, R. 1991), con anticuerpos anticitoquina o contra su receptor (Bendtzen, K, Hansen, MB, Ross, C, et al. 1995) y mediante hebras simples de ADN modificadas químicamente complementarias al ARN mensajero de la citoquina diana (Wei, N, Fiechtner, J, Boyle, D, et al. 2003).

1.- Proteína antagonista del receptor de superficie celular:

Es una proteína biológicamente inactiva que compite con la citoquina para unirse al receptor de membrana celular. Para que sea efectivo debe unir más del 90% de los receptores de membrana por lo que se requieren altas dosis del antagonista para que el tratamiento sea efectivo.

La IL-1ra es una glicoproteína producida por los macrófagos que inhibe competitivamente a la IL-1 al unirse a sus receptores (Arend, WP. 1991). Es un antagonista puro de receptor ya que no induce señal de transducción o internalización del complejo ligando-receptor, pero se necesita un gran exceso del antagonista para inhibir su actividad. Para el tratamiento de la artritis reumatoide existe un antagonista del receptor de la IL-1 recombinante humano

(anakinra) que parece ser útil también para otras enfermedades reumáticas como la Enfermedad de Still y los síndromes autoinflamatorios.

2.- Antagonista del receptor soluble:

El receptor soluble es una forma del receptor de superficie celular desprovisto del dominio transmembrana o citoplasmático manteniendo sin embargo la alta afinidad de unión que tienen estos receptores. A diferencia del receptor de superficie, el receptor soluble une citoquinas libres inhibiendo la unión de estas al de superficie, por lo que se requieren menores dosis del antagonista pero se requiere que permanezca más tiempo en la circulación para ser efectivo.

Se han identificado dos receptores del TNF-alfa (55 kD y 75 kD) que pueden liberarse de la superficie de las células activadas. En base a estos mecanismos de control del TNF-alfa mediante la liberación de receptores solubles, se está utilizando en algunas enfermedades reumáticas un receptor recombinante unido a la fracción constante de la inmunoglobulina (Ig)-G (etanercept, Enbrel®) como agente terapéutico. Al menos otro receptor soluble del TNF-alfa (receptor soluble p55, oncept) está siendo investigado mediante ensayos controlados en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis y artritis psoriásica (Nikas, SN, Drosos, AA. 2003).

La unión del receptor soluble a la citoquina podría interferir con la degradación normal de la citoquina aumentando su vida media en la circulación (Aderka, D, Engelmann, H, Maor, Y, et al. 1992), sin embargo, el significado clínico de este fenómeno es incierto, y los receptores solubles para IL-1 y TNF-alfa han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias crónicas.

3.- Anticuerpos anticitoquina:

Uno de los avances más excitantes en el tratamiento de la artritis reumatoide fue la demostración de la eficacia clínica de los anticuerpos monoclonales anti TNF-alfa. La administración del anticuerpo monoclonal quimérico ratón-humano cA2 (ahora conocido como infliximab) a pacientes con esta enfermedad originó una mejoría rápida del dolor y de la tumefacción (Elliot, MJ, Maini, RN,

Feldmann, M, et al. 1993; Elliot, MJ, Maini, RN, Feldmann, M, et al. 1994; Elliot, MJ, Maini, RN, Feldmann, M, et al. 1994; Maini, RN, Breedveld, FC, Kalden, JR, et al. 1998). Posteriores estudios han establecido la eficacia de los anticuerpos anti TNF-alfa en otras enfermedades reumáticas. Su mecanismo de acción es multifactorial ya que el TNF-alfa está involucrado en un gran número de procesos, incluyendo activación endotelial, inducción de metaloproteinasas (MMP) y moléculas de adhesión, neovascularización... Los efectos secundarios de los anticuerpos anti TNF-alfa han sido poco frecuentes, pero la experiencia clínica con estos agentes todavía está progresando. Hoy en día es obligado hacer un screening cuidadoso para tuberculosis (Wolfe, F, Michaud, K, Anderson, J, Urbansky, K. 2004) y otras infecciones. Algunos de los pacientes tratados crean anticuerpos antinucleares (10-15%) y un pequeño porcentaje pueden desarrollar un síndrome lupus-like. Se ha observado un aumento del riesgo de linfoma en asociación con el uso de infliximab, aunque este riesgo parece correlacionarse más con la propia artritis reumatoide que con la terapia biológica.

4.- La administración de hebras simples de ADN modificadas químicamente complementarias al ARN mensajero de la citoquina diana interfiere la traslación del ARN mensajero a proteína y puede aumentar la degradación del ARN mensajero unido.

3) Administración de citoquinas inhibitorias:

Existe una variedad de citoquinas antiinflamatorias que limitan la extensión y severidad de la inflamación. En su ausencia, el proceso inflamatorio es mayor y puede dar lugar a condiciones patológicas, por lo que otra posible alternativa terapéutica para las enfermedades reumáticas puede ser la administración de estas citoquinas supresoras. Sin embargo, hoy en día no han demostrado eficacia en estudios clínicos, y aún no está claro si esta aproximación puede reestablecer la homeostasis inmunológica necesaria para obtener beneficios terapéuticos. Algunos ejemplos de citoquinas con potencial inhibitorio son el TGFbeta, cuya administración parenteral puede suprimir la artritis en modelos

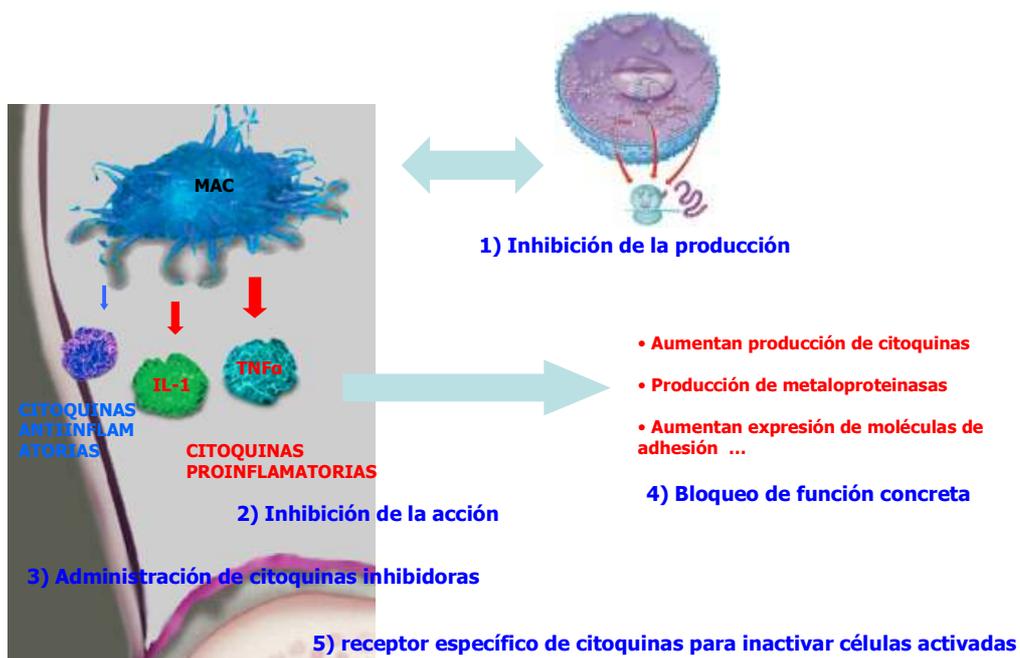
animales (Brandes, ME, Allen, JB, Ogawa, Y, Wahl, SM. 1991), la IL-4, que ha demostrado suprimir in vitro la producción de citoquinas y proteasas de cultivos de líquido sinovial (Miossec, P, Briolay, J, Dechanet, J, et al. 1992), o el INF-gamma, que inhibe algunos aspectos de la activación de sinoviocitos mediada por citoquinas (Alvaro-Gracia, JM, Zvaifler, NJ, Firestein, GS. 1990).

4) Bloqueo de la función de citoquinas:

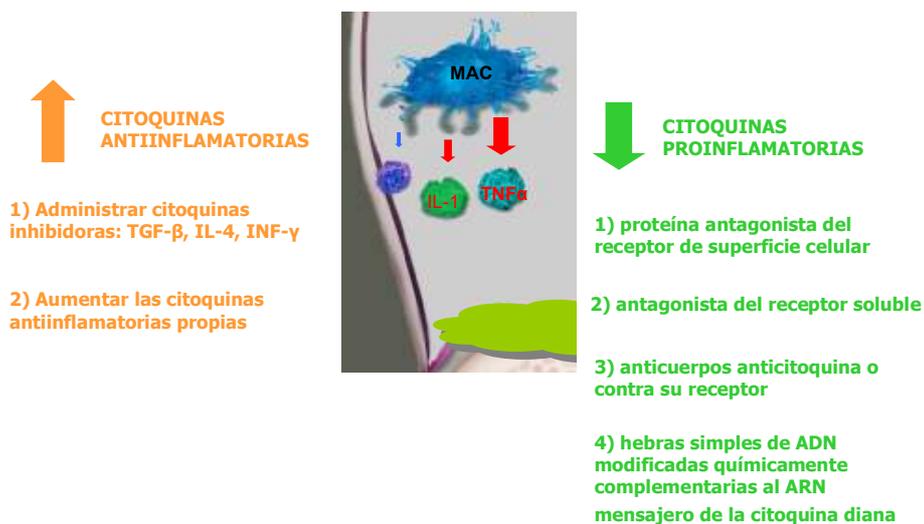
Una estrategia para la disminución de la concentración de citoquinas intraarticulares es el bloqueo selectivo de funciones específicas, con lo que se podrían prevenir sus efectos deletéreos. Hoy en día no está claro si se puede producir una inhibición específica con efecto terapéutico. Quizás las dianas más prometedoras son la inhibición de las metaloproteinasas, de la expresión de moléculas de adhesión, y de las pequeñas moléculas mediadoras de la inflamación como los leucotrienos, prostaglandinas y bradiquininas.

5) Uso de receptores específicos de citoquinas para inactivar células activadas:

Si estas células se suprimieran de forma selectiva se abortaría terapéuticamente la respuesta inmune (por ejemplo, con un receptor de alta afinidad contra IL-2 expresada por las células B y T activadas).



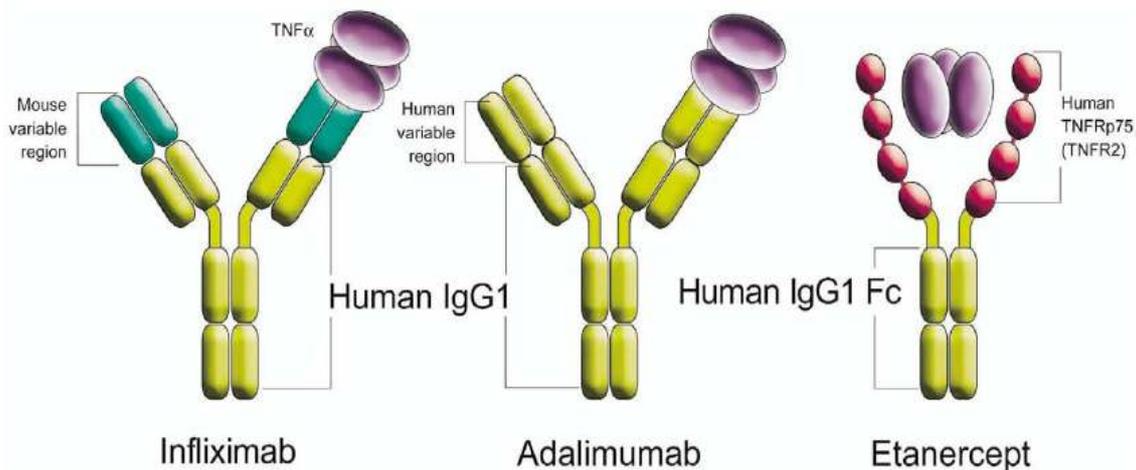
Posibilidades terapéuticas en la artritis reumatoide basándonos en el perfil de citoquinas y patogénesis de la enfermedad



Posibilidades terapéuticas en la artritis reumatoide modificando el equilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y las antiinflamatorias.

TRATAMIENTO ANTI TNF-ALFA: ETANERCEPT

Existen tres antagonistas del TNF-alfa aprobados para el tratamiento de la artritis reumatoide: proteína de fusión contra el receptor soluble p75 del TNF-alfa (etanercept, Enbrel®), anticuerpo monoclonal quimérico ratón/humano anti TNF-alfa (infiximab, Remicade®) y anticuerpo monoclonal totalmente humano (adalimumab, Humira®).



Estructura de los tres tipos de anti TNF-alfa disponibles. *Semin Arthritis Rheum* 34 (suppl 1):19-22, 2005

El etanercept es una proteína de fusión contra el receptor p75 del TNF-alfa que une el TNF-alfa y tiene una mayor vida media que el receptor soluble nativo. Varios ensayos clínicos han probado que la eficacia del etanercept en pacientes con artritis reumatoide es mayor que el placebo (Blumenauer, B, Judd, M, Cranney, A, et al. 2003), similar al metotrexate, pero de comienzo más rápido, y que la adición del etanercept al tratamiento con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad es eficaz para pacientes con una respuesta insuficiente al metotrexate (Moreland, LW, Baumgartner, SW, Schiff, MH, et al. 1997; Moreland, LW, Schiff, MH, Baumgartner, SW, et al. 1999; Moreland, LW, Cohen, SB, Baumgartner, SW, et al. 2001; Weinblatt, MH, Kremer, JM, Bankhurst, AD, et al. 1999; Bathon, JM, Martin, RW, Fleischmann, RM, et al. 2000; Petersen, K, Leff, R, Paulsen, G, et al. 2003). La dosis recomendada de

etanercept es 25 mg dos veces por semana ó 50 mg en dosis única semanal (Keystone, EC, Schiff, MH, Kremer, JM, et al. 2003).

El etanercept es generalmente bien tolerado pero pueden tener lugar efectos adversos como la reacción local en la zona de inyección (37% de los pacientes) o complicaciones como el inicio o exacerbación de psoriasis (Sari, I, Akar, S, Birlik, M, et al. 2006).

Se han observado infecciones serias en un 2,9% de los pacientes, documentándose 6 muertes por infección entre los 25.000 pacientes estimados tratados con este agente tras la aprobación del fármaco (Prescribing Information, Etanercept (ENBREL®) Immunex Corporation, 1999). En la vigilancia postmarketing de más de 150.000 pacientes tratados con etanercept se documentaron 36 casos de tuberculosis, 11 infecciones por micobacterianas atípicas, 73 candidiasis, 7 aspergilosis, 8 infecciones por citomegalovirus, 7 criptococosis y 1 coccidiomicosis entre otras (Ruderman, EM, Markenson, JA. 2003). A pesar del bajo número de casos de tuberculosis asociados al uso de etanercept una proporción significativa de pacientes afectados se presentó con manifestaciones extrapulmonares (Winthrop, KL, Siegel, JN, Jerez, J, et al. 2005). Esto hace que a los pacientes que vayan a iniciar tratamiento con etanercept se les realice un screening para tuberculosis latente antes del tratamiento mediante una adecuada historia de tuberculosis y un test PPD. Se ha observado una mayor incidencia de infección en los pacientes que reciben tratamiento con etanercept y anakinra (Weisman, MH. 2002) por lo que no se recomienda el uso de estos dos agentes de forma combinada.

Existe alguna preocupación con el uso de etanercept en pacientes con enfermedad desmielinizante preexistente (Prescribing Information, Etanercept (ENBREL®) Immunex Corporation, 2000; van Oosten, BW, Barkhof, F, Truyen, L, et al. 1996; Mohan, N, Edwards, ET, Cupps, TR, et al. 2001; Shin, IS, Baer, AN, Kwon HJ, et al. 2006). La FDA ha documentado 17 casos de enfermedad desmielinizante en pacientes que recibían tratamiento con etanercept entre el año 1998 y el 2000 (Mohan, N, Edwards, ET, Cupps, TR, et al. 2001). Los síntomas incluían confusión, ataxia, disestesias y parestesias. La resonancia magnética encontró datos sugerentes de desmielinización en cerebro y médula

de muchos pacientes. La incidencia de enfermedad desmielinizante en pacientes que recibían tratamiento con etanercept parecía ser mayor que la de la población general, de todas formas estos datos no establecieron una relación causal entre tratamiento con etanercept y enfermedad desmielinizante, y todavía no existen datos suficientes en cuanto al riesgo del tratamiento con infliximab. Aún así, parece razonable evitar el uso de anti TNF-alfa en pacientes con enfermedad desmielinizante establecida e interrumpir de forma inmediata el tratamiento en cualquier paciente con sospecha de ésta mientras se realizan las pruebas diagnósticas convenientes.

La vigilancia postmarketing también ha identificado pacientes que han desarrollado linfoma durante el tratamiento con anti TNF-alfa. En 2002 un artículo notificó 18 casos entre los pacientes tratados con etanercept (Brown, SL, Greene, MH, Gershon, SK, et al. 2002), basándose en datos de la FDA y, aunque no establecían relación causal, sí que existía un aumento de la tasa de linfoma en comparación con otras formas de inmunosupresión. Datos presentados por la FDA en 2003 incluyeron 70 casos de linfoma entre aproximadamente 140.000 pacientes tratados con etanercept, con una tasa anual de 0,3% (Silman, A. 2003) y cuando se compara con su segmento correspondiente de la población general por edad y sexo la tasa está aumentada. De todas formas no es sustancialmente mayor que la de los pacientes con artritis reumatoide en general (Gridley, G, McLaughlin, JK, kbom, A, et al. 1993; Ekstrom, K, Hjalgrim, H, Bandt, L, et al. 2003). Los datos de enfermedad maligna no linfomatosa fueron revisados por la FDA en 2003 sin encontrar datos de aumento del riesgo en relación con tratamiento anti TNF-alfa.

Existen datos de pancitopenia y anemia aplásica posiblemente debida a etanercept (Prescribing Information, Etanercept (ENBREL®) Immunex Corporation, 2000) y 2 estudios de este fármaco en pacientes con fallo cardíaco (estadios II-IV de la NYHA) revelaron que no existía aumento sustancial de la morbimortalidad (Ander, SD, Cotas, AJ. 2002). Sin embargo, en dosis de 25 mg tres veces por semana existía una tendencia al aumento de la morbilidad en pacientes con NYHA II. La vigilancia postmarketing de la FDA en 2003 incluyó

38 casos de fallo cardíaco nuevo y 9 de exacerbación de la enfermedad en pacientes tratados con etanercept (Kwon, HJ, Cote, TR, Cuffe, MS, et al. 2003). Se necesitan más datos para determinar el efecto de la significación clínica de estos hallazgos en pacientes con fallo cardíaco establecido. A pesar de los datos no concluyentes se alerta del riesgo del uso de este fármaco en pacientes con fallo cardíaco.

Aproximadamente el 16% de los pacientes a los que se les administra etanercept desarrollan anticuerpos no neutralizantes contra el receptor soluble que aparentemente no han tenido influencia en la eficacia/seguridad del fármaco. Además un 11-15% de los pacientes tratados con etanercept desarrollan nuevos ANAs y/o antiDNAs comparado con el 5% de los pacientes a los que se les administró placebo. Al final del 2003 se habían notificado 40 casos de síndrome lupus-like por el tratamiento con este fármaco aunque parece ser un efecto secundario raro de este tratamiento (De Bandt, M, Sibilia, J, Le Loet, X, et al. 2005).

Los tratamientos anti TNF-alfa pueden disminuir la progresión del daño articular avalado por radiografía. Los efectos del etanercept e infliximab parecen ser similares (Finckh, A, Huang, J, Liang, MH, et al. 2003). La falta de respuesta a un anti TNF-alfa no predice la falta de respuesta a otro agente de su misma clase (Brocq, O, Plubel, Y, Breuil, V, et al. 2002; Hansen, KE, Hildebrand, JP, Genovese, MC, et al. 2004).

CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS

La cicatrización fue clásicamente dividida en tres etapas, inflamación, maduración y remodelado, aunque hoy en día se considera que existe un solapamiento entre éstas y que más que una simple sucesión de procesos se trata de una serie de complejas reacciones que tiene lugar entre células y mediadores inflamatorios (George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Manis MD, Christopher E. Attinger MD, 2006). A continuación se describen las principales características de cada una de las fases de la cicatrización:

1) Hemostasia e inflamación (del daño inmediato a los días 4-6):

La primera respuesta que tiene el organismo al daño realizado es el control del sangrado. Los vasos sanguíneos se contraerán y el colágeno expuesto durante la realización de la herida activará la cascada de la coagulación para la formación del coágulo, que estará compuesto por colágeno, plaquetas, trombina y fibronectina. La formación del coágulo, además de la contención del sangrado, tiene tres funciones básicas en la cicatrización: (1) la liberación de citoquinas y factores de crecimiento que pondrán en marcha la respuesta inflamatoria (Witte, M., and Barbul, A. 1997); (2) actuar como andamio de la futura nueva matriz que será colonizado en fases posteriores por distintos tipos de células (Kurkinen, M, Vaeheri, A, Roberts, P, et al. 1980) y (3) servir como zona de concentración de citoquinas y factores de crecimiento (Martin, P. 1997).

Una vez contenido el sangrado y formado el coágulo comenzará la respuesta inflamatoria. Los vasos sanguíneos se dilatarán y los neutrófilos serán atraídos al lecho de la herida mediante quimiotaxis inducida por el TNF α , IL-1, TGF- β , PF4 y productos bacterianos (Pohlman, T., Stanness, K., Beatty, P., et al. 1986; Bevilacqua, M., Pober, J., Wheeler, M., et al. 1985). Las funciones de los neutrófilos en la herida son básicamente dos: (1) liberar enzimas proteolíticas, que digieran las bacterias y el tejido no viable (George Broughton II, M.D., PhD., COL., M.C. USA. Jeffrey E. Manis, M.D. Christopher E. Attinger, M.D., 2006) y (2) formar radicales libres de oxígeno que se combinen con clorina para esterilizar la zona de la herida (Yager, D., and Nwomeh, B. 1999).

Cuando los neutrófilos han realizado su trabajo se induce su apoptosis por un estímulo no conocido y tiene lugar la atracción de monocitos de la sangre y tejidos cercanos (generalmente entre 48 y 96 horas después del daño). Éstos se transformarán en macrófagos activados y (1) fagocitarán los neutrófilos muertos, (2) se “comerán” la matriz extracelular dañada gracias a las metaloproteinasas sintetizadas por el estímulo del TNF- α (Abraham, D., Shiwen, X., Black, C., et al. 2000), (3) promoverán la angiogénesis mediante síntesis de VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos y TNF- α , (4) la fibroplasia por síntesis de TGF- β , factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), IL-1 y TNF- α , y (5) sintetizarán óxido nítrico (NO) gracias a la activación de la NO sintetasa por el TNF- α e IL-1, (Witte, M., and Barbul, A. 2002). El NO formado por los macrófagos reaccionará con los radicales de peróxido de oxígeno para formar peroxinitrito todavía más tóxico que los radicales hidroxilo y que le servirá a los macrófagos para continuar matando patógenos (Goldman R, 2004).

Las metaloproteinasas, expresadas por los queratinocitos, fibroblastos, monocitos y macrófagos en respuesta al TNF- α , limpiarán detritos inflamatorios y provocan la migración de células a través de la matriz (Abraham D, Shiwen X, Black C, et al, 2000).

La fase inflamatoria se limita gracias a señales de frenado a través de la ciclooxigenasa (COX) tipo 2 (Sheran, C., and Chiang, N. 2004; Nathan, C., 2002).

2) Fase proliferativa: epitelización, angiogénesis y formación de la matriz provisional (del día 4 al 14):

Las células epiteliales proliferan para formar una barrera protectora contra la pérdida de fluidos y la invasión bacteriana. Para ello, la IL-1 y el TNF- α aumentan en los fibroblastos la expresión del gen que codifica el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) con lo que favorecerá la síntesis de KGF-1, KGF-2 e IL-6 y los queratinocitos próximos migrarán al lecho de la herida, proliferarán y se diferenciarán (Smola, H., Thiekotter, G., and Fusenig, N. 1993; Xia, Y., Zhao, Y., Marcus, J., et al. 1999).

A continuación, las células endoteliales de las vénulas serán estimuladas para la formación de nuevos capilares necesarios para que siga avanzando el proceso de cicatrización. Una vez atraídos y diferenciados, los queratinocitos, estimulados por la IL-1, TNF- α , TGF- β 1, y KGF, sintetizarán factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que estimulará a su vez a las células endoteliales de las vénulas para la formación de los nuevos capilares.

Iniciada ya la formación de los nuevos vasos, tendrá lugar la formación del tejido de granulación para lo que serán necesarios (1) la migración de fibroblastos y síntesis de colágeno, (2) la transformación de fibroblastos en miofibroblastos, y (3) el aumento de integrinas. La migración de fibroblastos y síntesis de colágeno tendrá lugar gracias al estímulo del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), y dará lugar a la formación de la matriz provisional (tejido de granulación) compuesta por colágeno tipo III, glucosaminoglicanos y fibronectina (Pierce, G., Mustoe, T., Altrock, B., et al. 1991). La transformación de fibroblastos en miofibroblastos gracias al factor de crecimiento transformador (TGF)- β 1, inducirá la contracción de la herida, y el aumento de integrinas, que tendrá lugar por la acción del TNF- α , servirá para anclar las células a la matriz provisional (Gailit, J. X., Bueller, J., and Clark, H. R. 1996).

La señal que limita la formación de tejido de granulación parece proceder de la proteína inducible por el interferon (IP-10), que inhibe la motilidad de los fibroblastos inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) limitando el reclutamiento de fibroblastos, y del PF4, que tiene un efecto mitótico negativo en los fibroblastos (Henry, G., and Garner, W. 2003).

3) Maduración y remodelado. Depósito de colágeno en una red organizada (día 8 al año):

Clínicamente, la fase de maduración y remodelado es quizás la más importante. La principal característica de esta fase es el depósito de colágeno en una red organizada.

La construcción de la matriz de la herida sigue un patrón. Inicialmente la matriz está compuesta por fibrina y fibronectina (Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P.,

et al. 1980), pero inmediatamente después los fibroblastos sintetizarán glucosaminoglicanos, proteoglicanos y otras proteínas (Witte, M., and Barbul, A. 1997) que se distribuirán de forma desorganizada. Esta será la red preeliminar para la formación de la nueva matriz que posteriormente será reemplazada por una matriz organizada y más fuerte hecha de colágeno. El depósito de colágeno tiene lugar durante 4 ó 5 semanas, primero mediante la disposición de fibras delgadas paralelas a la piel que después se reabsorberán (parece que influenciada/protagonizada por las metaloproteinasas que son estimuladas en parte por la IL-1 y TNF- α e inhibidas por el TGF- β) para dar lugar al depósito de fibras más gruesas paralelas a las líneas de estrés. Estos cambios se acompañan de un aumento de la fuerza tensil de la herida, indicando una correlación positiva entre el espesor de las fibras/orientación y la fuerza tensil (Witte, M., and Barbul, A. 1997).

La tasa aumentada de la síntesis de colágeno durante la cicatrización se debe no sólo al aumento del número de fibroblastos sino a un aumento neto de la cantidad de colágeno producida por célula (Diegelmann, R. 2003; Madden, J. W., Smith, H. C., 1970). Las metaloproteinasas, estimuladas por el TNF- α e inhibidas por el TGF- β entre otros, se encargarán de que el depósito de colágeno no sea excesivo mediante su degradación (Jones et al, 1995).

El colágeno del tejido de granulación es bioquímicamente distinto al de la piel sana (Forrest, L. 1983) y nunca llegará a ser igual que el de la piel normal (no alcanza el 100% de resistencia sino que se quedará en torno al 80% que alcanzará a los tres meses) (Sabiston, D. 1997).

MANEJO PERIOPERATORIO DE LOS PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

Todo paciente que va a ser sometido a una intervención quirúrgica precisa una valoración preoperatoria del riesgo quirúrgico. En los pacientes con artritis reumatoide esto es especialmente importante por tres razones: se trata de pacientes con un riesgo cardiovascular aumentado por la propia enfermedad y por el uso de corticoides (Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, et al. 2003; Goodson N. 2002; Bacon PA, Stevens RJ, Carruthers DM et al. 2002), pueden presentar factores mecánicos de interés para el anestesista como la afectación de las articulaciones cricoaritenoides, temporomandibular o la subluxación de la articulación atloaxial, y se trata de pacientes inmunodeprimidos por el tratamiento que están recibiendo para mantener controlada su enfermedad (Peter A. Rosandich, Joe T. Kelley, III and Doyt L. Conn, 2004). Básicamente los fármacos utilizados en un paciente con artritis reumatoide son antiinflamatorios no esteroideos, glucocorticoides, fármacos modificadores de la enfermedad y modificadores de respuesta biológica (anti TNF-alfa y anti IL-1). Estos fármacos afectan a la inflamación y respuesta inmunitaria local, las cuales son necesarias para una adecuada curación de la herida en el periodo perioperatorio, pudiendo provocar complicaciones postoperatorias como dehiscencia de la herida, infección, y dificultad para la síntesis de colágeno, retrasando la cicatrización. Para algunos fármacos como el metotrexate se han llevado a cabo ensayos en humanos que nos orientan en qué hacer en el periodo perioperatorio. Con otros, debemos confiar en estudios realizados en animales, o en la extrapolación de datos de estudios en humanos no realizados específicamente para comprobar la curación de las heridas. Desafortunadamente no existen consensos claros en la necesidad y el tiempo óptimo de retirada del tratamiento previamente a la cirugía. Igualmente, los clínicos nos sentimos frecuentemente indecisos en el tiempo apropiado para reanudar el tratamiento después de la intervención. Para estos fármacos con datos limitados o sin ellos en este aspecto, deben considerarse sus propiedades farmacocinéticas y los efectos biológicos de cada fármaco. En algunos casos, la

interrupción del tratamiento puede requerir hasta 4 semanas antes de la cirugía debido a su larga vida media, por lo que los pacientes pueden experimentar una exacerbación o un brote de la enfermedad. Debemos evaluar de forma cuidadosa los factores de riesgo del paciente, la severidad de la enfermedad y la farmacocinética de los tratamientos y sopesar los riesgos y beneficios de la interrupción del tratamiento en el periodo perioperatorio (Busti AJ, Hooper JS, Amaya CJ, Kazi S. 2005).

1.- ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS Y GLUCOCORTICOIDES

La influencia de los antiinflamatorios no esteroideos y los glucocorticoides en la cicatrización e infección postoperatoria ha sido revisada de forma extensa en la literatura. Con excepción de los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-2 y los salicilatos no acetilados, los antiinflamatorios no esteroideos inhiben la COX-1 bloqueando la formación de tromboxano A2 derivado de plaquetas por lo que empeoran la agregación plaquetaria dependiente de tromboxano aumentando el tiempo de sangrado (Schafer AI, 1995). El ácido acetil salicílico es el único que bloquea la COX-1 de forma irreversible, dando lugar a una inhibición efectiva de la plaqueta de por vida, por lo que este fármaco debe suspenderse 10 días antes de la cirugía (vida estimada de la plaqueta). En el caso de otros antiinflamatorios no esteroideos la inhibición desaparecería con el aclaramiento del fármaco, y se recomienda, para permitir una adecuada eliminación, que exista un tiempo entre su suspensión y la cirugía igual a cinco vidas medias del fármaco. Los inhibidores selectivos de la COX-2 y salicilatos no acetilados no necesitan ser suspendidos (en cuanto a problemas de antiagregación) porque no afectan a la inhibición plaquetaria.

La retirada preoperatoria de los glucocorticoides da lugar a una insuficiencia adrenal yatrogénica, por lo que se deben suplementar en función de la magnitud de la cirugía y de la enfermedad del paciente (Salem M, Tainsh RE Jr, Bromberg J, et al, 1994; Cooper MS, Stewart PM, 2003; Coursin DB, Word KE, 2002; Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH, 1997), pero teniendo en cuenta que dosis excesivas pueden tener efectos indeseables (hiperglucemia, hipertensión, alteraciones de la cicatrización, psicosis e inmunosupresión con su

consecuente aumento de la susceptibilidad a las infecciones) (Salem M, Tainsh RE Jr, Bromberg J, et al, 1994; Shaw M, Mandell BF, 1999). Los pacientes con tratamiento crónico con glucocorticoides deben recibir su dosis habitual diaria durante el periodo preoperatorio con una suplementación como muestra la siguiente tabla (Cooper MS, Stewart PM, 2003; Coursin DB, Word KE, 2002; Annane D, Sebille V, Charpentier C, et al, 2002; Rosandich PA, Kelley JT, III and Conn DL, 2004):

Estrés médico o quirúrgico	Dosis de glucocorticoide
Menor Reparación de hernia inguinal Colonoscopia Enfermedad febril leve Náuseas/vómitos moderados Gastroenteritis leve	25 mg hidrocortisona ó 5 mg metilprednisolona iv en el día del procedimiento
Moderado Colecistectomía abierta Hemicolectomía Enfermedad febril importante Neumonía Gastroenteritis severa	50-75 mg hidrocortisona ó 10-15 mg metilprednisolona iv en el día del procedimiento y disminuir en 1-2 días hasta la dosis habitual
Severo Cirugía cardiotorácica Resección hepática Pancreatitis	100-150 mg hidrocortisona ó 20-30 mg metilprednisolona iv en el día del procedimiento y disminuir en 1-2 días a dosis habitual
Paciente crítico Shock séptico Hipotensión por sepsis	50 mg de hidrocortisona iv cada 6 horas con 50 µg fluorhidrocortisona al día durante 7 días

Tabla 1: Recomendaciones para la suplementación corticoidea
Esta tabla es una réplica de la publicada por Coursin y Wood (2002) con una adaptación de Annane y cols (2002)

2.- FÁRMACOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD

Los fármacos modificadores de la enfermedad más utilizados en la artritis reumatoide son el metotrexate, leflunomida, sulfasalazina, azatioprina e hidroxicloroquina. Esta última puede no suspenderse ante una intervención quirúrgica, mientras que la leflunomida, sulfasalazina y azatioprina deben suspenderse 2 semanas antes y reintroducirlas unos días después. El metotrexate, uno de los FAMES más eficaces y eficientes en la artritis reumatoide, sólo se retirará 2 semanas antes de la intervención si el paciente presenta compromiso renal o factores de riesgo como insuficiencia renal, edad

avanzada, diabetes mellitus descontrolada, enfermedad pulmonar o renal significativa, abuso de alcohol, y moderadas/elevadas dosis de GCs (>10mg/día de prednisona) (Kelley JT, Conn DL, 2002; Rosandich PA, Kelley JT, III and Conn DL, 2004).

3.- MODIFICADORES DE RESPUESTA BIOLÓGICA

Los modificadores de respuesta biológica utilizados en la artritis reumatoide incluyen los tres anti TNF-alfa (infiximab, etanercept y adalimumab), el único antagonista de la IL-1 (anakinra) y un anticuerpo monoclonal anti CD20 (rituximab).

No se han realizado ensayos formales para ver la evolución quirúrgica de pacientes tratados con esta medicación, por lo que sólo disponemos de un estudio prospectivo de pacientes tratados con anti TNF-alfa que fueron sometidos a cirugía reconstructiva de pie y tobillo (Bibbo C, Goldberg JW, 2004) y datos del uso perioperatorio del infiximab por su utilización en la Enfermedad de Crohn. De todas formas, el extrapolar los datos de pacientes con enfermedad de Crohn a pacientes con artritis reumatoide debe hacerse con cautela al tratarse de distintas enfermedades con distintos protocolos para el uso de infiximab. Los pacientes con Enfermedad de Crohn llevan más tiempo recibiendo tratamiento con infiximab pero durante un corto periodo de tiempo o incluso con una única infusión, en cambio los pacientes con artritis reumatoide reciben tratamiento, de momento, de forma indefinida (Rosandich PA, Kelley JT, III and Conn DL. 2004).

3.1- ANTI TNF-ALFA Y CIRUGÍA ORTOPÉDICA

El único estudio publicado hasta el día de hoy de pacientes en tratamiento anti TNF-alfa que fueron sometidos a cirugía ortopédica, lo realizaron, en el año 2004, Bibbo y Goldberg en el Departamento de Cirugía Ortopédica de la Clínica Marshfield (EEUU), inscribiendo a treinta y un pacientes con artritis reumatoide que dividieron en dos grupos. El primer grupo (grupo 1, edad media de 50 años, rango 40-66) consistió en 16 pacientes que estaban recibiendo tratamiento activo con etanercept dos veces por semana mediante inyección

subcutánea, o infliximab intravenoso en infusión cada 8 semanas (no especificaban dosis). El grupo de tratamiento fue comparado con pacientes con artritis reumatoide que no estaban siendo tratados con inhibidores del TNF-alfa (grupo 2, edad media de 60 años, rango 41-73 años). No se encontraron diferencias entre los dos grupos con respecto al uso de antiinflamatorios no esteroideos, metotrexate, leflunomida, o corticoides (dosis no especificadas). Los pacientes que estaban en tratamiento con etanercept recibieron su última dosis preoperatoria entre 1 y 10 días antes de la cirugía (media 2.6 días), mientras que los pacientes que estaban recibiendo infliximab su última dosis preoperatoria fue 2-45 días antes de la cirugía (media 20.2 días). Ambos grupos reanudaron sus respectivos tratamientos inmediatamente después de la cirugía de acuerdo con su calendario previo de dosis. A todos los pacientes se les administró profilaxis antibiótica perioperatoria durante 72 horas. A pesar del alto porcentaje de fumadores en el grupo 1 (37.5% vs 0.0%, $p=0.02$), los pacientes del grupo 2 experimentaron una tasa de complicaciones global superior (tasa no dada, $p=0.033$) en un tiempo medio de seguimiento de 9.7 meses. Los investigadores concluyeron que los inhibidores del TNF-alfa podrían administrarse de forma segura en el periodo perioperatorio sin aumento del riesgo de infecciones o complicaciones de la cicatrización (Bibbo C, Goldberg JW. 2004).

A pesar de los hallazgos del estudio mencionado, parece razonable asumir que el desarrollo de una infección por patógenos oportunistas (como resultado del tratamiento con inhibidores del TNF-alfa) puede dar lugar a un aumento del riesgo de complicaciones postoperatorias para el paciente. Se necesitan estudios adicionales prospectivos para examinar la frecuencia y relación de las complicaciones postoperatorias con el uso de etanercept, infliximab o adalimumab entre los pacientes con enfermedades autoinmunes. Hasta que estos estudios sean realizados, sólo podemos considerar los datos del uso de los inhibidores del TNF-alfa en otras poblaciones de pacientes.

3.2- INFLIXIMAB Y ENFERMEDAD DE CROHN

En cuanto a pacientes con Enfermedad de Crohn tratados con infliximab disponemos de seis estudios y dos abstracts que avalan la eficacia de su aplicación tanto sistémica como local para la curación de las úlceras y fístulas asociadas a esta enfermedad.

En el año 2003, Topstad y colaboradores publicaron un estudio, realizado en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Calgary (Canadá), que tenía como objetivo evaluar la eficacia del infliximab en la cicatrización de la enfermedad de Crohn anorrectal fistulizante (Topstad DR, Panaccione R, Heine JA, et al. 2003). Se incluyeron veintinueve pacientes con una edad media 31 años con fístulas perianales (21) y fístulas rectovaginales (8) de larga evolución que no respondieron a tratamiento quirúrgico y/o tratamiento médico estándar. Catorce de los 21 pacientes (67%) con fístulas perianales tuvieron una respuesta completa, 4 de los 14 volvieron a padecer un brote de la enfermedad pero todos tuvieron una respuesta completa al retratamiento. Cuatro de los 21 pacientes (19%) tuvieron una respuesta parcial, definida por una disminución del drenaje de la fístula (2 pacientes) o dependencia del infliximab (2 pacientes), requiriendo infusión del fármaco cada 6-8 semanas. Tres pacientes (14%) no respondieron al tratamiento. De los 8 pacientes con fístulas rectovaginales sólo uno tuvo una respuesta completa, 5 tuvieron una respuesta parcial, y dos no respondieron a tratamiento. Dos de los respondedores parciales se hicieron dependientes del infliximab. Se vio una respuesta completa o parcial en el 86% de los casos. Este estudio no muestra empeoramiento de las tasas de cicatrización en pacientes con fístulas anorrectales.

Otro estudio, realizado en el Servicio de Enfermedades Digestivas-Hepatología y la División de Cirugía Colorrectal de la Clínica Mayo (Rochester, Minnesota, EEUU), tenía como objetivo examinar si el uso de corticoides, inmunosupresores (azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexate) o infliximab antes de la cirugía abdominal para la Enfermedad de Crohn (resección colónica, estricturoplastia, o ambos) se asociaba a un aumento de las complicaciones postoperatorias (Colombel JF, Loftus EV, Tremaine WJ, et al, 2004). Este análisis retrospectivo incluyó 52 pacientes que habían recibido infliximab

5mg/kg dentro de las 8 semanas antes de la cirugía o 4 semanas tras ésta, con o sin otros inmunosupresores (la proporción de individuos que estaban recibiendo cada agente no fue especificada). La edad media de los pacientes fue de 40 años, y la principal indicación para cirugía fue la estricturación del colon. Los pacientes que estaban recibiendo infliximab tuvieron una tasa del 17% de complicaciones sépticas (OR 0.9%, 95% CI 0.4-1.9) y una tasa del 23% de cualquier complicación (OR 1.0, 95% CI 0.5-2.0) dentro de los 30 días después de la cirugía. Las complicaciones sépticas incluían infección de la herida e infecciones intra y extraabdominales. Las complicaciones no sépticas incluían brotes de la enfermedad, sangrado gastrointestinal, obstrucción de intestino delgado, y tromboembolismo. Sus resultados mostraron que no había diferencias en el desarrollo de complicaciones postoperatorias por el uso concomitante de corticoides o inmunosupresores. Esto conduce a los autores a creer que no había asociación significativa entre el tratamiento con infliximab y las complicaciones postoperatorias, y concluyen que el infliximab puede administrarse de forma segura en el perioperatorio a los pacientes que se sometan a cirugía abdominal para la enfermedad de Crohn.

Además de no encontrarse un aumento de la tasa de complicaciones quirúrgicas de los pacientes con enfermedad de Crohn sometidos a cirugía como muestran los artículos citados, existen tres publicaciones que sugieren una mejoría de la curación de las fístulas de la Enfermedad de Crohn cuando se utilizan de forma concomitante infliximab y cirugía. Así, en el año 2003 un grupo de investigadores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Pittsburgh (Pennsylvania, EEUU) publicó un artículo que mostraba el beneficio del uso concomitante de cirugía e infliximab para la curación de la enfermedad de Crohn fistulizante (Regueiro M, Mardini H, 2003) que confirmaría dos años después un estudio realizado en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Maastricht (van der Hagen SJ, Baeten CG, Soeters PB, Russek MG, Beets-Tan RG, van Gemert WG, 2005) y un tercero realizado en el Departamento de Cirugía colorrectal del Hospital John Radcliffe de Oxford (Reino Unido) (Hyder SA, Travis SP, Jewell DP, McC Mortensen NJ, George BD, 2006).

Disponemos también de dos referencias favorables para el uso perioperatorio del infliximab al no haber mostrado un aumento de las complicaciones postoperatorias. Se trata de dos abstracts, de las conferencias de la Semana de Enfermedades Digestivas en el año 2002 y 2003, que presentan dos pequeños estudios de 35 y 40 pacientes con enfermedad de Crohn que recibieron infliximab en el perioperatorio. Ambos analizaron las tasas de complicaciones postoperatorias, incluyendo cicatrización y sepsis, sin encontrar aumento del riesgo con respecto a los controles (Brzezinski A, Armstrong L, Del Real GA, et al, 2002; Marchal L, D´Haens G, Van Assche G, et al, 2003).

En el año 2005 se publicó un estudio, realizado en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Bologna (Italia), que mostraba que la aplicación local de Infliximab adyacente al tracto fistuloso de la enfermedad de Crohn perianal era segura y ayudaba a la cicatrización de dichas fístulas (Poggioli G, Laureti S, Pierangeli F, Rizzello F, Ugolini F, Gionchetti P, Campieri M, 2005), y un año después, un estudio realizado en el Departamento de Dermatología de Kantonsppital (Suecia), mostraba mejoría de la cicatrización de heridas crónicas con la aplicación tópica del Infliximab (Streit M, Belezny Z, Braathen LR, 2006).

En el tratamiento de fístulas perianales y rectovaginales, estricturación del colon o perforación, o enfermedad de Crohn refractaria, la infusión de infliximab sumado a la intervención quirúrgica no compromete la cicatrización postoperatoria e incluso hay estudios que muestran una mejoría de la cicatrización de las fístulas cuando se administra infliximab de forma concomitante a la cirugía o de forma local adyacente al tracto fistuloso. Hay, sin embargo, un riesgo documentado de desarrollar citopenia e infección con el uso de infliximab o etanercept por lo que los clínicos deben sopesar el riesgo de la inmunosupresión y/o infección frente al beneficio del control de la enfermedad cuando se decida si interrumpir el tratamiento en el periodo perioperatorio. Las características específicas del paciente, como enfermedades concomitantes e historia de alteraciones hematológicas, deberían ser consideradas en el momento de tomar decisiones acerca del tratamiento.

3.3- ANTI TNF-ALFA Y CICATRIZACIÓN EN MODELOS ANIMALES

Los efectos del TNF-alfa en la cicatrización de heridas han sido evaluados en modelos animales obteniendo datos contradictorios. A continuación se describen los estudios publicados hasta el día de hoy en la literatura actual agrupándolos en función de La aplicación local del TNF-alfa o del antagonismo sistémico de esta citoquina.

A) APLICACIÓN LOCAL DE TNF

El primer estudio publicado sobre la influencia del TNF-alfa en la cicatrización de heridas fue en el año 1990 por un grupo de investigadores de la Universidad de Vermont. Estudiaron tanto la influencia de la aplicación de TNF local como sistémico, para lo que dispusieron de ratones control y ratones tratados con adriamicina. Les aplicaron TNF local en distintas dosis y vehiculizado en colágeno bovino o en suero salino, TNF sistémico, colágeno sólo, o suero salino fisiológico, y les realizaron una herida incisional para estudiar su fuerza de ruptura a los 11 días de la agresión. Constataron que la fuerza de ruptura aumentaba cuando se administraba TNF local en un rango determinado de dosis (de 5 a 50 ng), con un horario determinado (sincrónicamente a la realización de la herida), vehiculizado en colágeno (el vehiculizarlo en salino hacía que el TNF se degradase rápidamente) y mediante la administración local pero no sistémica. Concluyeron por todo esto que la concentración, horario de administración y tipo adecuado de vehículo del TNF modulaba la cicatrización de las heridas (Mooney DP, O'Reilly M, Gamelli RL. 1990).

Fu y colaboradores (1996) también encontraron beneficios en la cicatrización en la aplicación local del TNF-alfa en modelos de ratas usando heridas incisionales (Fu X, Tian H, Hsu S, Wang D, Sheng Z. 1996).

Otros investigadores han reportado resultados contrarios con la aplicación local de TNF-alfa a las heridas. Rapala y colaboradores (1991, 1997) demostraron un descenso en la producción de colágeno y de tejido de granulación en un modelo de rata utilizando implantes subcutáneos de esponja en sus dos estudios realizados en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Turku (Finlandia). En el primer estudio, publicado en 1991, dispusieron de 72 ratas

Sprague-Dawley a las que les realizaron una herida incisional en el dorso y les implantaron una esponja cilíndrica que serviría como matriz para el crecimiento de tejido de granulación. Dividieron las ratas en tres grupos de 24 animales y a los dos grupos tratados les inyectaron 50 o 200 ng de TNF-alfa humano recombinante, vehiculizado en salino, en la esponja, cada 3 días, mientras que al grupo control se le inyectó sólo el vehículo sin TNF-alfa. Sacrificaron las ratas en los días 7, 14 y 21 para estudiar el tejido de granulación en los implantes, observando un descenso del acúmulo de colágeno dosis-dependiente en los implantes de las ratas tratadas con TNF-alfa, concluyendo que el TNF-alfa inhibía la formación de tejido de granulación (Rapala K, Laato M, Niinikoski J, Kujari H, Soder O, Mauviel A, Pujol JP. 1991). En el segundo estudio, publicado en 1997, dispusieron de 48 ratas de la misma raza que dividieron en 6 grupos de 8 animales y les realizaron las heridas y los implantes de esponja de la misma manera que en el estudio anterior. Les inyectaron TNF-alfa en dosis de 200ng iniciales, o diaria durante 4 ó 7 días. Las ratas fueron sacrificadas a los 4 y 7 días del experimento para el estudio del tejido de granulación en el implante y no encontraron diferencias tras una única inyección de TNF-alfa pero, después de 4 y 7 días observaron un descenso en el acúmulo de colágeno en los implantes de las ratas tratadas con respecto a las de los controles, concluyendo que la aplicación local de TNF-alfa disminuía la síntesis de colágeno (Rapala K, Peltonen J, Heino J, Kujari H, Pujol JP, Niinikoski J, Laato M. 1997).

Resultados similares obtuvieron Salomon y colaboradores en su estudio realizado en 1991 en el Departamento de Cirugía del Instituto Nacional del Cancer de Bethesda (Maryland, EEUU), en el cual encontraron un descenso en la expresión genética del colágeno y una disminución de la fuerza de ruptura con un modelo de herida incisional en rata. Para ello dispusieron de dos grupos de ratas Fischer a las que se les realizaron una incisión en el dorso e implantaron esponjas en las que aplicaron TNF-alfa recombinante en distintas dosis a los animales tratados y salino a los controles. Sacrificaron los animales en los 7 y 14 días y midieron la fuerza de ruptura mediante un tensiómetro y la expresión de colágeno en muestras extraídas para el estudio

anatomopatológico. Obtuvieron que la fuerza de ruptura estaba disminuida en el día 7 en las ratas a las que se les había aplicado TNF-alfa recombinante en dosis de 50 ug, pero no en las tratadas con menor dosis ni en los controles. No encontraron diferencias a los 14 días del experimento. Concluyeron que la aplicación local de TNF-alfa recombinante disminuía el acúmulo de colágeno y que su efecto era dosis dependiente (Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, Norton JA. 1991).

B) ANTAGONISMO SISTÉMICO DE TNF

En 1998, un grupo de investigadores estudió los efectos de la proteína de unión al TNF (TNFbp), un antagonista específico del TNF en la cicatrización de la anastomosis intestinal, de las heridas incisionales, y de los implantes de esponja en el contexto de la sepsis abdominal crónica en ratas (los implantes de esponja sirven como espacio muerto para el crecimiento del tejido de granulación). Para ello dispusieron de tres grupos de ratas Sprague-Dawley a las que se les realizó una resección yeyunal y anastomosis en el día 1. En el día 3 se les indujeron una sepsis mediante la creación de un absceso abdominal y desde 4 horas antes de la sepsis se les inyectó, de forma subcutánea, suero salino fisiológico o TNFbp. En el día 7 se determinó la fuerza de ruptura de la anastomosis y de la herida incisional mediante un tensiómetro y se evaluó la histología de la herida y el depósito de colágeno mediante rojo sirio y cantidad de hidroxiprolina contenida en la esponja. Los resultados mostraron que la TNFbp no aumentaba la muerte en la sepsis, no disminuía la fuerza de ruptura de la anastomosis, ni modificaba la apariencia histológica de ésta. En cambio, la sepsis disminuía la fuerza de ruptura de la herida incisional que aumentaba con la administración de TNFbp, así como la organización y el depósito de colágeno, y el contenido de hidroxiprolina de la esponja. Por todo ello concluyeron que el proceso de reparación cutáneo se veía afectado por la sepsis y que el depósito de colágeno y su organización mejoraría con la administración de TNFbp, sugiriendo que el TNF es un importante mediador del descenso del depósito de colágeno en ratones en el estado séptico (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998). En este estudio se basan en que el TNF es un importante

mediador de la sepsis y que en este estado se ve afectada la cicatrización (no así en las ratas sanas), por lo que la administración de TNF mejoraría la cicatrización pero sin llegar a equipararla a la de las ratas sanas con diferencias estadísticamente significativas en la fuerza de ruptura de la herida cutánea de las ratas sanas con respecto a las de las ratas sépticas tratadas con TNFbp. La histología y el contenido de hidroxiprolina en cambio, fue similar en ambos grupos.

Cooney y colaboradores estudiaron también la influencia del antagonismo del TNF (aplicación de TNFbp) en la cicatrización de ratas con sepsis abdominal en un estudio realizado en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Pensilvania obteniendo datos similares. Para ello dispusieron de 4 grupos de ratas Sprague-Dawley (controles, controles con antagonismo del TNF, sepsis, sepsis con antagonismo del TNF) a las que se les inyectó TNFbp o salino de forma subcutánea diaria, se les implantaron esponjas subcutáneas y se les indujo una sepsis mediante la creación de un absceso intraabdominal. Los implantes fueron retirados en el día 5 para el estudio histológico y medición de la infiltración por tejido de granulación y calidad del mismo (tejido conectivo, celularidad y vascularidad). Obtuvieron que la mortalidad no estaba influida por la aplicación del TNFbp, que la penetración del tejido de granulación y calidad del mismo era menor en las ratas sépticas y que la administración del TNFbp disminuía de forma significativa los efectos de la sepsis en el tejido de granulación, concluyendo que el TNF contribuía al empeoramiento de la cicatrización observado en el modelo de sepsis abdominal (Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997).

En 2002, se publicó un estudio realizado en la Universidad de Kanazawa (Japón) en el que utilizaban ratones deficientes del receptor p55 del TNF, uno de los dos receptores comunes del TNF-alfa en ratones y humanos, para estudiar la influencia del TNF en la cicatrización de heridas cutáneas. Para ello, dispusieron de dos grupos de ratones, deficientes del receptor p55 del TNF (ratones knockout, KO) y ratones BALB/c controles (WT), que fueron sometidos a una herida incisional. Constataron, tras 6 días y mediante estudio macroscópico del área de la herida e histopatológico de la misma, una

cicatrización acelerada de la herida de los ratones KO con respecto a los WT demostrada por un aumento de la angiogénesis, aumento de la acumulación de colágeno, y reepitelización acelerada, y concluyeron que las señales mediadas por el receptor p55 del TNF tenían un papel promotor en la infiltración leucocitaria de la herida y afectaban negativamente a la cicatrización, probablemente por disminución de la angiogénesis y del acúmulo de colágeno y que la manipulación de este receptor podría ser un buen tratamiento para mejorar las heridas cutáneas. Las complicaciones perioperatorias no fueron estudiadas (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002).

El único artículo sobre la influencia de la antagonización del TNF-alfa en ratones con la administración de un antagonista de dicha citoquina usada en el tratamiento de las enfermedades reumatológicas en humanos fue publicado en Marzo del 2006. En él, los investigadores se plantearon estudiar la causa del empeoramiento de la cicatrización en la diabetes, y para ello dispusieron de dos grupos de ratones (diabéticos/no diabéticos) a los que les realizaron una herida y les inocularon *Porphyromonas gingivalis*. Los ratones recibieron tratamiento con etanercept intraperitoneal los tres días antes y los seis después del experimento y fueron sacrificados tras 21 horas (fase temprana de infección) y a los 8 días (fase de reparación de la herida) del experimento para realizar un estudio histopatológico de las heridas. Constataron que, a las 21 horas, la inhibición del TNF-alfa disminuía la apoptosis de fibroblastos en los dos grupos, mientras que durante el proceso de cicatrización la disminución era casi del 50% en los ratones diabéticos pero no en los controles. Además, el etanercept aumentó el número de fibroblastos, la formación de la nueva matriz en los ratones diabéticos. Con todo esto concluyen que la cicatrización de los ratones diabéticos es peor que la de los controles porque a la hora de cicatrizar, los fibroblastos se mueren por apoptosis y en esto parece estar implicado en TNF-alfa ya que al administrar un anti TNF-alfa como el etanercept disminuye la apoptosis de los fibroblastos y aumenta su densidad en la herida, aumentando la formación de matriz de tejido conjuntivo (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006). Todo esto ocurre en ratones diabéticos donde se supone que existe una sobreexpresión de TNF-alfa, pero no en ratones

controles donde el TNF es normal. El antagonismo del TNF-alfa haría que los ratones diabéticos se comportasen como ratones control a la hora de la cicatrización.

Los datos animales buscando el efecto de la aplicación del TNF-alfa local en la fuerza de ruptura de las heridas y el desarrollo de tejido de granulación son conflictivos; sin embargo los efectos de la inhibición sistémica del TNF-alfa en la cicatrización de heridas parece favorable, lo cual tiene más interés ya que los inhibidores del TNF-alfa se aplican de forma sistémica.

Existen pocos datos humanos en los que basarse para formular guías de práctica clínica para el manejo perioperatorio de los pacientes que están recibiendo tratamiento anti TNF-alfa. Los únicos estudios humanos disponibles son con el uso de infliximab en pacientes con Enfermedad de Crohn y el estudio prospectivo de pacientes tratados con anti TNF-alfa que fueron sometidos a cirugía reconstructiva de pie y tobillo (Bibbo C, Goldberg JW, 2004). No existen estudios que busquen las complicaciones postoperatorias en los pacientes que reciben adalimumab. El único artículo que emite una tabla de recomendaciones sobre el uso perioperatorio de estos fármacos recomienda continuar sin interrupción o suspender una semana antes y reiniciar dos semanas después el tratamiento con anti TNF-alfa (Rosandich PA, Kelley JT, III and Conn DL. 2004) mientras que la revisión publicada en 2005 sobre los efectos perioperatorios de los antiinflamatorios y la terapia inmunomoduladora en la cicatrización quirúrgica (Busti AJ, Hooper JS, Amaya CJ, Kazi S. 2005) recomienda extrapolar los resultados de los estudios animales a la práctica clínica considerando las comorbilidades del paciente, los factores de riesgo de las complicaciones postoperatorias y la farmacocinética y farmacodinamia de los modificadores de la respuesta biológica.

Medicación	Manejo
AAS	Interrumpir 7-10 días antes del procedimiento
AINEs no AAS (con excepción de inhibidores selectivos de la COX2 y salicilatos no acetilados)	Interrumpir por un período equivalente a 5 vidas medias
Inhibidores selectivos de la COX2 y salicilatos no acetilados	No necesita interrupción a no ser que haya insuficiencia renal
Glucocorticoides	Continuar siempre y suplementar (tabla 1)
Metotrexate	Continuar sin interrupción excepto que existan FR (ver texto)
Lefunomida	Interrumpir 2 semana antes del procedimiento y reanudar tras 3 días
Sulfasalazina/AZA	Interrumpir 1 día antes del procedimiento y reanudar 3 días después
Hidroxicloroquina	Continuar sin interrupción
Modificadores de respuesta biológica	
Infliximab y reanudar 1-2	Datos limitados. Se puede continuar sin interrupción o interrumpir 1 semana antes semanas después
Etanercept/anakinra semanas	No datos humanos. Interrumpir la semana del procedimiento y reanudar 1-2 después
Adalimumab/rituximab después	No datos. Discontinuar al menos 1 semana antes y reanudar 1 ó 2 semanas

Tabla 2. Manejo de la medicación durante el período perioperatorio
Basada en la publicada por Kelley y Conn (2002) con la recomendación de los modificadores de respuesta biológica realizada por Rosandich y cols (2004)
COX, ciclooxygenasa; NSAIDs, antiinflamatoios no esteroideos;

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la práctica clínica cada vez son más los pacientes que reciben tratamiento con terapia anti TNF-alfa. El primer fármaco utilizado fue el infliximab, que se empleó en dosis única en pacientes con enfermedad de Crohn con el objetivo de conseguir la remisión de su enfermedad. Pronto se vio que si se mantenía el tratamiento con infusiones seriadas, su eficacia para la curación de las úlceras de la mucosa intestinal y control de la enfermedad era mayor (Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, Olson A, Lichtenstein GR, Bao W, Pael K, Wolf DC, Safdi M, Colombel JF, Lashner B, Hanauer SB, 2006; Martínez-Montiel MP, Muñoz-Yagüe Mt, 2006; Nakamura K, Honda K, Mizutani T, Akiho H, Harada N, 2006; Geobes K, Rutgeerts P, Opdenakker G, Olson A, Patel K, Wagber CL, Marano CW, 2005).

La primera enfermedad reumática para la que se utilizó este tratamiento fue la artritis reumatoide. En un principio se empleó para pacientes en los que no era posible controlar la enfermedad con dos fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs) distintos, solos o en combinación, al menos uno de ellos metotrexate (Primer consenso sobre el uso de terapias biológicas de la Sociedad Española de Reumatología). Hoy en día, el infliximab está aprobado como tratamiento de inicio de la artritis reumatoide en pacientes que cumplen criterios de gravedad de la enfermedad y su uso se ha extendido a otras artritis, como la espondilitis anquilosante y artritis psoriásica, y enfermedades cutáneas y autoinmunes. Los otros dos fármacos aprobados inicialmente para el tratamiento de la artritis reumatoide, etanercept y adalimumab, van ampliando sus campos terapéuticos, no sólo en el contexto de la Reumatología sino en el de muchas otras especialidades.

Pacientes con amiloidosis logran controlar su enfermedad con estos tratamientos (Fernández-Nebro A, Ureña I, Irigoyen MV, García-Vicuña R, 2006; Bosca MM, Pérez-Baylach CM, Solis MA, Anton R, Mayordomo E, Pons S, Minués M, Benagues A, 2006), hidrosadenitis supuradas de difícil control (Cusack C, Buckley C, 2006; Trent JT, Kerdel FA, 2005), eritemas nodosos recurrentes (Faber WR, Jensema AJ, Goldschmidt WF, 2006; Rahier JF, Lion L, Dewit O, Lambert M, 2005), piodermas gangrenosas asociado o no a la enfermedad de Crohn (Trent JT, Kerdel FA, 2005), vasculitis cerebrales asociadas a la

enfermedad de Behçet (Fujikawa K, Aratake K, Kawakami A, Aramaki T, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Karachi M, Tamai M, Huang M, Nakamura H, Nishiura Y, Origuchi T, Ida H, Eguchi K, 2007; Licata G, Pinto A, Tuttolomondo A, Banco A, Ciccia F, Ferrante A, Triolo G, 2003)....

Hasta el momento actual no existe una guía de práctica clínica en la que apoyarnos a la hora de suspender o mantener este tratamiento durante el periodo perioperatorio. Sólo existen dos revisiones sobre el tema que recomiendan suspender el tratamiento o mantenerlo en función de las características y la situación clínica del paciente, valorando siempre los beneficios y los riesgos de nuestra actuación, asumiendo que la terapia anti TNF-alfa aumenta el riesgo de infecciones y que podría dificultar la cicatrización al disminuir la respuesta inflamatoria (Busti AJ, Hooper JS, Amaya CJ, Kazi S. 2005; Rosandich PA, Kelley JT, III and Conn DL. 2004).

Sólo existe un estudio publicado que investigue las posibles complicaciones postoperatorias de los pacientes sometidos a cirugía ortopédica (Bibbo C, Goldberg JW. 2004). El resto son aproximaciones de pacientes con Enfermedad de Crohn y estudios de experimentación animal que de una forma indirecta pueden servirnos para obtener conclusiones sobre el tema (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998; Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997; Mori R, Kondo T, Ohsima T, et al. 2002; Rongkum L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006). En ninguno de ellos se ha observado un aumento de las complicaciones postoperatorias, si bien el número de estudios es escaso para afirmarlo.

Una vez revisada la escasa bibliografía existente sobre los efectos del tratamiento anti TNF-alfa en la curación de las heridas encontramos muchas contradicciones (Topstad DR, Panaccione R, Heine JA, et al. 2003; Colombel JF, Loftus EV, Tremaine WJ, et al, 2004; Mooney DP, O'Reilly M, Gamelli RL. 1990; Fu X, Tian H, Hsu S, Wang D, Sheng Z. 1996; Rapala K, Laato M, Niinikoski J, Kujari H, Soder O, Mauviel A, Pujol JP. 1991; Rapala K, Peltonen J, Heino J, Kujari H, Pujol JP, Niinikoski J, Laato M. 1997; Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, Norton JA. 1991), lo que nos llevó a realizar

un estudio experimental para investigar si realmente existía mayor riesgo de complicaciones postoperatorias en el contexto de este tratamiento.

Si realizamos una revisión sobre el papel del TNF alfa en la cicatrización de las heridas veremos que tiene múltiples funciones a lo largo del proceso como el aumento de la expresión del gen del factor de crecimiento de queratinocitos en los fibroblastos necesario para que se sinteticen distintas sustancias que hagan que los queratinocitos migren a la zona herida, proliferen y se diferencien para dar lugar a la epitelización, el aumento de integrinas que servirán de andamio para la matriz provisional en la formación del tejido de granulación, o la maduración y remodelado del depósito de colágeno al estimular de forma indirecta la reabsorción de las primeras fibras de colágeno depositadas para dar lugar al depósito de fibras más gruesas paralelas a las líneas de estrés (George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Janis MD, Christopher E. Attinger MD 2006).

Nos planteamos realizar este estudio con el objetivo de ver si existía un aumento de las complicaciones postoperatorias en ratones en tratamiento con anti-TNF alfa.

Utilizamos ratones porque comparten los receptores para el TNF alfa con los humanos y etanercept por su cómoda forma de administración, subcutánea, conservando la posología empleada en los pacientes pero ajustada al peso del ratón (Pharmacokinetics and product metabolism in animals, etanercept).

HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

A pesar del uso cada vez más extendido de la terapia biológica en la AR, apenas existen estudios experimentales que hayan valorado las consecuencias que el bloqueo del TNF pueda tener sobre el proceso reparativo en la cicatrización de las heridas. De hecho, no existen estudios clínicos que respalden la actuación clínica que con más frecuencia se adopta en esta situación, consistente en la retirada temporal del tratamiento durante el periodo perioperatorio. Aspecto de especial interés en este grupo de enfermos sometidos con frecuencia a intervenciones quirúrgicas de muy diversa índole.

OBJETIVO GENERAL DEL ESTUDIO

Estudiar si el bloqueo farmacológico del TNF influye en la evolución de las heridas quirúrgicas en un modelo experimental en ratones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar si el tratamiento anti TNF-alfa aumenta o disminuye el tiempo de curación de la herida.
- 2) Investigar si el antagonismo del TNF alfa afecta al proceso de reepitelización de la herida.
- 3) Valorar si el tratamiento modula la cantidad, tipo de infiltrado inflamatorio y dispersión del mismo en la herida.
- 4) Examinar si este fármaco modula la cantidad de tejido de granulación formado.
- 5) Valorar su efecto sobre el grado de colagenización de la herida mediante análisis digital de imagen.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio experimental ha sido realizado en el Departamento de Cirugía y sus Especialidades de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada en colaboración con el Departamento de Anatomía Patológica de dicha Universidad.

1.- MATERIAL UTILIZADO

1.1- ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Utilizamos 80 ratones blancos machos de la raza SWISS-OF1 con un peso comprendido entre 35 y 40 gramos. Fueron estabulados en el animalario del Departamento de Cirugía y sus Especialidades de la Facultad de Medicina de Granada en jaulas individuales de 15x20x26 cm. Durante todo el experimento recibieron comida y bebida ad libitum (imágenes 1-3).

Para poder realizar el estudio se solicitó la idoneidad de procedimiento de experimentación animal, cumpliendo con la legislación vigente sobre principios éticos a respetar en investigación, a la Comisión de Ética en Investigación de la Universidad de Granada (Comité de Ética en Experimentación Animal).

El experimento animal se ha regido y dispuesto siguiendo las recomendaciones recogidas en las siguientes disposiciones legales:

- a) Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE relativa a la protección de los animales de laboratorio utilizados para experimentación animal y otros fines científicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, NºL 358/1-358/6 de 18 de Diciembre de 1986.
- b) Real Decreto 223/1988 de 14 de Marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE nº 67, pp: 8509-8512 de 18 de Marzo de 1988.
- c) Disposición general nº25805. Instrumento de ratificación del Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, hecho en Estrasburgo el 18 de Marzo de 1986. BOE 256 pp: 31349-31362, de 25 de Octubre de 1990. Esta ratificación entró en vigor en España el 1 de Enero de 1991.

1.2- ETANERCEPT (Enbrel®, Wyeth Europa Ltd, Reino Unido)

Etanercept es una proteína humana compuesta por el receptor p75 del factor de necrosis tumoral y la porción Fc de la IgG1 humana, producida por tecnología del ADN recombinante en un sistema de células de ovario de hamster chino (CHO). Es una proteína dimérica construida genéticamente por fusión del dominio extracelular soluble del receptor-2 del factor de necrosis tumoral humano (RTNF2/p75), unido al dominio Fc de la IgG1 humana. Este componente Fc contiene la región bisagra, las regiones CH2 y CH3, pero no la CH1 de la IgG1. Contiene 934 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons. La forma farmacéutica utilizada, disponible en el momento del experimento, fue en polvo y disolvente para solución inyectable. El polvo blanco se suministró en un vial de vidrio transparente con tapón de goma, cápsula de aluminio y tapa de plástico de color verde. El disolvente era un líquido incoloro y transparente que se suministró en una jeringa de vidrio precargada. Cada vial de etanercept fue reconstituido con 1 ml de agua para inyección antes de ser utilizado y administrado por inyección subcutánea (Enbrel®, Wyeth Europa Ltd, Reino Unido).

1.3- QUIRÓFANO Y MATERIAL DE MICROCIROUGÍA

Utilizamos el quirófano de experimentación animal del Departamento de Cirugía y sus Especialidades de la Facultad de Medicina de Granada que dispone, entre otros medios, de una mesa de quirófano para experimentación animal con microscopio quirúrgico acoplado a una cámara de video Sony SSC-C108P® (Sony Corporation, 2004). Como material de microcirugía utilizamos tijeras, pinzas, bisturios y portaguas.

2.- MÉTODO DE EXPERIMENTACIÓN

2.1- TRATAMIENTO CON ETANERCEPT (Enbrel®, Wyeth Europa Ltd, Reino Unido)

Dividimos los animales en dos grupos de 40 ratones cada uno. El grupo 1 recibió tratamiento con etanercept (Enbrel®, Wyeth Europa Ltd, Reino Unido) mediante inyección subcutánea de 2 mg semanales iniciándolo en el día -7 del experimento (imagen MM4), y el grupo 2, que actuó como control, no recibió ningún tipo de tratamiento.

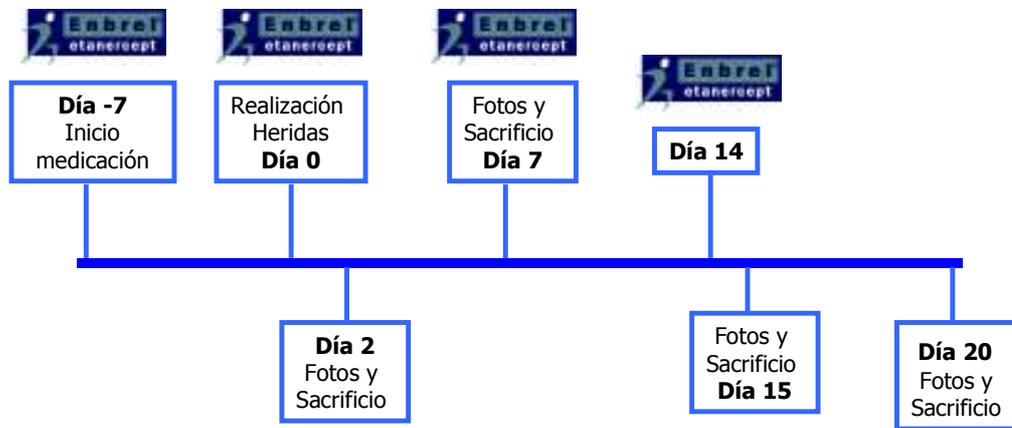
2.2- REALIZACIÓN DE HERIDAS Y TOMA DE MUESTRAS

En el día cero, todos los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con una dosis proporcionada a su peso de una mezcla de ketamina, diazepam y atropina en proporción 1ml, 0.8ml y 0.2ml respectivamente, basándonos en que un ratón de 25 gramos precisaría una dosis de 0,1 mililitro de dicha mezcla (Álvarez Gómez de Segura I, Tendillo Cortijo FJ. 2001). Una vez anestesiados, se les afeitó el dorso y se les realizó una herida de 5 mm² con bisturí/tijeras de microcirugía, retirando piel y tejido celular subcutáneo. A continuación fotografiamos las heridas de todos los ratones con una cámara digital Sony Cyber-Shot DSC-P120® (Sony Corporation, 2004) (imágenes MM5-12). Para realizar todas las fotos a una distancia constante utilizamos siempre el mismo zoom y encajamos la cámara en un soporte de madera realizado para el experimento.

El día dos del ensayo volvimos a anestesiarnos a todos los ratones de la misma manera y tomamos fotografías de las heridas de todos ellos. Después de esto, los primeros diez ratones de cada grupo fueron sacrificados mediante sobredosis de mezcla anestésica para tomar la muestra de la herida para posterior análisis histopatológico. Para ello, se retiró la herida rodeada de tejido sano disecando planos profundos hasta columna.

Los días siete, quince y veinte del ensayo, se anestesiaron de nuevo a los ratones restantes de cada grupo y se fotografiaron todas las heridas de la misma manera. Se sacrificaron otros diez ratones de cada grupo cada uno de estos días y se tomaron las muestras de las heridas de la forma indicada.

CRONOGRAMA



CRONOGRAMA:

Día -7: inició de medicación: una inyección subcutánea semanal de 2 miligramos de etanercept.

Día 0: realización de heridas.

Días 2, 7, 15 y 20: fotografiamos las heridas y sacrificamos 10 ratones de cada grupo.



Imagen MM1



Imagen MM2



Imagen MM3



Imagen MM4

Imágenes MM1-3: Animales estabulados en jaulas individuales con comida y bebida a demanda durante el experimento. Departamento de Cirugía y sus Especialidades. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

Imagen MM4: Administración de etanercept (Enbrel®, Wyeth Europa Ltd, Reino Unido) vía subcutánea en dosis de 2 mg semanales (Pharmacokinetics and product metabolism in animals, etanercept).



Imagen MM5



Imagen MM6



Imagen MM7

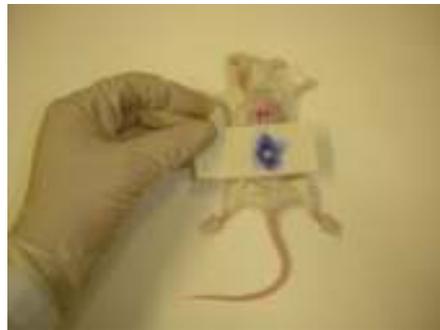


Imagen MM8



Imagen MM9



Imagen MM10



Imagen MM11



Imagen MM12

Imágenes MM5-12: realización de herida y fotografía de la misma. Se afeita el dorso del animal (imágenes MM5-6), se dibuja la herida con papel milimetrado en la zona sin pelo (imágenes MM7-9), se levanta piel y tejido celular subcutáneo (imágenes MM10-11) y se fotografía la herida desde soporte fabricado para el experimento (imágenes MM12).

3.- ANÁLISIS MACROSCÓPICO, MICROSCÓPICO Y DIGITAL

3.1- ANÁLISIS MACROSCÓPICO

3.1.1- PROCEDIMIENTO

A pesar de que las heridas se realizaron con una plantilla de papel milimetrado para que todas fuesen del mismo tamaño, se decidió medir de nuevo su área con el programa AutoCad2005® (Tronix SRL) una vez realizadas para comprobar que no existían diferencias estadísticamente significativas entre sus áreas iniciales.

Una vez obtenidas las fotos de las heridas de cada ratón en los días 0, 2, 7, 15 y 20 procedimos a su análisis con el programa AutoCAD®2005. Insertamos la foto deseada en el dibujo del programa y utilizando la herramienta polilínea rodeamos la herida de manera interactiva. Una vez enmarcada, seleccionamos herramienta área que nos calculó el área de la herida en m² (imágenes MM13).

Para calcular la reducción de superficie de la herida en cada uno de los días consideramos como 100% el área de la herida en el día cero y calculamos el porcentaje de reducción de cada una de ellas con respecto a su área en dicho día.

El análisis macroscópico es un análisis longitudinal, en el que vamos siguiendo el área de los ratones a lo largo del experimento hasta su día de sacrificio, por lo que el número de ratones irá disminuyendo en cada grupo a medida que se van sacrificando.



Imágenes MM13: Procesamiento de la imagen de la herida del ratón para calcular su área con el programa AutoCAD2005[®]. Rodeamos de manera interactiva el área de la herida con la herramienta polilínea y calculamos de forma automática el área de la zona marcada con la herramienta área.

3.1.2- DEFINICIÓN DE VARIABLES DE MACROSCOPIA

3.1.2.1- Área absoluta de la herida

Área expresada en metros cuadrados calculada con el programa AutoCad2005® como anteriormente se explicó, a partir de las imágenes digitales obtenidas con la cámara Sony Cyber-Shot DSC-P120® en el día indicado.

3.1.2.2- Porcentaje del área de la herida

Porcentaje de la herida en el día indicado con respecto al porcentaje de su área en el día cero.

3.1.2.3- Superficie de la herida reducida

Porcentaje de superficie reducido en la herida en cada uno de los días señalados con respecto al porcentaje de su área en el día cero.

3.2- ANÁLISIS MICROSCÓPICO

3.2.1- PROCEDIMIENTO

3.2.1.1- Método para cortes de microscopía óptica

El método descrito a continuación es común a todas las tinciones utilizadas en este trabajo.

Fijación

Como solución fijadora utilizamos formol tamponado con fosfato al 10% según la siguiente fórmula:

Formalina pura.....	100 ml
Fosfato sódico monobásico (NaH ₂ PO ₄).....	4 g
Fosfato sódico dibásico (Na ₂ HPO ₄).....	6,5 g
Agua destilada.....	900 ml

Utilizamos este tampón para evitar el choque osmótico que provoca la dilución de la formalina en agua destilada, y el depósito de pigmento formólico que

ocurre con pH inferior a 6 (el tampón fosfato estaba calibrado con un pH 7.0-7,2).

Sumergimos las muestras en dicha solución entre 72-96 horas y después de este tiempo fueron retiradas y lavadas para eliminar los restos de formol que pudieran quedar en ellas.

Tras tallar la muestra y seleccionar el área de interés se realizaron cortes perpendiculares incluyendo la zona de la herida y bordes sanos para su procesamiento posterior de manera automática en un procesador de tejidos (autotechnicom). En procesamiento se ha llevado a cabo con los siguientes pasos:

1º Deshidratación

El fin de este paso es eliminar el agua de la muestra para posteriormente poder sustituirla por una sustancia o aclarante (aclaramiento) que después será reemplazada por el material de inclusión. Para ello utilizamos alcohol etílico en concentraciones crecientes de 50-70-80-90-96 %, y finalmente alcohol absoluto (dos pases) durante una hora cada paso.

2º Aclaramiento

En este paso sustituimos el agente deshidratante, en este caso alcohol, por una sustancia miscible con el medio de inclusión que hemos utilizado, en este caso parafina. Como sustancia aclarante hemos utilizado Tolueno, haciendo tres pases de una hora cada uno de ellos.

3º Inclusión

Mediante este paso se impregnaron las muestras en parafina para llenar todos los intersticios del tejido y obtener una muestra de consistencia firme que permitiese realizar los cortes delgados sin distorsión. Para ello se utilizó una estación de inclusión que poseía un dispensador de parafina líquida, una placa caliente para la orientación de las piezas, y una placa fría para la solidificación del bloque. Previamente se orientó la muestra para facilitar el corte dentro del molde.

4º Corte de las muestras

El bloque de parafina obtenido se cortó en dos piezas realizando un corte transversal a la herida, para después realizar cortes de 4 µm de cada una de estas piezas partiendo del centro de la lesión. Para ello, se utilizó un microtomo de parafina que permitió obtener dichas láminas del bloque de inclusión, las cuales, previo paso por un baño de agua caliente (45-50º), se montaron en un portaobjetos para su posterior tinción.

3.2.1.2- Tinción de los cortes obtenidos

Después de haber realizado todas las manipulaciones descritas desparafinamos los bloques para colorearlos con las tinciones de Hematoxilina-Eosina, PAS, Tricrómico de Masson y Giemsa. A continuación se describen los procedimientos técnicos utilizados para realizar estas tinciones:

- Método de Hematoxilina-Eosina:

1) Soluciones:

1. Solución de hematoxilina de Harris.
2. Etanol ácido al 1 por 100.
3. Solución de azulamiento.
 - a) Agua corriente.
 - b) Solución acuosa de carbonato de litio al 1 por 100.
 - c) Solución acuosa de amoníaco al 2 por 100.
4. Solución acuosa de eosina.

2) Modo de operar:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Teñir con hematoxilina de Harris durante 2 minutos.
3. Lavar con agua corriente.
4. Diferenciar el alcohol ácido al 1 por 100 durante 5 a 30 segundos, controlando el microscopio.

5. Azular en agua corriente durante 5 minutos.
6. Colorear con eosina durante 2 minutos.
7. Lavar en agua corriente hasta obtener la intensidad deseada de coloración.
8. Deshidratar, aclarar, montar.

3) Resultados:

1. Núcleos: azul/negro
2. Eritrocitos: naranja a rosa
3. Restantes estructuras: rosado a rojo

Procedimiento técnico para la preparación de la solución de hematoxilina de Harris:

- Hematoxilina (cristalizada)..... 1 g
- Etanol absoluto..... 10 mL

Disolver calentando suavemente:

- Alumbre potásico o amónico..... 20 g
- Agua destilada..... 200 mL

Disolver en caliente. Añadir la solución de hematoxilina y llevar a ebullición. Cuando comienza a hervir se añade:

- Oxido rojo de mercurio..... 0.5 g

Dejar disolver el óxido removiendo lentamente hasta que la solución adquiera color púrpura. Sumergir inmediatamente en agua fría. Cuando la solución se haya enfriado, filtrar y añadir:

- Ácido acético glacial..... 10 mL

- Método de PAS:

1) Soluciones:

a) Ácido periódico al 0.5 por 100

b) Reactivo de Schiff: Puede adquirirse comercialmente o fabricarse según el siguiente procedimiento:

- Fucsina básica (C.I. 42510)..... 1 g
- Agua destilada..... 200 mL

Llevar hasta ebullición el agua destilada y añadir la fucsina. Disolver y enfriar a 50°C, filtrar y añadir:

- Metabisulfito sódico anhidro..... 1 g

Dejar en reposo 24 horas (la solución debe tomar un color rosa pálido) y filtrar a través de carbón activado, lo cual debe decolorarla.

c) Baño de ácido sulfuroso:

- Ácido clorhídrico 1 N..... 5 mL
- Metabisulfito sódico al 10 por 100..... 6 mL
- Agua destilada..... 100 mL

d) Hematoxilina de Harris.

2) Modo de operar:

1. desparafinar e hidratar
2. Ácido periódico al 0.5 por 100, 5 minutos.
3. Lavado en agua destilada.
4. Reactivo de Schiff, 15 a 30 minutos.
5. Aclarar en tres cambios de baño sulfuroso, 2 minutos en cada uno.
6. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.
7. Hematoxilina de Harris, 30 a 60 segundos.
8. Lavar en agua corriente durante 5 minutos.

9. Deshidratar, aclarar, montar.

3) Resultados:

1. Núcleos: azul.
2. Material PAS positivo: rojo oscuro a magenta (fucsina).

- Método de Tricrómico:

1) Soluciones:

a) Solución de Bouin

b) Solución tricrómica:

- Cromotropo 2R..... 0.6 g
- Verde luz (fase green FCF-C.I. 42053)..... 0.3 g
- Ácido acético glacial..... 1.0 mL
- Agua destilada..... 100 mL
- Ácido fosfotúngstico..... 0.8 g

c) Solución verde luz:

- Verde luz (C.I. 42053)..... 5.0 g
- Agua destilada..... 250 g
- Ácido acético..... 2 mL

d) Solución acuosa de ácido acético al 0.5 por 100

2) Modo de operar:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Realizar mordentaje en líquido de Bouin durante 1 hora a 56°C ó 24 horas a temperatura ambiente.
3. Lavado en agua destilada hasta que desaparezca el color amarillo.

4. Teñir en la solución tricrómica durante 15 minutos (previamente es posible contrastar núcleos con hematoxilina de Weigert durante 13 minutos seguida de un lavado prolongado en agua corriente).

5. Diferenciar en la solución de ácido acético al 0.5 por 100 durante 15 segundos.

6. Lavar en agua destilada.

7. Teñir con la solución de verde luz durante 20 ó 30 segundos.

8. Deshidratar, aclarar y montar.

3) Resultados:

1. Fibras musculares, fibrina y citoplasmas celulares: rojo.

2. Colágena, cartílago, mucina y membranas basales: verde.

3. Núcleos (sin contraste con hematoxilina): azul-negruzco.

- Método de Giemsa:

1) Soluciones:

1. Solución A:

- Ácido acético glacial..... 1.2 mL
- Agua destilada..... 100 mL

2. Solución B:

- Acetato sódico..... 2.7 g
- Agua destilada..... 100 mL

3. Tampón acetato a pH 4.0:

- Solución A..... 80 mL
- Solución B..... 20 mL

4. Solución de trabajo de Giemsa:

- Agua destilada..... 47.5 mL

- Solución tamponada..... 1.5 mL
- Solución comercial de Giemsa..... 2 mL
- Acetona..... 2.5 mL

2) Modo de operar:

1. Desparafinar e hidratar en agua destilada.
2. Si el tejido no se ha decalcificado, tratar con alcohol ácido entre 1 y 5 minutos. Lavar bien en agua destilada.
3. Teñir con la solución de trabajo de Giemsa 2 horas.
4. Diferenciar y deshidratar an acetona, aclarar acetona-xileno y xileno, montar.

3) Resultados:

1. Núcleos: azul-violáceo
2. Citoplasmas y tejido conjuntivo: tonos de rosa
3. Eritrocitos: salmón
4. Rickettsias: violeta
5. Gránulos de eosinófilos: rojo-anaranjado

3.2.1.3- Características del análisis microscópico

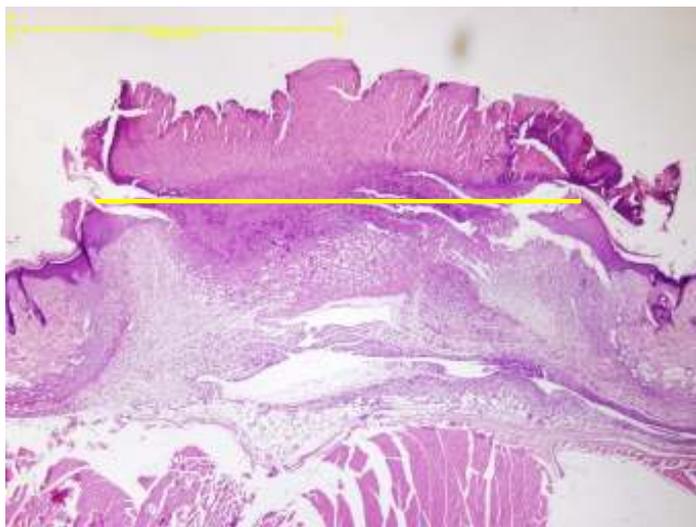
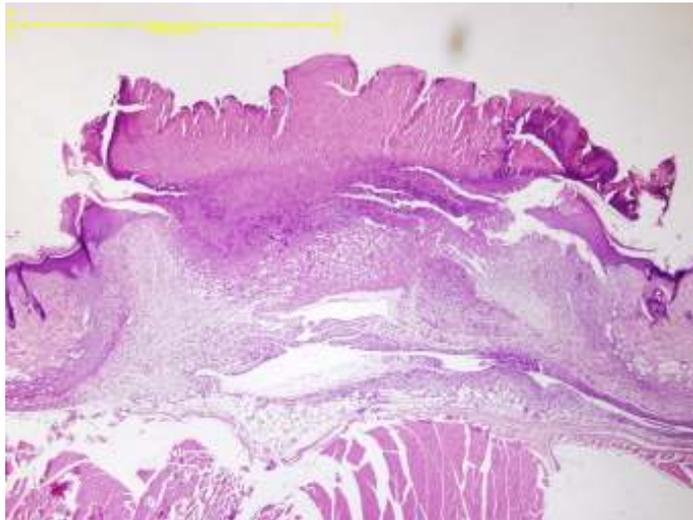
El análisis microscópico es un análisis transversal, por lo que los datos de los que disponemos son de cada ratón en su día de sacrificio. Por ello, el tamaño muestral tendrá un máximo de diez ratones en cada grupo en cada uno de los días señalados.

3.2.2 - DEFINICIÓN DE VARIABLES DE MICROSCOPIA

3.2.2.1 - Longitud de la herida

Para calcular la longitud de la herida obtuvimos una imagen digital de cada muestra objetivada al microscopio óptico con un aumento x2 con la tinción con hematoxilina-eosina con una cámara Olympus DP70 acoplada al microscopio óptico mediante el programa informático Olympus DP Manager presente en un ordenador pentium IV Dell acoplado a dicho equipo. Tratamos las imágenes obtenidas con el programa AutoCad2005[®], escalándolas según el aumento aplicado con el microscopio óptico (x2) para poder medir la distancia en milímetros de borde a borde de la herida. La máxima longitud medible en la imagen fue 4,10 mm (por cuestión de espacio al superar la longitud de la herida la de la imagen). Se decidió asignar una longitud de 5 mm a todas las heridas cuya longitud superara el máximo medible en la imagen (imágenes MM14).

Definimos la variable *longitud de la herida* como la distancia en milímetros de borde a borde de la herida en la imagen digital obtenida.



Imágenes MM14: Procesamiento de la imagen de la herida de un ratón en un corte teñido con hematoxilina-eosina y visualizado al microscopio óptico con aumento x2. Obtenemos una imagen digital escalada para ese aumento con la cámara digital acoplada al microscopio óptico que introducimos en el programa AutoCAD2005® para realizar una línea de labio a labio de la herida de manera interactiva y calcular, de forma automática, la longitud de la misma en milímetros.

3.2.2.2- Reepitelización de la herida

Definimos la variable *grado de reepitelización de la herida* como el grado de reepitelización en la muestra de la herida objetivada al microscopio óptico con aumento x20 en la tinción de hematoxilina-eosina, valorada de 0 a 2 de la siguiente forma: 0= no existe reepitelización; 1= reepitelización incompleta; 2= reepitelización completa. Para el estudio estadístico recodificamos la variable como sigue: 0= reepitelización incompleta/sin cambios ; 1: reepitelización completa.

3.2.2.3- Espesor del epitelio sano y de la herida

Para calcular el espesor del epitelio, tanto en el tejido sano como en la herida, obtuvimos una imagen digital de cada uno de éstos en la muestra objetivada al microscopio óptico con aumento x20 con la tinción de hematoxilina-eosina de la misma forma realizada para la variable *longitud de herida*, escalándolas también con el programa AutoCad2005[®] pero para un aumento x20. Realizamos, con este programa, cinco mediciones del espesor del epitelio sano y cinco mediciones del de la herida de cada ratón con la herramienta distancia, y calculamos su media aritmética (imágenes MM15).

Definimos las variables *espesor del epitelio sano* y *espesor del epitelio de la herida* como la distancia en micras desde la capa basal del epitelio sano, o de la herida, hasta su capa córnea medida como anteriormente se explicó.

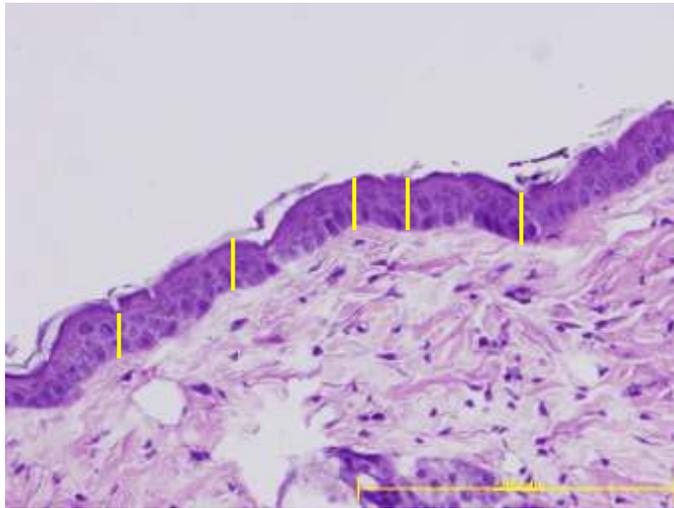
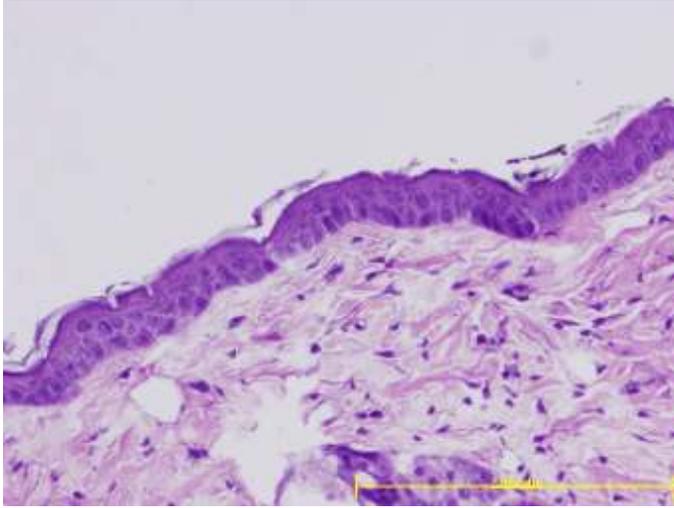


Imagen 28: epitelio sano (x20)

Imagen 29: epitelio herida (x20)

Imágenes MM15: Procesamiento de la imagen del epitelio, en este caso de la zona sana, de un ratón en un corte teñido con hematoxilina-eosina y visualizado al microscopio óptico con aumento x20. Obtenemos una imagen digital escalada para ese aumento con la cámara digital acoplada al microscopio óptico que introducimos en el programa AutoCAD2005[®] para realizar cinco líneas desde la capa basal del epitelio a su capa córnea de manera interactiva y calcular, de forma automática, la longitud de las mismas en micras. Utilizamos la media de las cinco longitudes como espesor del epitelio medido.

3.2.2.4- Tejido de granulaci3n

Definimos presencia de tejido de granulaci3n como la existencia de vasos y fibroblastos en el 1rea de la herida.

Definimos la variable *cantidad de tejido de granulaci3n* como la extensi3n del mismo presente en la muestra de la herida objetivada al microscopio 3ptico con un aumento 20x en la tinci3n de hematoxilina-eosina, valorada de 0 a 2 de la siguiente forma: 0= ausencia tejido de granulaci3n; 1=cantidad m3nima; 2=cantidad moderada. Para el estudio estad3stico recodificamos la variable como sigue: 0= ausencia/cantidad m3nima de tejido de granulaci3n; 1= cantidad moderada.

3.2.2.5- Infiltrado inflamatorio

Definimos la variable *cantidad de infiltrado inflamatorio* de manera semicuantitativa como la cantidad del mismo presente en la muestra objetivada al microscopio 3ptico con aumento 20x en la tinci3n de hematoxilina-eosina, valorada de valorada de 0 a 2 de la siguiente forma: 0=ausencia de infiltrado inflamatorio; 1= cantidad m3nima; 2=cantidad moderada. Para el estudio estad3stico recodificamos la variable como sigue: 0= infiltrado inflamatorio ausente/cantidad m3nima; 1= infiltrado inflamatorio en cantidad moderada

Definimos la variable *tipo de infiltrado inflamatorio* en funci3n del tipo de c3lulas presentes en la muestra histol3gica objetivada al microscopio 3ptico con aumento 20x en la tinci3n de hematoxilina-eosina, clasific1ndolo en agudo o cr3nico en funci3n de la existencia de predominio de polimorfonucleares para el primero o macr3fagos/c3lulas plasm1ticas/linfocitos para el segundo. Si predominaba el componente agudo le atribuimos el valor 1 y si predominaba el cr3nico el valor 2.

Definimos la variable *grado de afectaci3n muscular por el infiltrado inflamatorio* como la cantidad de infiltrado inflamatorio presente entre las fibras musculares existentes debajo de la herida en la muestra objetivada al microscopio 3ptico con aumento 20x en la tinci3n de hematoxilina-eosina, valorada de 0 a 2 de la

siguiente forma: 0= no existe infiltrado inflamatorio; 1= mínima infiltrado inflamatorio; 2= moderado infiltrado inflamatorio. Para el estudio estadístico recodificamos la variable como sigue: 0= ausencia de infiltrado inflamatorio entre las fibras musculares; 1= presencia de infiltrado inflamatorio entre las fibras musculares.

3.2.2.6- Cantidad de polimorfonucleares, macrófagos, vasos sanguíneos y fibroblastos en la herida

Definimos las variables *cantidad de polimorfonucleares, macrófagos, vasos sanguíneos y fibroblastos en la herida* de manera semicuantitativa como la cantidad de los mismos presente en la muestra objetivada al microscopio óptico con aumento 20x en la tinción de hematoxilina-eosina, valorada de valorada de 0 a 2 de la siguiente forma: 0= ausencia de los mismos; 1= cantidad mínima; 2= cantidad moderada. Para el estudio estadístico recodificamos las variables como sigue: 0= ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada.

3.3- ANÁLISIS DIGITAL DE IMAGEN

3.3.1- PROCEDIMIENTO

3.3.1.1.- Método para cortes de microscopía óptica

Utilizamos el mismo método explicado con anterioridad para la realización de los cortes para microscopía óptica siguiendo los pasos de fijación, deshidratación, aclaramiento, inclusión y corte de las muestras.

3.3.1.2.- Método de rojo sirio para tinción de fibras colágenas

A continuación se describe la tinción de rojo sirio realizada en nuestro laboratorio según el método descrito por Llewellyn (López Caballero, JJ; Peña, MC; De Federico, MJ. 1993).

1) Soluciones:

- Rojo Sirio F3BA (C.I. 35780) al 1 por 100..... 10 mL

- Solución acuosa saturada de ácido pícrico..... 90 mL

Mezclar, añadiendo a continuación cristales de ácido pícrico para saturar bien la solución colorante. A fin de asegurar la saturación, deberán permanecer algunos restos de ácido pícrico sin disolver. Dejar reposar la solución 48 horas antes de usarla. El envejecimiento excesivo de la solución se manifiesta por la pérdida de sus propiedades tintoriales. Una tinción de fondo color naranja pálido indica que la saturación con ácido pícrico es incompleta, por lo que se recomienda añadir más cristales del ácido y dejar reposar otras 48 horas.

2) Modo de operar:

1. Desparafinar e hidratar meticulosamente.
2. Lavar durante 10 minutos en agua corriente.
3. Teñir con la solución de rojo sirio durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Deshidratar rápidamente en alcohol absoluto, aclarar y montar.

3) Resultados:

1. Fibras del tejido conectivo (excepto elásticas): rojo intenso.
2. Otros elementos: amarillo.
3. Núcleos en caso de contraste opcional con H. de Weigert: azul-negrusco.

3.3.1.3.- Material y método para el análisis digital

El material y método que a continuación se especifica se refiere a la microscopia digital, donde se tratan los aspectos técnicos y metodológicos del análisis digital de imágenes microscópicas y de su aplicación específica al análisis del tejido de la herida.

A) Instrumentación para microscopia digital

La instrumentación de microscopia digital utilizada consta de un microscopio óptico, una cámara de video y un sistema informático.

A1) Microscopio óptico:

El microscopio utilizado para generar las imágenes de los preparados histológicos en examen ha sido un microscopio compuesto (Olympus BX51) con sistema de cristales de polarización adaptados (Olympus T2, Japón). Este microscopio posee un revólver con cinco objetivos de aumento, 2x, 4x, 10x, 40x y 100x respectivamente, un espacio para el posicionamiento de filtros ópticos y proporciona 35 w de potencia máxima de iluminación. La iluminación se realiza con luz normal blanco amarilla de aproximadamente 550 nm de longitud de onda y puede ser regulada manualmente variando la intensidad de emisión de luz a través de un reóstato graduado y/o utilizando un diafragma-iris graduado, para el control de la amplitud del cono de luz incidente, y/o un condensador graduado, para variar el enfoque del cono de luz en la preparación histológica y el contraste óptico de la imagen resultante. A este microscopio se acopló una cámara de vídeo para la digitalización de las imágenes, utilizando una lente intermedia y un adaptador Olympus MTV-3. La lente intermedia utilizada entre cámara y microscopio tenía un aumento de 1x.

A2) Cámara de vídeo:

Para la digitalización de las imágenes se utilizó una videocámara Sony CCD N50 B/N acoplada al microscopio. La resolución de intensidad luminosa y las dimensiones de la imagen digitalizada dependen de las características de la tarjeta digitalizadora utilizada para la captura, mientras su resolución espacial depende, además de la tarjeta digitalizadora, de la lente intermedia entre cámara y microscopio y del objetivo del microscopio utilizado durante la captura de imagen.

Las imágenes captadas en color fueron transformadas mediante el programa Adobe Photoshop (Adobe System Incorporated, California, USA) en escala de grises.

A3) Sistema informático:

El sistema informático para el control de captura y la digitalización de imagen, la elaboración y el análisis de las imágenes digitales, y el tratamiento de los datos consta de los siguientes elementos:

A3.1) Tarjeta de digitalización y elaboración de imagen:

La tarjeta de digitalización de imagen utilizada ha sido una MVP-AT (Matros Electronic Systems, Canadá) acoplada internamente a un ordenador personal. Esta tarjeta permite digitalizar imágenes en blanco y negro y en color hasta una resolución máxima de 512x512x32 bits que, para imágenes convencionales de 8 bits de resolución de intensidad luminosa (256 niveles de gris para cada banda de imagen), equivale a una resolución espacial máxima de 1024x1024 píxeles cuadrados para imágenes en blanco y negro y de 512x512 píxeles cuadrados para imágenes en color. Además, posee una memoria RAM interna de acceso veloz de 1 Mb y circuitos con microprocesadores especializados para la captura en tiempo real y la realización rápida de operaciones básicas de elaboración de imagen.

A3.2) Ordenador y monitores:

El ordenador utilizado ha sido un PC (Dell) con microprocesador Pentium IV 2.40 GHz (Intel), 256 Mb de memoria RAM, disco duro de 50 Gb, unidades de disquetera de 3½" de alta densidad (1.44 Mb de capacidad), ratón serial Genius, controlador de vídeo S-VGA de 1 Mb de memoria y "bus" local, monitor RGB de 17" CM-615 de alta resolución (Hitachi, Tokio, Japón) para la visualización de las imágenes. El sistema operativo y la interfaz gráfica utilizados han sido Microsoft Windows 2000 Professional (Microsoft Corporation).

B) Métodos de aplicación de análisis digital de imagen

B1) "Software" de base utilizado:

Para la realización de los programas de análisis digital de imagen se utilizó el "software" de desarrollo de programas de análisis de imagen Visilog 6.2 (Noesis S. A., Velizy, Francia) (Noesis, 1991a; Noesis, 1991c).

Este "software" funciona en entorno MS-DOS, con interfaz gráfico Windows 98 (Microsoft Corporation), y permite el análisis y diseño de algoritmos de elaboración de imagen a través de la utilización manual de funciones elementales de procesamiento de imagen y el ajuste de sus parámetros; proporciona librerías de funciones elementales de elaboración y análisis de imagen utilizables para la realización de programas automáticos; proporciona un entorno para el desarrollo de librerías y programas de análisis de imagen en lenguaje "C-like"; y, proporciona un lenguaje a objetos ("Resource Manager") que permite diseñar y realizar un interfaz gráfico de interacción con el usuario.

Estas características constituyen las propiedades más adecuadas para facilitar el estudio y diseño de algoritmos de análisis de imagen y su utilización en programas de aplicación específicos. Además, este sistema permite la de aplicaciones finales compiladas, ejecutables de forma completamente independiente y totalmente compatibles.

B2) Aplicación del análisis de imagen:

El programa de análisis de imagen utilizado ha sido diseñado en el Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Granada y publicado por Masseroli y colaboradores (Masseroli M, y cols. 1995).

Los programas de análisis digital de imagen diseñados han sido englobados en la aplicación Fibrosis HR® (Masseroli M, y cols. 1995). Ésta está constituida desde el punto de vista informático por dos partes distintas: interfaz con el usuario y algoritmos de elaboración. La primera permite la interacción con el usuario en los pasos de la aplicación que lo requieran: captura de imagen, definición de ficheros de entrada ("input") y salida ("output"), pasos interactivos eventualmente necesarios de elaboración y confirmación de operaciones

automáticas. Además, posibilita una clara presentación de las imágenes generadas durante la elaboración y de los resultados gráficos y numéricos finales del análisis de la imagen digitalizada. La interfaz con el usuario se realiza mediante los elementos típicos del entorno Windows: ventanas, menú y botones de interacción que al ser activados a través del ratón o de teclas de acceso rápido determinan el comienzo de las rutinas a ellos asociadas. La programación de esta parte se realiza mediante un lenguaje a objetos ("Resource Manager") proporcionado por Visilog 6.2 (Noesis, 1991B). En este lenguaje, cada elemento de interacción es un objeto separado y está definido por el nombre, el tipo (ventana, botón, menú, etc.) y una serie de parámetros que definen las propiedades, localización y dimensiones del objeto en la pantalla.

El procedimiento de análisis de imagen consta de tres fases: captura y preelaboración de imagen; depuración del proceso de captura y normalización de imagen; análisis estadístico de la depuración de captura y control de captura.

- Captura y preelaboración de imagen:

En primer lugar se realiza el ajuste del sistema, que fija las condiciones de captación y de medida de las imágenes consideradas. Antes de realizar la medición, la lámpara del microscopio fue ajustada para obtener una iluminación homogénea (Köhler) y una intensidad de luz óptima. Se usó un filtro verde IF 550 y una magnificación de 40x. El tamaño de la imagen a capturar fue de 680x512.

Para generar las imágenes a analizar ha sido diseñada una aplicación que permite los pasos básicos de captura de una imagen de vídeo y realiza una preelaboración de la misma, depurándola de las influencias inherentes al sistema de captura y de iluminación, y normalizando sus características.

Inicialmente, el programa permite ver en tiempo real sobre la pantalla la imagen en vivo proporcionada por la cámara de vídeo, ajustar los parámetros de captura y de iluminación viendo en directo, como ensayo previo a la captura

y digitalización de las imágenes, las variaciones que estos aportan a las características de la imagen y a continuación digitalizar la imagen en memoria. Sucesivamente, utilizando una imagen de fondo previamente digitalizada con las mismas condiciones de iluminación, se realiza una preelaboración de imagen que permite depurar y normalizar la imagen captada. Mediante una ventana interactiva se adquirieron 5 imágenes independientes y al azar por muestra de herida y de tejido sano. Esta información se transforma en imagen digital (255 niveles de gris) y se almacena en el disco duro del ordenador con la extensión “.tif”.

- Depuración del proceso de captura y normalización de imagen:

A fin de eliminar la eventual falta de uniformidad de iluminación presente en la imagen digital y normalizar los niveles de gris de la misma en relación al grado de tinción de la muestra, la imagen de tejido digitalizada se comparó píxel a píxel con una imagen de fondo correspondiente, entendiendo por imagen de fondo una captada previamente en las mismas condiciones de iluminación, pero en una zona sin tejido del mismo portaobjeto. En una imagen de fondo de este tipo el valor medio de los niveles de gris depende de la intensidad de la tinción e iluminación de la muestra, mientras la distribución espacial de niveles de gris refleja la distribución de iluminación durante la captura.

Además de la corrección de las distorsiones de iluminación de captura y la normalización del nivel medio de iluminación de la muestra, las imágenes microscópicas captadas han sido normalizadas en el rango de sus niveles de gris, expandiendo linealmente su histograma hasta que esto ocupara todo el rango de niveles disponibles (0-255). Esta normalización ha sido realizada sin considerar, para la determinación de los extremos del histograma inicial a expandir, un número fijo de píxeles de la imagen con los niveles de gris más bajo.

- Análisis estadístico de la depuración de captura y control de captura:

La depuración de captura ha sido evaluada analizando estadísticamente la distribución de los niveles de gris de la imagen depurada. Los parámetros

considerados han sido la superficie, perímetro, disposición u orientación, número de elementos de la imagen.

Para facilitar la determinación del nivel óptimo de iluminación de captura en relación con la intensidad de tinción de la muestra y la sucesiva umbralización automática de la imagen digitalizada, se ha implementado una función de "control de captura". Esta función, además de la captura, depuración y normalización de la imagen, realizadas como antes se ha descrito, visualiza en pantalla, sobrepuesta a la imagen normalizada, el resultado de la umbralización automática que se realiza durante el proceso de evaluación de la imagen digitalizada. De esta forma resulta más fácil verificar si el nivel de iluminación de captura es adecuado para el aislamiento automático de las áreas de fibrosis a evaluar, o si es necesario cambiarlo para intentar obtener un resultado mejor. Además, la función permite realizar una umbralización manual de la imagen para prever si una variación de iluminación de la muestra en examen pueda portar alguna mejora en la identificación de las áreas de fibrosis en la imagen.

B3) Procesamiento y análisis de imagen:

Para procesar y analizar las imágenes captadas y preelaboradas como se ha descrito anteriormente, hemos desarrollado una serie de algoritmos que pueden ser agrupados según la clasificación clásica del análisis de imagen en diferentes apartados:

B3.1) Umbralización:

Las operaciones de captura, depuración y preelaboración de imagen antes descritas establecen un mecanismo de estandarización que permite obtener imágenes con condiciones homogéneas, independientemente de las condiciones en las que las imágenes fueron captadas. La homogeneidad de condiciones de las imágenes a analizar permite aplicar métodos automáticos de umbralización para el aislamiento de los elementos de interés presentes en la imagen, que en nuestro caso son representados por las áreas de tejido fuertemente teñidas por la tinción del rojo sirio.

Además, se ha realizado un algoritmo interactivo de umbralización manual basado en la utilización del ratón para la definición del umbral más adecuado para cada imagen. Este algoritmo, que ha sido utilizado durante la validación de la umbralización automática de las imágenes de fibrosis tendinosa, permite al usuario seleccionar el nivel de umbralización visualizando en la pantalla del ordenador el resultado de umbralización que corresponde al nivel seleccionado.

Todos los algoritmos realizados proporcionan como resultado una imagen binaria que representa la máscara de los elementos presentes en la imagen aislados por la umbralización.

B3.2) Identificación y clasificación:

Para la identificación y clasificación de los objetos de interés presentes en la imagen, se han desarrollados algoritmos que evalúan morfológicamente los elementos de la imagen, aislados por la umbralización, que tienen características densitométricas en el rango de las de los objetos a evaluar y los clasifican en relación con su forma y tamaño. Los algoritmos que se han implementado operan todos sobre la imagen binaria resultado de la umbralización previamente realizada.

B3.3) Análisis:

Para el análisis de las imágenes se ha realizado un algoritmo que, utilizando una oportuna tabla de colores para hacerlas resaltar en la pantalla del ordenador, visualiza las áreas anteriormente extraídas e identificadas, las mide automáticamente e importa a ficheros Excel los datos generados. Las medidas automáticas, generalmente obtenida en píxeles, son automáticamente convertidas en valores métricos, utilizando los factores de calibración de medidas contenidos en una tabla de escalas de medida generada *una tantum* durante el proceso inicial de calibración del sistema de análisis.

Para la transformación en unidades métricas de las medidas en unidades arbitrarias, píxeles, proporcionadas por el sistema de análisis digital de imagen, ha sido realizado un algoritmo que, a través de la captura con videocámara y posterior medición de imágenes de un portaobjetos milimetrado de dimensiones métricas conocidas colocado en el microscopio, permite la determinación de

factores de calibración de medidas. Los factores de calibración dependen del aumento utilizado para la captura de la imagen. Por lo tanto, es necesario determinar un factor de calibración de medida para cada objetivo utilizado en la cuantificación de imagen.

C) Cuantificación por análisis de imagen de la fibrosis de la herida

La metodología de cuantificación consta de cuatro partes distintas:

C1) Captura y digitalización de imagen:

Las imágenes son captadas en blanco y negro con dimensión de 680x512 píxeles cuadrados por la videocámara Sony CCD N50 B/N acoplada al microscopio. La digitalización se realiza con una resolución de intensidad luminosa de 8 bites (256 niveles de gris). La utilización del objetivo de 40X, y del conjunto lente intermedia de 1x y adaptador Olympus MTV-3, proporciona un campo de imagen de 348160 μm^2 con una resolución óptica de 0,67 $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$.

La captura de imagen se realiza empleando un filtro óptico verde IF 550 y con exceso de luz para que durante la elaboración de la imagen se puedan eliminar más fácilmente las áreas de las células que tienen semejantes niveles de gris que los proporcionados por el rojo sirio para el tejido fibrótico que se quiere evaluar.

Para una correcta cuantificación de las imágenes digitalizadas es importante que las condiciones de iluminación de las muestras permanezcan constantes a lo largo de toda la captura de imágenes de cada muestra y posiblemente, dependiendo de la homogeneidad de la tinción realizada, de todas las muestras de una misma experiencia.

La depuración y normalización de las imágenes tras su captura con exceso de luz proporcionan constancia de características y adecuada calidad de las mismas, que hace posible la aplicación sucesiva de un algoritmo automático de umbralización.

C2) Procesamiento de la imagen digital:

Las imágenes previamente digitalizadas son elaboradas para extraer las áreas a analizar. Los pasos fundamentales del procesamiento realizado pueden resumirse en: segmentación de las áreas de interés e identificación de las áreas a evaluar y su clasificación.

La segmentación de las áreas de imagen teñidas de manera intensa por el rojo sirio es realizada por un algoritmo automático de umbralización.

C3) Análisis de la imagen procesada:

En esta parte se cuantifican los elementos de la imagen aislados y clasificados en el epígrafe anterior. Se mide automáticamente el área de fibrosis de la herida eventualmente presente en la imagen. Para cada imagen medida, los valores obtenidos en μm^2 son mostrados en pantalla y almacenados dentro de ficheros ASCII de datos. Estos ficheros se denominan con un nombre precodificado que se refiere a la muestra analizada y que permite una fácil clasificación y utilización de los datos.

C4) Elaboración y evaluación de los datos:

Además de los valores absolutos en μm^2 , el programa determina también los siguientes valores porcentuales de superficie o área de fibrosis; perímetro de fibrosis; disposición u orientación de la misma; número euler.

Todos los valores determinados se almacenan en ficheros de datos organizados por líneas y columnas para cada muestra analizada, de forma que cada línea se refiere a una imagen, o campo, de la muestra analizada y contiene todos los datos obtenidos relativos a esta imagen.

La misma organización es mantenida en un segundo fichero creado para cada muestra analizada y que contiene para cada imagen de la muestra los valores de umbralización utilizados en la elaboración de la imagen para la segmentación de las áreas de fibrosis.

El tipo ASCII y la organización de los datos dentro de los ficheros permiten una fácil e inmediata exportación de los mismos a la mayoría de los programas estadísticos para una siguiente evaluación.

Además, para cada muestra y por lo tanto para cada ratón o herida analizada, el programa genera automáticamente un fichero de informe general que contiene las medias aritméticas de los valores medidos, relativas sea a la totalidad de los campos evaluados en la muestra, sea a los campos cicatriciales.

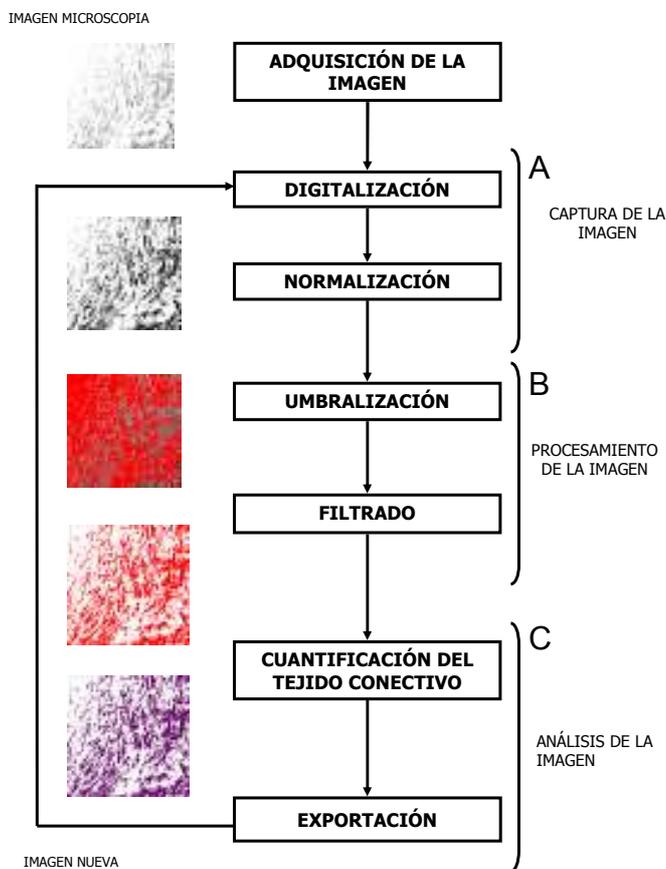


IMAGEN: MÉTODO DE ANÁLISIS DIGITAL: pasos del proceso de análisis digital de imágenes microscópicas aplicado al análisis del tejido de la herida.

3.3.2- DEFINICIÓN DE VARIABLES DE ANÁLISIS DIGITAL DE IMAGEN

3.3.2.1- Área de colagenización de la herida

Área media de colagenización de la zona de la herida obtenida con el análisis digital de imagen como anteriormente se explica.

3.3.2.2- Área de colagenización del tejido sano

Área media de colagenización de la zona del tejido sano obtenida con el análisis digital de imagen como anteriormente se explica.

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se hizo análisis descriptivo mediante frecuencias absolutas y porcentajes para variables cualitativas, como por ejemplo grado de colagenización en el borde de la herida. Para las variables cuantitativas se emplearon medias y desviación típica. Para la representación gráfica de las variables cualitativas se realizaron diagramas de barras simples o agrupados, y para las cuantitativas análisis de histogramas y valoración visual de curva normal, así como box-plott. En análisis bivalente se empleó el test de χ^2 mediante corrección de Yates, o bien test exacto de Fischer para tabla de 2x2, obteniéndose en este caso las correspondientes odds ratios con su intervalo de confianza. Para el análisis comparativo y la asociación entre variables cuantitativas y cualitativas se emplearon los test de U de Mann Whitney o Kruskal Wallis, dependiendo de la categorización de la variable cualitativa. Cuando fue posible ajuste de la normalidad, comprobándose mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff, se utilizaron tests paramétricos (t-Student y análisis de la varianza). Para el análisis de asociación bivalente entre cuantitativas continuas se aplicó matriz de los coeficientes de correlación de Spearman, detallándose aquellos que fueran estadísticamente significativas y no redundantes en cuanto a información de la variable. Finalmente se construyó el modelo predictivo

multivariante mediante regresión lineal múltiple empleando el método de introducción forzada y posterior depuración mediante paso a paso. Para ello, en las variables cualitativas predictoras, se consideró la primera categoría como de referencia. Para todo ello se empleó el paquete estadístico SPSS-12 para Windows trabajando con un nivel de confianza de 0,05.

RESULTADOS

1.- PÉRDIDA DE ANIMALES A LO LARGO DEL EXPERIMENTO

De los 80 ratones incluidos en el estudio, cuatro fallecieron antes de su día de sacrificio por causas desconocidas. Dos de los ratones pertenecían al grupo de tratamiento y los otros dos al grupo control. De los tratados, uno murió el día uno del ensayo (ratón nº 61) y el otro el día ocho (ratón nº 39), mientras que los controles fallecidos lo hicieron en los días cuatro (ratón nº 20) y seis (ratón nº 46) respectivamente. No se produjeron muertes durante el acto perioperatorio.

2.- ESTUDIO BIVARIANTE

2.1- ANÁLISIS MACROSCÓPICO

2.1.1- EVOLUCIÓN DEL ÁREA DE LA HERIDA A LO LARGO DEL EXPERIMENTO

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el área media absoluta de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día cero (t-Student; $p=0,479$) (tabla 1).

Tabla 1. Comparación del área media absoluta de la herida de los ratones tratados y no tratados en el día cero (t-Student; $p=0,479$)

Variable	Tratamiento	Número de casos	Media (m ²)	Desviación típica	Significación estadística
Área absoluta DÍA 0	no tratados	40	,005400	,0013009	$p=0,479$
	tratados	40	,005575	,0008539	

Las siguientes imágenes muestran la evolución macroscópica de la herida de uno de los ratones en cada uno de los días señalados del experimento.



Día cero



Día dos



Día siete



Día quince



Día veinte

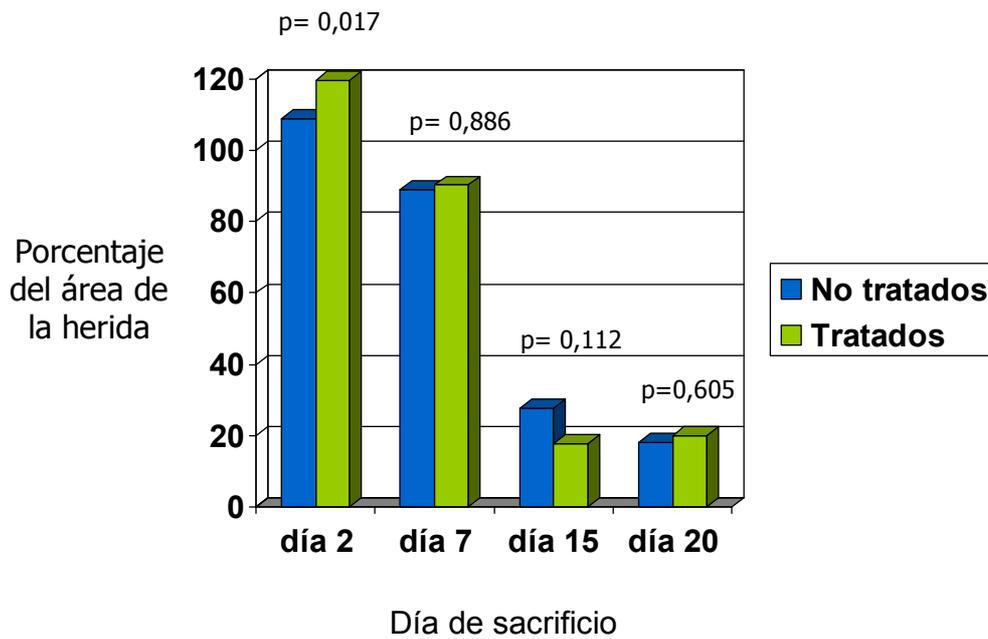
Imágenes R1.- Fotos realizadas a la herida del ratón 16 en los días cero, dos, siete, quince y veinte del experimento para el posterior análisis macroscópico. Todas las fotos están realizadas a la misma distancia y con el mismo zoom para poder calcular el área de la herida con el programa AutoCAD2005® y compararlas después.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje medio del área de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día dos (t-Student; $p=0,017$), con un mayor porcentaje del área para los ratones tratados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los días (tabla 2; gráfica 1; imágenes R2).

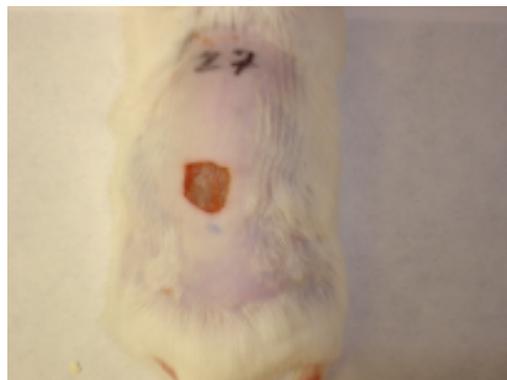
Tabla 2. Comparación del porcentaje medio del área de la herida de los ratones tratados y no tratados a lo largo del experimento (t-Student)

Variable	Tratamiento	Número de casos	Media	Desviación típica	Significación estadística
Porcentaje del área de la herida DÍA 0	no tratados	40	100,00	,000	
	tratados	40	100,00	,000	
Porcentaje del área de la herida DÍA 2	no tratados	40	108,924	16,719	$p=0,017$
	tratados	39	119,661	22,042	
Porcentaje del área de la herida DÍA 7	no tratados	28	88,915	28,449	$p=0,886$
	tratados	30	90,214	38,784	
Porcentaje del área de la herida DÍA 15	no tratados	19	27,769	24,932	$p=0,112$
	tratados	19	17,718	9,060	
Porcentaje del área de la herida DÍA 20	no tratados	9	18,127	6,875	$p=0,605$
	tratados	9	19,896	7,350	

Gráfica 1.- Comparación del porcentaje del área de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en los días señalados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas sólo en el día dos (t-Student; $p=0,017$)



Área herida ratón control día dos



Área herida ratón tratado día dos

Imágenes R2.- Fotos digitales que muestran el área de la herida de un ratón tratado y uno no tratado en el día dos.

2.1.2- SUPERFICIE DE LA HERIDA REDUCIDA A LO LARGO DEL EXPERIMENTO

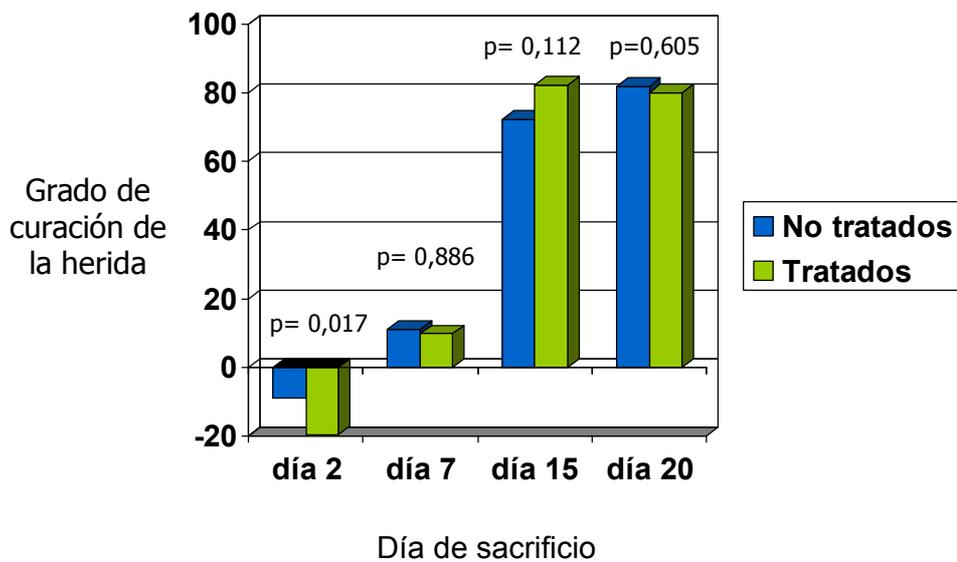
La evolución de la herida también la podemos medir como área de superficie reducida a lo largo de los días. Así, si consideramos que en el día cero todas las heridas tiene un porcentaje del área del 100% y teniendo los datos de los porcentajes de las áreas de las heridas en el resto de los días, podemos calcular la diferencia del porcentaje del área de las heridas en cada uno de los días señalados y obtener el grado de curación de la herida expresado como porcentaje. Tendremos un valor negativo en caso de que el tamaño de la herida haya aumentado, o positivo en el caso de que la herida haya disminuido.

Se encontraron diferencias significativas en la comparación de la superficie de la herida reducida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día dos (t-Student; $p=0,017$), observándose una menor reducción de la herida en los ratones tratados con respecto a los no tratados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los días aunque a los quince días la diferencia es casi significativa para igualarse la superficie al final del experimento sin presentar diferencias entre ambos grupos (tabla 3; gráfica 2).

Tabla 3. Comparación de la superficie de la herida reducida con respecto al día cero en los ratones tratados y no tratados a lo largo del experimento (t-Student)

Variable	Tratamiento	Número de casos	Media (%)	Desviación típica	Significación estadística
Superficie de la herida reducida en el DÍA 2	no tratados	40	-8,906	16,734	p=0,017
	tratados	39	-19,661	22,042	
Superficie de la herida reducida en el DÍA 7	no tratados	28	11,084	28,449	p=0,886
	tratados	30	9,786	38,786	
Superficie de la herida reducida en el DÍA 15	no tratados	19	72,230	24,932	p=0,112
	tratados	19	82,281	9,060	
Superficie de la herida reducida en el DÍA 20	no tratados	9	81,872	6,875	p=0,605
	tratados	9	80,103	7,350	

Gráfica 2.- Comparación del grado de curación de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en los días señalados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas solamente en el día dos (t-Student; $p=0,017$).



2.2- ANÁLISIS MICROSCÓPICO

2.2.1.- LONGITUD DE LA HERIDA

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la longitud media de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día siete (U Mann-Whitney; $p=0,007$), con una mayor longitud media de la herida en los ratones tratados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los días aunque en el día 20 del experimento las diferencias tienden a la significación estadística (tabla 4; gráfica 3; imágenes R3).

Tabla 4. Comparación de la longitud media de la herida en los ratones tratados y no tratados en su día de sacrificio (U Mann-Whitney)

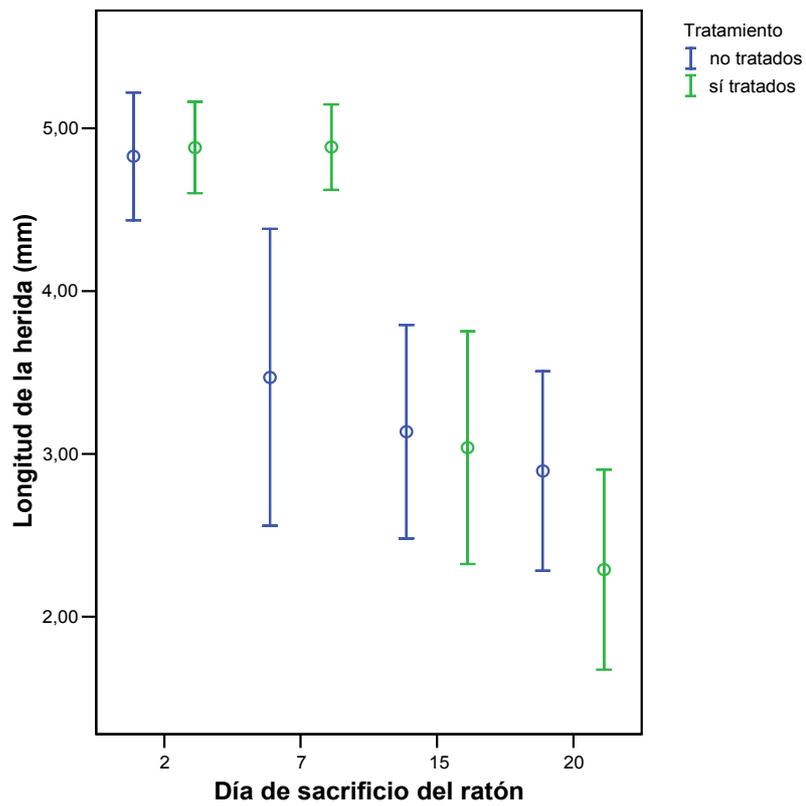
Variable	Tratamiento	Número de casos	Media (mm)	Desviación típica	Significación estadística
Longitud de la herida DÍA 2	no tratados	10	4,827	,547	$p=0,809$
	tratados	8	4,881	,335	

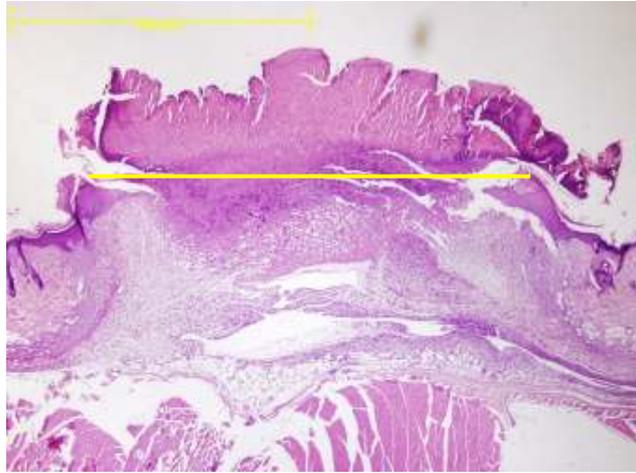
Longitud de la herida DÍA 7	no tratados	9	3,469	1,186	$p=0,007$
	tratados	10	4,883	,367	

Longitud de la herida DÍA 15	no tratados	10	3,135	,917	$p=0,820$
	tratados	9	3,037	,929	

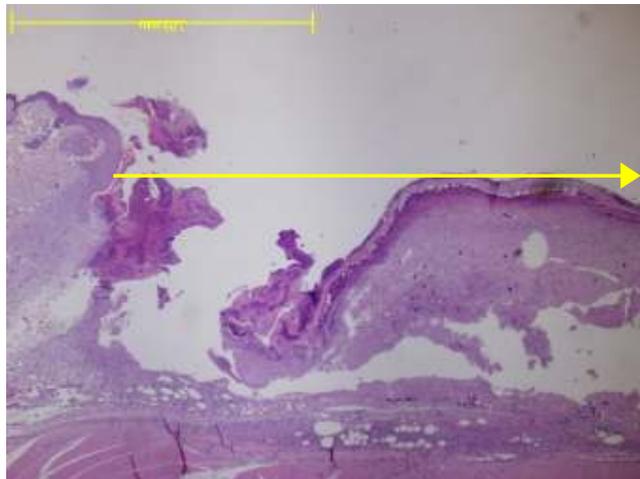
Longitud de la herida DÍA 20	no tratados	8	2,894	,732	$p=0,119$
	tratados	7	2,288	,665	

Gráfica 3.- Comparación de la longitud media de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en los días señalados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el día siete (U Mann Whitney; $p=0,007$)





Longitud herida día 7 ratón control (x2)



Longitud herida día 7 ratón tratado (x2)

Imágenes R3.- Imágenes digitales obtenidas de cortes de las heridas de un ratón del grupo control y otro del grupo tratado en el día siete, teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x2. En ellas se muestra la distancia entre los labios de la herida (línea amarilla pintada sobre la herida). En la foto del ratón tratado sólo se ve uno de los bordes de la herida ya que por su tamaño no cabía en la foto. Como se explicó en material y métodos, a las heridas que superaban el tamaño de la foto se las consideró como de 5mm de longitud. La foto está escalada en su parte superior para poder medir la longitud de la herida de labio a labio de la misma con el programa AutoCAD2005[®] y calcular la distancia en milímetros.

2.2.2- GRADO DE REEPITELIZACIÓN DE LA HERIDA

Las siguientes imágenes muestran los distintos grados de reepitelización observados en el experimento. Todas ellas son cortes de heridas de los ratones en su día de sacrificio teñidas con hematoxilina-eosina y objetivadas al microscopio óptico con aumento x4 y x10. Para el estudio estadístico recodificamos la variable como: 0= reepitelización incompleta/sin cambios; 1: reepitelización completa.

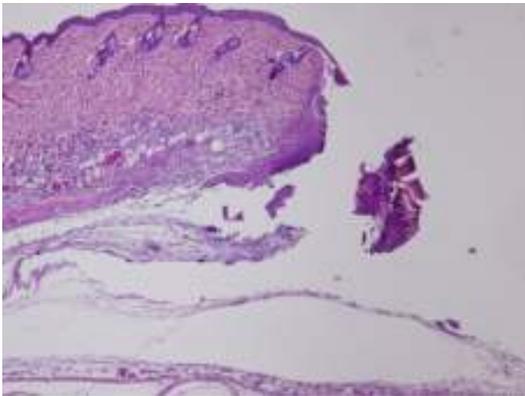


Imagen R4.1: Reepitelización grado 0 (x4)

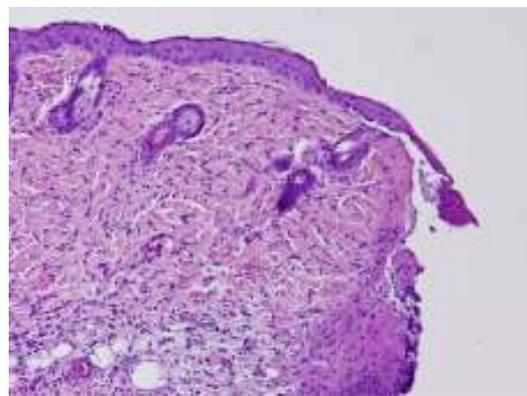


Imagen R4.2: Reepitelización grado 0 (x10)

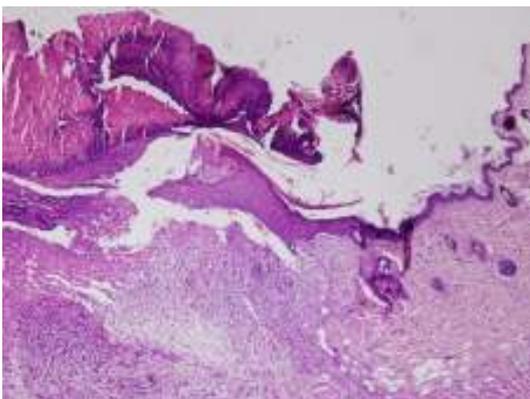


Imagen R4.3: Reepitelización grado 1 (x4)

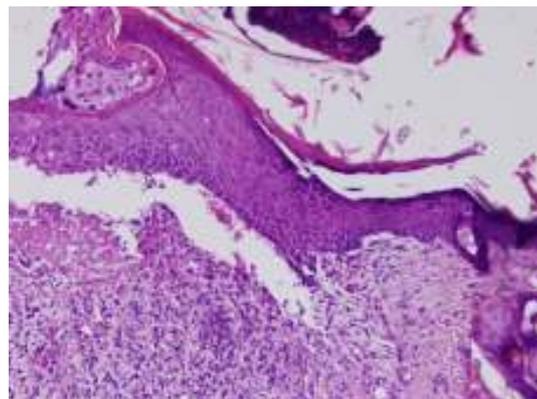


Imagen R4.4: Reepitelización grado 1 (x10)

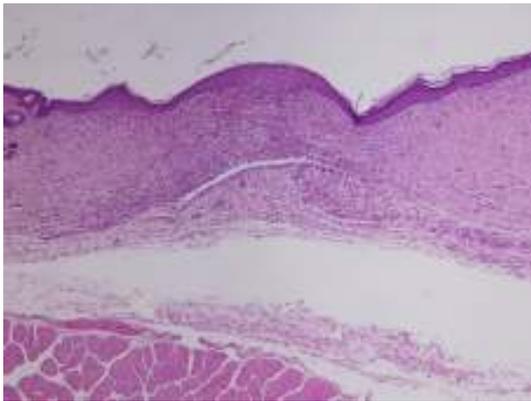


Imagen R4.5: Reepitelización grado 2 (x4)

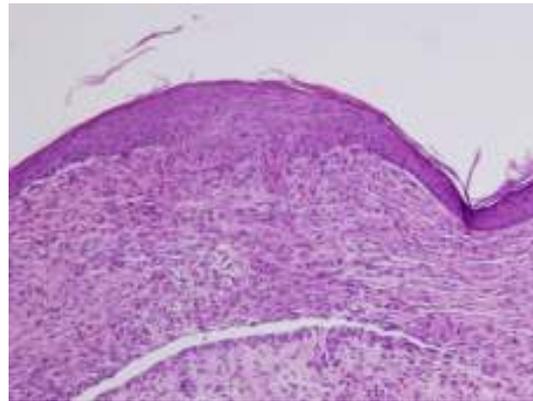


Imagen R4.6: Reepitelización grado 2 (x10)

Imágenes R4.- cortes de las heridas teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x4 y x10 para comprobar la existencia o no de reepitelización y el grado de la misma en caso de existir. Imágenes R4.1/R4.2: Reepitelización grado 0= ausencia de reepitelización; Imágenes R4.3/R4.4: Reepitelización grado 1= reepitelización incompleta; Imágenes R4.5/R4.6: Reepitelización grado 3= reepitelización completa.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación del grado de reepitelización de la herida en los ratones tratados con respecto a los no tratados en ninguno de los días señalados (tabla 5).

Tabla 5. Grado de reepitelización de la herida en función del tratamiento en el día de sacrificio del ratón (5.1: Ratones sacrificados en el día 2; 5.2: Ratones sacrificados en el día 7; 5.3: Ratones sacrificados en el día 15; 5.4: Ratones sacrificados en el día 20)

5.1: Ratones sacrificados en el día 2; (Test exacto de Fischer; $p=0,474$)

DÍA2			Grado de reepitelización		Total
			Reepitelización incompleta/sin cambios	Reepitelización completa	
tratamiento	no tratados	Número casos	10	0	10
		% de los NO tratados	100,0%	,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	8	2	10
		% de los tratados	80,0%	20,0%	100,0%
Total		Número de casos	18	2	20
		%	90,0%	10,0%	100,0%

5.2: Ratones sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p=1$)

DÍA7			Grado de reepitelización		Total
			Reepitelización incompleta/sin cambios	Reepitelización completa	
tratamiento	no tratados	Número casos	9	1	10
		% de los NO tratados	90,0%	10,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	10	0	10
		% de los tratados	100,0%	,0%	100,0%
Total		Número de casos	19	1	20
		%	95,0%	5,0%	100,0%

5.3: Ratones sacrificados en el día 15; (Test exacto de Fischer; $p=1$)

DÍA15			Grado de reepitelización		Total
			Reepitelización incompleta/sin cambios	Reepitelización completa	
tratamiento	no tratados	Número casos	1	9	10
		% de los NO tratados	10,0%	90,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	1	9	10
		% de los tratados	10,0%	90,0%	100,0%
Total		Número de casos	2	18	20
		%	10,0%	90,0%	100,0%

5.4: Ratones sacrificados en el día 20

DÍA20			Grado de reepitelización	Total
			Reepitelización completa	
tratamiento	no tratados	Número casos	10	10
		% de los NO tratados	100,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	10	10
		% de los tratados	100,0%	100,0%
Total		Número de casos	20	20
		%	100,0%	100,0%

Nota: No se puede realizar comparación porque en este día la variable grado de reepitelización es una constante.

2.2.3- ESPESOR DEL EPITELIO SANO

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el espesor medio del epitelio sano de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día dos (U Mann-Whitney; $p=0.038$), con un mayor espesor medio del epitelio sano en los ratones tratados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones en el resto de los días (tabla 6; gráfica 4; imágenes R5).

Tabla 6. Comparación del espesor medio del epitelio del tejido sano en los ratones tratados y no tratados en su día de sacrificio (U Mann-Whitney)

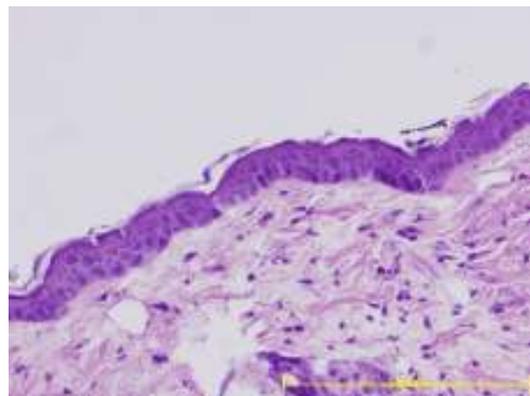
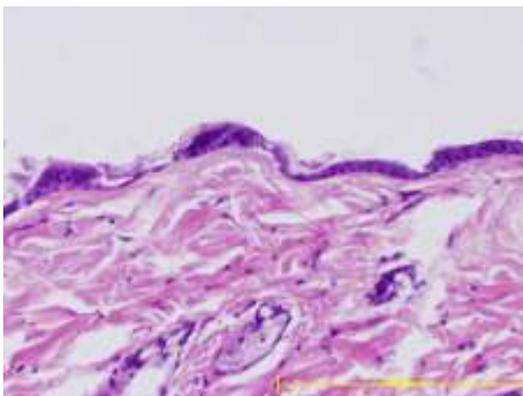
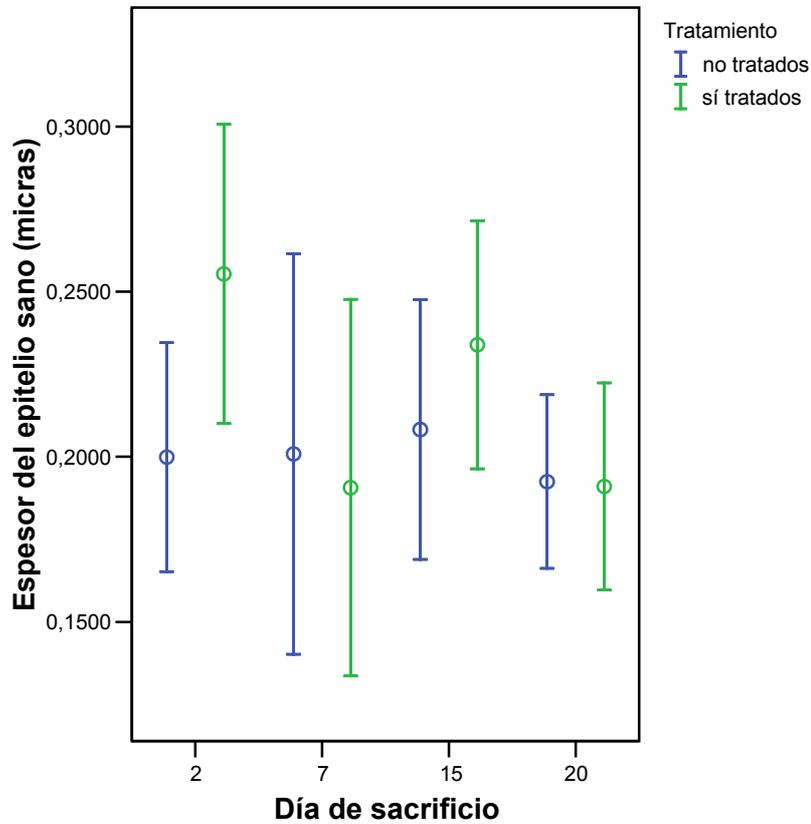
Variable	Tratamiento	Número de casos	Media (μm)	Desviación típica	Significaión estadística
Espesor epitelio sano DÍA 2	no tratados	10	,199	,048	p=0,038
	tratados	9	,255	,058	

Espesor epitelio sano DÍA7	no tratados	9	,200	,078	p=0,783
	tratados	10	,190	,079	

Espesor epitelio sano DÍA15	no tratados	10	,208	,055	p=0,300
	tratados	10	,233	,052	

Espesor epitelio sano DÍA20	no tratados	9	,192	,034	p=0,936
	tratados	9	,191	,040	

Gráfica 4.- Comparación del espesor del epitelio sano de los ratones tratados con respecto a los no tratados en los días señalados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el día dos (U Mann-Whitney; $p=0,038$) con un mayor espesor medio del epitelio sano en los ratones tratados



Espesor epitelio sano día 2 ratón control (x20) Espesor epitelio sano día 2 ratón tratado (x20)

Imágenes R5.- cortes de las muestras de un ratón control y en uno tratado en el día dos, teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x20 para medir el espesor del epitelio sano. En la parte inferior la foto está escalada para poder medir el espesor del epitelio desde la capa basal a la capa córnea con el programa AutoCAD2005® y calcular la distancia en micras.

2.2.4- ESPESOR DEL EPITELIO DE LA HERIDA

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el espesor medio del epitelio de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día siete (U Mann-Whitney; $p=0,029$), con un espesor mayor en los ratones tratados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los días (tabla 7; gráfica 5; imágenes R6).

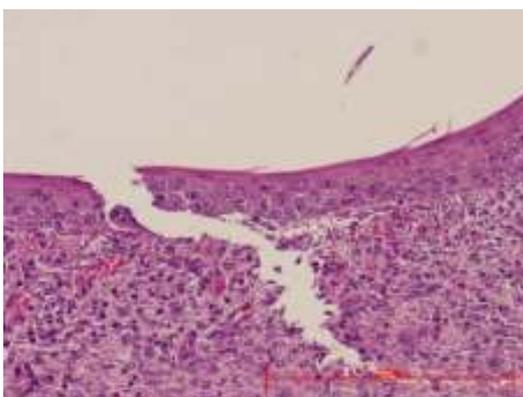
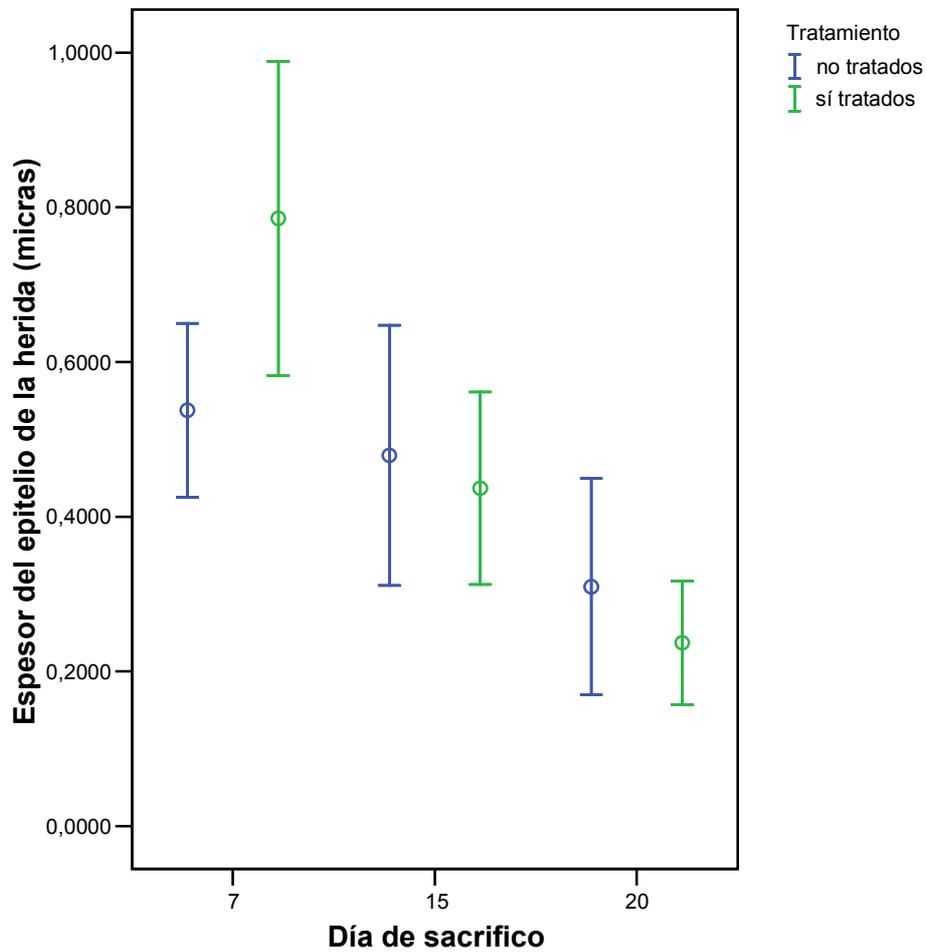
Tabla 7. Comparación del espesor medio del epitelio de la herida en los ratones tratados y no tratados en su día de sacrificio (U Mann-Whitney)

Variable	Tratamiento	Número de casos	Media (μm)	Desviación típica	Significación estadística
Espesor epitelio de la herida DÍA 7	no tratados	9	,537	,146	p=0,029
	tratados	10	,785	,283	

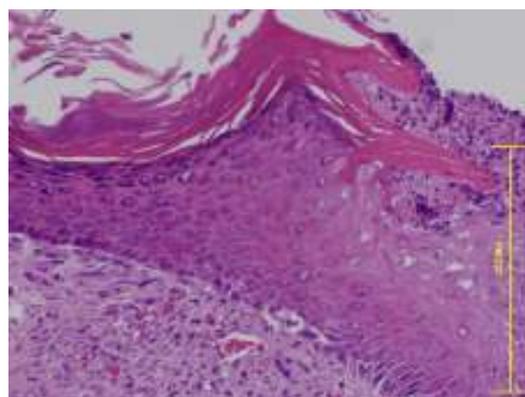
Espesor epitelio de la herida DÍA 15	no tratados	10	,479	,235	p=0,656
	tratados	9	,436	,161	

Espesor epitelio de la herida DÍA 20	no tratados	8	,309	,167	p=0,324
	tratados	7	,237	,086	

Gráfica 5.- Comparación del espesor del epitelio de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en los días señalados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el día siete (U Mann-Whitney; $p=0,029$) con un espesor mayor en los ratones tratados



Espesor epitelio herida día 7 ratón control



Espesor epitelio herida día 7 ratón tratado

Imágenes R6.- cortes de las heridas de un ratón control y uno tratado en el día siete teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x20 para medir el espesor del epitelio de la herida. En la parte inferior la foto está escalada para poder medir el espesor del epitelio desde la capa basal a la capa córnea con el programa AutoCAD2005® y calcular la distancia en micras.

2.2.5- CANTIDAD DE INFILTRADO INFLAMATORIO PRESENTE EN LA HERIDA

Las siguientes imágenes muestran los grados de la variable cantidad de infiltrado inflamatorio observados en el experimento. Todas ellas son cortes de las heridas de los ratones obtenidos en su día de sacrificio teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x10 y x40. Para el estudio estadístico recodificamos la variable como sigue: 0= ausencia de infiltrado inflamatorio/cantidad mínima; 1= infiltrado inflamatorio en cantidad moderada.

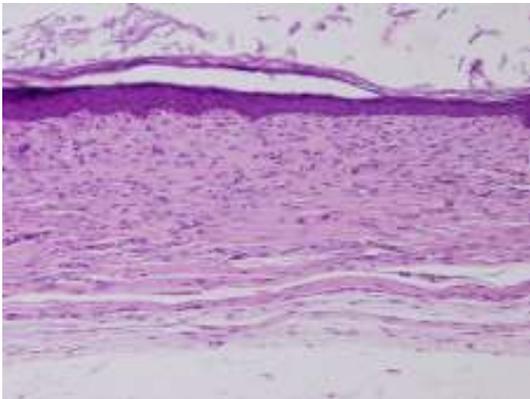


Imagen R7.1: Cantidad infiltrado inflamatorio=0 (x20)

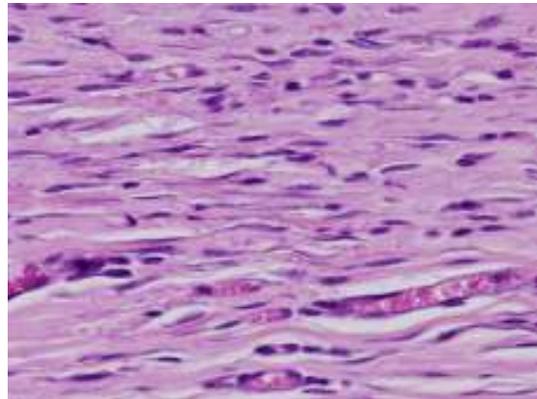


Imagen R7.2: Cantidad infiltrado inflamatorio=0 (x40)

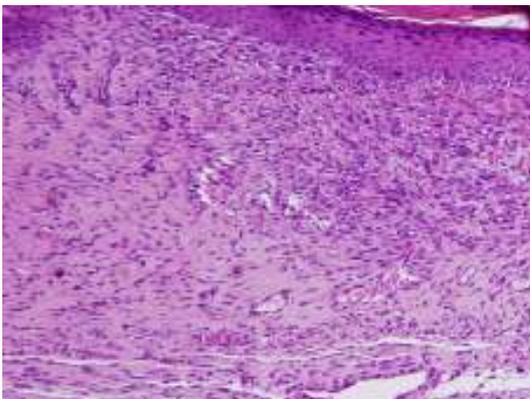


Imagen R7.3: Cantidad infiltrado inflamatorio=1 (x20)

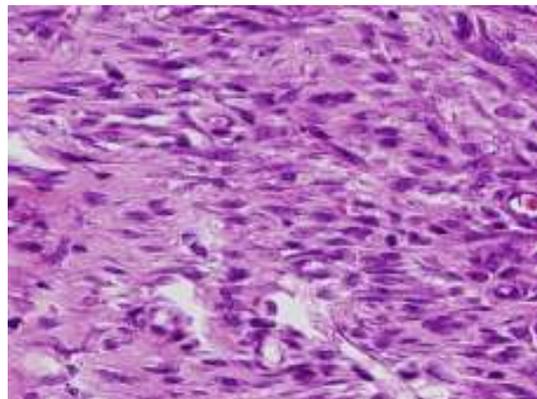


Imagen R7.4: Cantidad infiltrado inflamatorio=1 (x40)

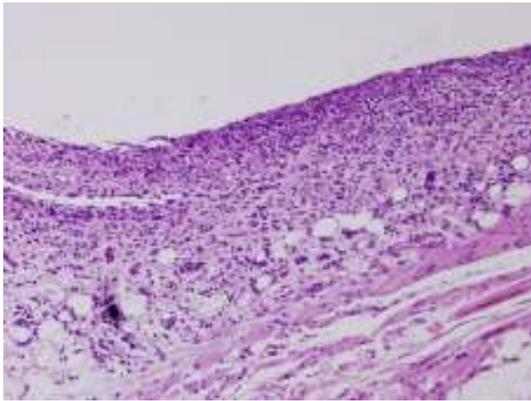


Imagen R7.3: Cantidad infiltrado inflamatorio=1 (x20)

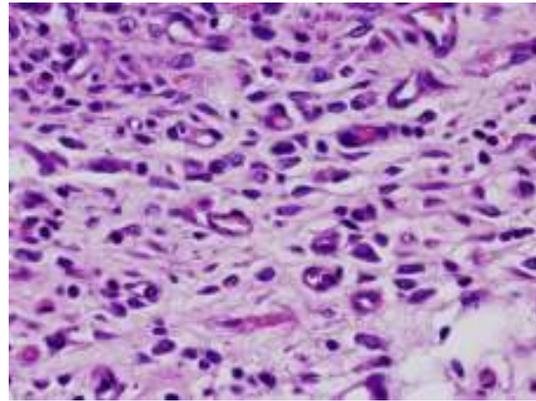


Imagen R7.4: Cantidad infiltrado inflamatorio=1 (x40)

Imágenes R7.- cortes de las heridas teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x10 y x40 para comprobar la existencia o no de infiltrado inflamatorio y la cuantía de este en caso de existir. Imágenes R7.1/R7.2: Cantidad de infiltrado inflamatorio=0; Imágenes R7.3/R7.4: Cantidad de infiltrado inflamatorio=1; Imágenes R7.5/R7.6: Cantidad de infiltrado inflamatorio=2.

Se encontró una tendencia a la significación estadística (Test exacto de Fischer; $p=0,087$) en la comparación de dicha variable en función del tratamiento en el día dos, siendo mayor en los ratones tratados. Como se puede apreciar en la tabla de la odds ratio (día dos), los ratones tratados tienen, como mínimo, 1.41 veces más infiltrado inflamatorio que los no tratados, y, como máximo, 5.02 veces mayor cantidad, con un promedio de 2.6 veces más cantidad de infiltrado inflamatorio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los días (tabla 8; gráfica 6; imágenes R8).

Tabla 8. Cantidad de infiltrado inflamatorio de la herida en función del tratamiento en el día de sacrificio del ratón (8.1: Ratonés sacrificados en el día 2; 8.2: Ratonés sacrificados en el día 7; 8.3: Ratonés sacrificados en el día 15; 8.4: Ratonés sacrificados en el día 20)

8.1: Ratonés sacrificados en el día 2; (Test exacto de Fischer; $p=0,087$)

DÍA 2			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Infiltrado Inflamatorio	Ausencia/cantidad mínima	Número casos	4	0	4
		%	100,0%	,0%	100,0%
	Moderado	Número casos	6	10	16
		%	37,5%	62,5%	100,0%
Total		Número casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

Odds ratio (día dos)

	Valor	Intervalo de confianza 95%	
		Límite Inferior	Límite Superior
Tratamiento	2,667	1,417	5,020
N de casos	20		

8.2: Ratonés sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p=1$)

DÍA 7			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Infiltrado Inflamatorio	Ausencia/cantidad mínima	Número casos	1	1	2
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	Moderado	Número casos	9	9	18
		%	50,0%	50,0%	100,0%
Total		Número casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

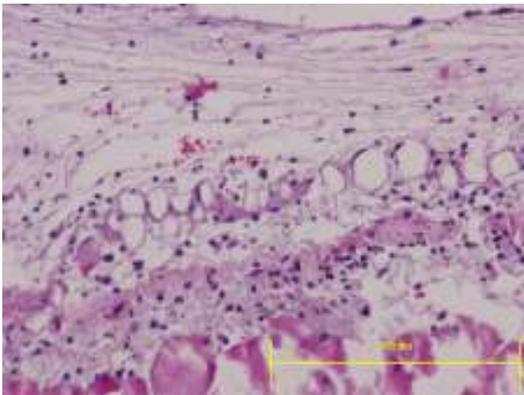
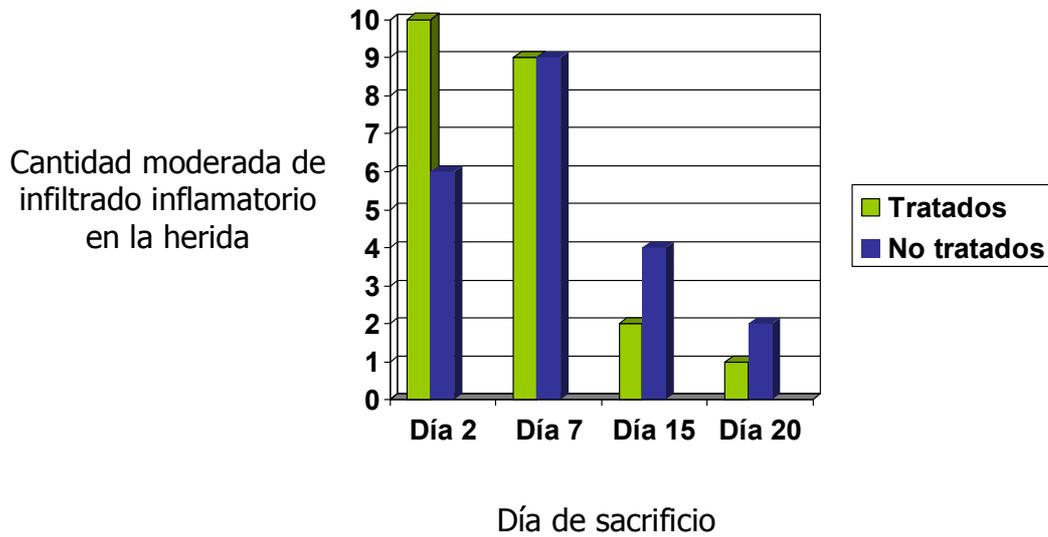
8.3: Ratones sacrificados en el día 15; (Test exacto de Fischer; $p=0,628$)

DÍA 15			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Infiltrado Inflamatorio	Ausencia/cantidad mínima	Número casos	6	8	14
		%	42,9%	57,1%	100,0%
	Moderado	Número casos	4	2	6
		%	66,7%	33,3%	100,0%
Total		Número casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

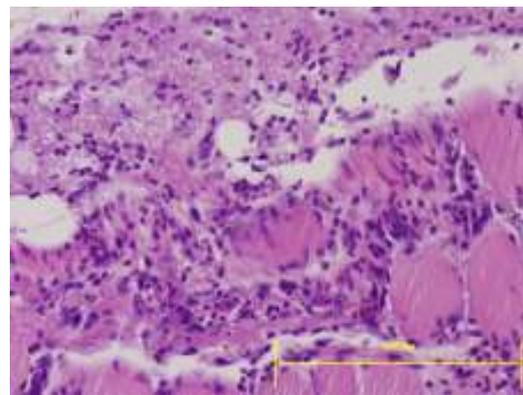
8.4: Ratones sacrificados en el día 20; (Test exacto de Fischer; $p=1$)

DÍA 20			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Infiltrado Inflamatorio	Ausencia/cantidad mínima	Número casos	8	9	17
		%	47,1%	52,9%	100,0%
	Moderado	Número casos	2	1	3
		%	66,7%	33,3%	100,0%
Total		Número casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

Gráfica 6.- Comparación de la cantidad de infiltrado inflamatorio de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en los días señalados. Se encontró tendencia a la significación estadística en el día dos (Test exacto de Fischer; $p=0.087$)



Infiltrado inflamatorio día 2 ratón control (x40)



Infiltrado inflamatorio día 2 ratón tratado (x40)

Imágenes R8.- cortes de las heridas de un ratón control y uno tratado en el día dos teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x40.

2.2.6- TIPO DE INFILTRADO INFLAMATORIO PREDOMINANTE EN LA HERIDA

Las siguientes imágenes muestran los tipos de infiltrado inflamatorio, agudo o crónico, en función de la predominancia de polimorfonucleares o mononucleares respectivamente.

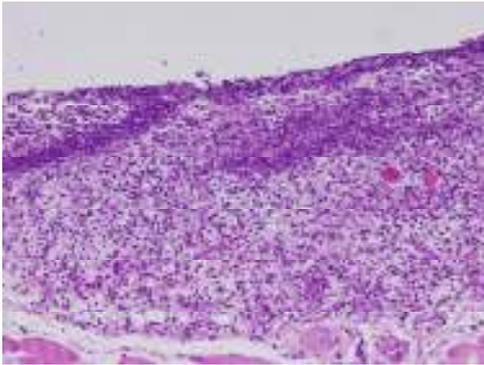


Imagen R9.1: Infiltrado inflamatorio agudo (x10)

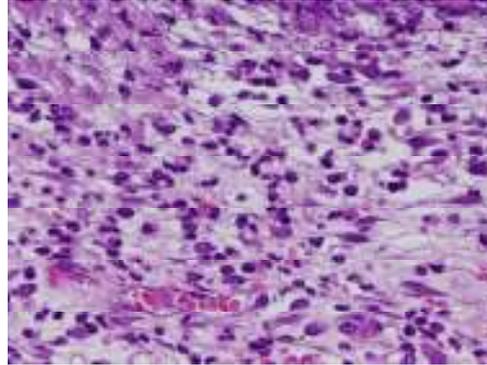


Imagen R9.2: Infiltrado inflamatorio agudo (x40)

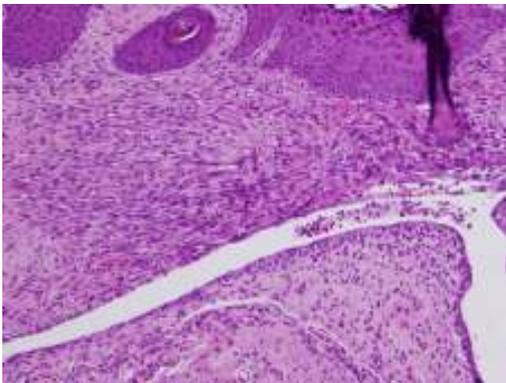


Imagen R9.3: Infiltrado inflamatorio crónico (x10)

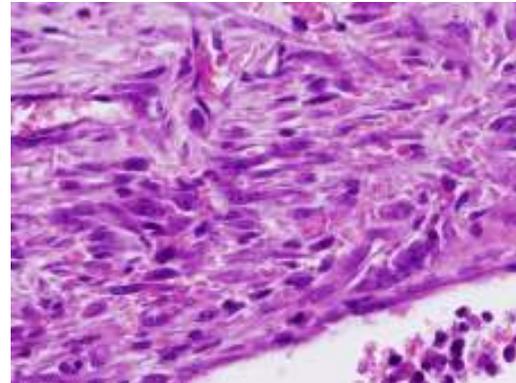


Imagen R9.4: Infiltrado inflamatorio crónico (x40)

Imágenes R9.- Cortes de las heridas teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x10 y x40 para comprobar, el predominio del tipo de infiltrado inflamatorio. Imágenes R9.1/R9.2: Infiltrado inflamatorio de predominio agudo; Imágenes R9.3/R9.4: Infiltrado inflamatorio de predominio crónico.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de esta variable entre los ratones tratados y no tratados. En los días dos y veinte no se pudo realizar la comparación porque todos los ratones tenían infiltrado inflamatorio agudo en el día dos y crónico en el día veinte (tabla 9).

Tabla 9. Distribución de los ratones en función de la predominancia de infiltrado inflamatorio agudo o crónico en la herida en su día de sacrificio (9.1: Ratones sacrificados en el día 2; 9.2: Ratones sacrificados en el día 7; 9.3: Ratones sacrificados en el día 15; 9.4: Ratones sacrificados en el día 20)

9.1: Ratones sacrificados en el día 2

DÍA2			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Tipo infiltrado	agudo	Número casos	10	8	18
		%	55,6%	44,4%	100,0%
Total		Número casos	10	8	18
		%	55,6%	44,4%	100,0%

Nota: No se puede realizar comparación porque en este día la variable tipo de infiltrado inflamatorio es una constante.

9.2: Ratones sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p=0,633$)

DÍA7			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Tipo infiltrado	agudo	Número casos	5	5	10
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	crónico	Número casos	4	2	6
		%	66,7%	33,3%	100,0%
Total		Número casos	9	7	16
		%	56,3%	43,8%	100,0%

9.3: Ratones sacrificados en el día 15; (Test exacto de Fischer; $p= 1$)

DÍA 15			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Tipo infiltrado	agudo	Número casos	1	1	2
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	crónico	Número casos	6	2	8
		%	75,0%	25,0%	100,0%
Total		Número casos	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%

9.4: Ratones sacrificados en el día 20

DÍA 20			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Tipo infiltrado	crónico	Número casos	6	3	9
		%	66,7%	33,3%	100,0%
Total		Número casos	6	3	9
		%	66,7%	33,3%	100,0%

Nota: No se puede realizar comparación porque en este día la variable tipo de infiltrado inflamatorio es una constante.

2.2.7- CANTIDAD DE POLIMORFONUCLEARES, MACRÓFAGOS, FIBROBLASTOS Y VASOS EN LA HERIDA

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la comparación de estas variables en función del tratamiento. La tablas 10, 11, 12 y 13 muestran la distribución de los ratones en función de la cantidad de polimorfonucleares, macrófagos, fibroblastos y vasos respectivamente, valorados semicuantitativamente.

Tabla 10. Distribución de los ratones en función de la cantidad de polimorfonucleares en la herida en su día de sacrificio (10.1: Ratones sacrificados en el día 2; 10.2: Ratones sacrificados en el día 7; 10.3: Ratones sacrificados en el día 15; 10.4: Ratones sacrificados en el día 20).

10.1: Ratones sacrificados en el día 2; (Test exacto de Fischer; $p= 0,216$)

		cantidad de PMN		Total	
		Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada		
Tratamiento	no tratados	Número de casos	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	8	0	8
		%	100,0%	,0%	100,0%
Total		Número de casos	15	3	18
		%	83,3%	16,7%	100,0%

10.2: Ratones sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p= 0,294$)

			cantidad de PMN		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	8	1	9
		%	88,9%	11,1%	100,0%
	tratados	Número de casos	5	4	9
		%	55,6%	44,4%	100,0%
Total		Número de casos	13	5	18
		%	72,2%	27,8%	100,0%

10.3: Ratones sacrificados en el día 15; (Test exacto de Fischer; $p= 1$)

			cantidad de PMN		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	8	1	9
		%	88,9%	11,1%	100,0%
	tratados	Número de casos	8	0	8
		%	100,0%	,0%	100,0%
Total		Número de casos	16	1	17
		%	94,1%	5,9%	100,0%

10.4: Ratones sacrificados en el día 20

			cantidad de PMN	Total
			Ausencia/cantidad mínima	
tratamiento	no tratados	Número de casos	3	3
		%	100,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	6	6
		%	100,0%	100,0%
Total		Número de casos	9	9
		%	100,0%	100,0%

Nota: No se puede realizar comparación porque en este día la variable cantidad de polimorfonucleares en la herida es una constante.

Tabla 11. Distribución de los ratones en función de la cantidad de macrófagos en la herida en su día de sacrificio (11.1: Ratones sacrificados en el día 2; 11.2: Ratones sacrificados en el día 7; 11.3: Ratones sacrificados en el día 15; 11.4: Ratones sacrificados en el día 20).

11.1: Ratones sacrificados en el día 2; (Test exacto de Fischer; $p= 0,474$)

			Cantidad de macrófagos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	10	0	10
		%	100,0%	,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	8	2	10
		%	80,0%	20,0%	100,0%
Total		Número de casos	18	2	20
		%	90,0%	10,0%	100,0%

11.2: Ratones sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p= 0,650$)

			Cantidad de macrófagos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	5	5	10
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	3	7	10
		%	30,0%	70,0%	100,0%
Total		Número de casos	8	12	20
		%	40,0%	60,0%	100,0%

11.3: Ratones sacrificados en el día 15; (Test exacto de Fischer; $p= 0,370$)

			Cantidad de macrófagos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	3	7	10
		%	30,0%	70,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	6	4	10
		%	60,0%	40,0%	100,0%
Total		Número de casos	9	11	20
		%	45,0%	55,0%	100,0%

11.4: Ratones sacrificados en el día 20; (Test exacto de Fischer; $p= 0,628$)

		Cantidad de macrófagos		Total	
		Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada		
Tratamiento	no tratados	Número de casos	6	4	10
		%	60,0%	40,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	8	2	10
		%	80,0%	20,0%	100,0%
Total		Número de casos	14	6	20
		%	70,0%	30,0%	100,0%

Tabla 12. Distribución de los ratones en función de la cantidad de fibroblastos en la herida en su día de sacrificio (12.1: Ratones sacrificados en el día 2; 12.2: Ratones sacrificados en el día 7; 12.3: Ratones sacrificados en el día 15; 12.4: Ratones sacrificados en el día 20).

12.1: Ratones sacrificados en el día 2; (Test exacto de Fischer; $p= 0,211$)

		Cantidad de fibroblastos		Total	
		Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada		
Tratamiento	no tratados	Número de casos	0	10	10
		%	,0%	100,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	3	7	10
		%	30,0%	70,0%	100,0%
Total		Número de casos	3	17	20
		%	15,0%	85,0%	100,0%

12.2: Ratones sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p= 0,656$)

			Cantidad de fibroblastos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	4	6	10
		%	40,0%	60,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	6	4	10
		%	60,0%	40,0%	100,0%
Total		Número de casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

12.3: Ratones sacrificados en el día 15; (Test exacto de Fischer; $p= 0,211$)

			Cantidad de fibroblastos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	10	0	10
		%	100,0%	,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%
Total		Número de casos	17	3	20
		%	85,0%	15,0%	100,0%

12.4: Ratones sacrificados en el día 20; (Test exacto de Fischer; $p= 1$)

			Cantidad de fibroblastos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
tratamiento	no tratados	Número de casos	8	2	10
		%	80,0%	20,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	8	2	10
		%	80,0%	20,0%	100,0%
Total		Número de casos	16	4	20
		%	80,0%	20,0%	100,0%

Tabla 13. Distribución de los ratones en función de la cantidad de vasos en la herida en su día de sacrificio (13.1: Ratones sacrificados en el día 2; 13.2: Ratones sacrificados en el día 7; 13.3: Ratones sacrificados en el día 15; 13.4: Ratones sacrificados en el día 20).

13.1: Ratones sacrificados en el día 2

			Cantidad de vasos	Total
			Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	10	10
		%	100,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	10	10
		%	100,0%	100,0%
Total		Número de casos	20	20
		%	100,0%	100,0%

Nota: No se puede realizar comparación porque en este día la variable cantidad de vasos en la herida es una constante.

13.2: Ratones sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p= 1$)

			Cantidad de vasos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	6	4	10
		%	60,0%	40,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%
Total		Número de casos	13	7	20
		%	65,0%	35,0%	100,0%

13.3: Ratones sacrificados en el día 15; (Test exacto de Fischer; $p= 0,582$)

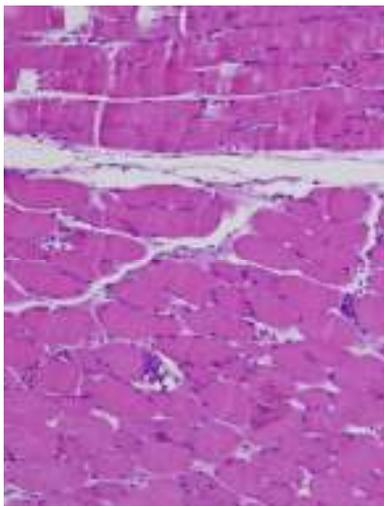
			Cantidad de vasos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	9	1	10
		%	90,0%	10,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%
Total		Número de casos	16	4	20
		%	80,0%	20,0%	100,0%

13.4: Ratones sacrificados en el día 20; (Test exacto de Fischer; $p= 1$)

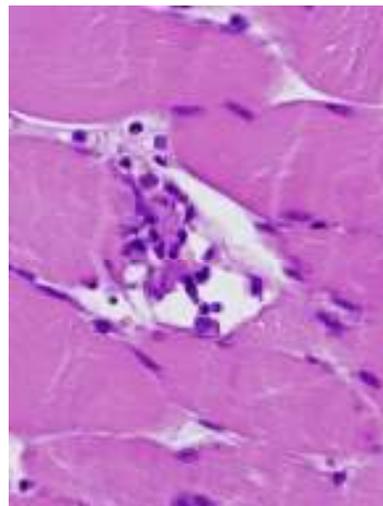
			Cantidad de vasos		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
Tratamiento	no tratados	Número de casos	8	2	10
		%	80,0%	20,0%	100,0%
	tratados	Número de casos	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%
Total		Número de casos	15	5	20
		%	75,0%	25,0%	100,0%

2.2.8- FRECUENCIA DE AFECTACIÓN MUSCULAR POR EL INFILTRADO INFLAMATORIO DE LA HERIDA

Definimos afectación muscular por el infiltrado inflamatorio como presencia de polimorfonucleares entre las fibras musculares presentes debajo de la herida.



Afectación muscular (x10)



Afectación muscular (x40)

Imágenes R10: Imágenes de la herida del ratón número 24 (tratado) en el día dos del experimento, teñidas con hematoxilina-eosina y visualizadas al microscopio óptico con aumento 10x y 40x. En ellas se puede observar la afectación del músculo por el infiltrado inflamatorio de la herida (polimorfonucleares).

Las siguientes imágenes muestran los grados de la variable frecuencia de afectación muscular por el infiltrado inflamatorio. Todas ellas son cortes de las heridas de los ratones obtenidos en su día de sacrificio teñidos con hematoxilina-eosina y objetivados al microscopio óptico con aumento x2 y x20. Para el estudio estadístico recodificamos la variable como: 0= ausencia de infiltrado inflamatorio entre las fibras musculares; 1= presencia de infiltrado inflamatorio entre las fibras musculares.

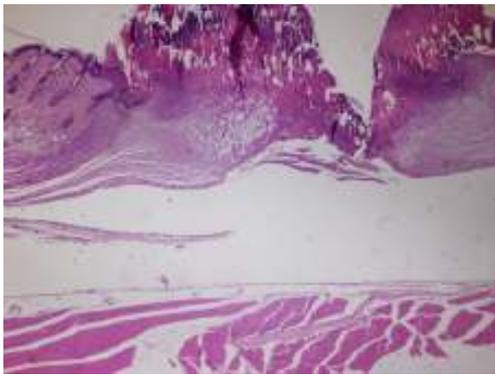


Imagen R11.1: Afectación muscular por infiltrado inflamatorio=0 (x2)

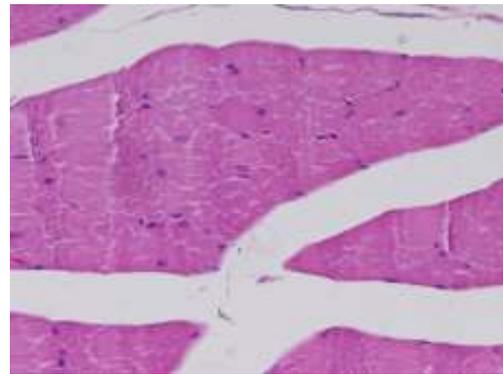


Imagen R11.2: Afectación muscular por infiltrado inflamatorio=0 (x20)

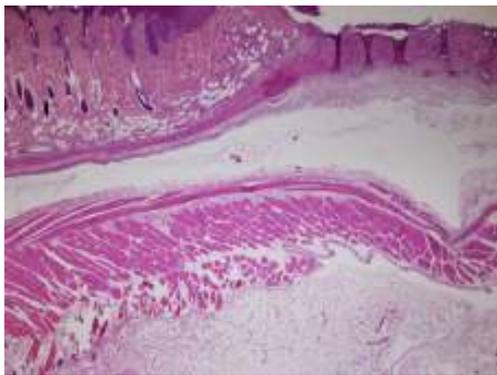


Imagen R11.3: Afectación muscular por infiltrado inflamatorio=1 (x2)

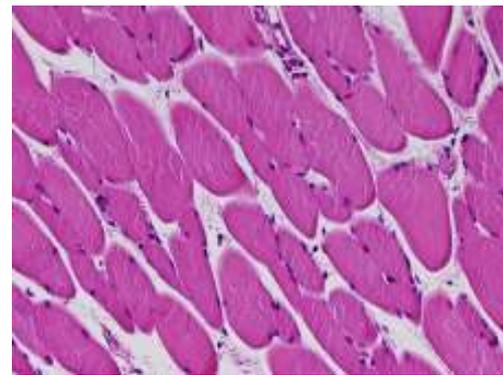


Imagen R11.4: Afectación muscular por infiltrado inflamatorio=1 (x20)

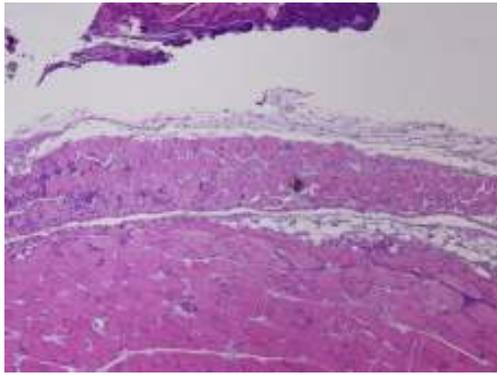


Imagen R11.5: Afectación muscular por infiltrado inflamatorio=2 (x2)

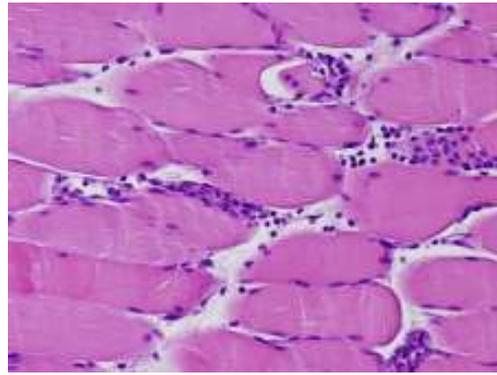


Imagen R11.6: Afectación muscular por infiltrado inflamatorio=2 (x20)

Imágenes R11: cortes de las heridas teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x2 y x20 para comprobar si existe afectación del músculo por el infiltrado inflamatorio, y en caso de existir, cuantificarlo. Imágenes R11.1/R11.2: Afectación muscular=0: no existe afectación del músculo por el infiltrado inflamatorio; Imágenes R11.3/R11.4: Afectación muscular=1 mínima afectación muscular por el infiltrado inflamatorio; Imágenes R11.5/R11.6: Afectación muscular=2 moderada afectación muscular por el infiltrado inflamatorio.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de afectación muscular por el infiltrado inflamatorio en los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día siete (Test exacto de Fischer; $p=0,005$), siendo mayor para los ratones tratados. Como se puede apreciar en la tabla de la odds ratio (día siete), los ratones tratados tienen, como mínimo, una frecuencia de afectación muscular por el infiltrado inflamatorio 2.72 veces superior a los no tratados, y, como máximo, una frecuencia 476.27 veces superior, con un promedio de una frecuencia 36 veces mayor de afectación muscular. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los días. No se realizaron las comparaciones en los días dos y veinte por existir igualdad en la distribución de los grupos (tabla 14; gráfica 7).

Tabla 14. Distribución de los ratones en función de la afectación muscular por el infiltrado inflamatorio de la herida en su día de sacrificio (14.1: Ratones sacrificados en el día 2; 14.2: Ratones sacrificados en el día 7; 14.3: Ratones sacrificados en el día 15; 14.4: Ratones sacrificados en el día 20)

14.1: Ratones sacrificados en el día 2 (Test exacto de Fischer; $p=1$)

DÍA 2			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Afectación muscular por el infiltrado inflamatorio	Ausencia	Número casos	2	2	4
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	Presencia	Número casos	8	8	16
		%	50,0%	50,0%	100,0%
Total		Número casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

14.2: Ratones sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p=0,005$)

DÍA 7			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Afectación muscular por el infiltrado inflamatorio	Ausencia	Número casos	8	1	9
		%	88,9%	11,1%	100,0%
	Presencia	Número casos	2	9	11
		%	18,2%	81,8%	100,0%
Total		Número casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

Odds ratio (día siete)

	Valor	Intervalo de confianza 95%	
		Límite inferior	Límite superior
Tratamiento	36,000	2,721	476,276
N de casos	20		

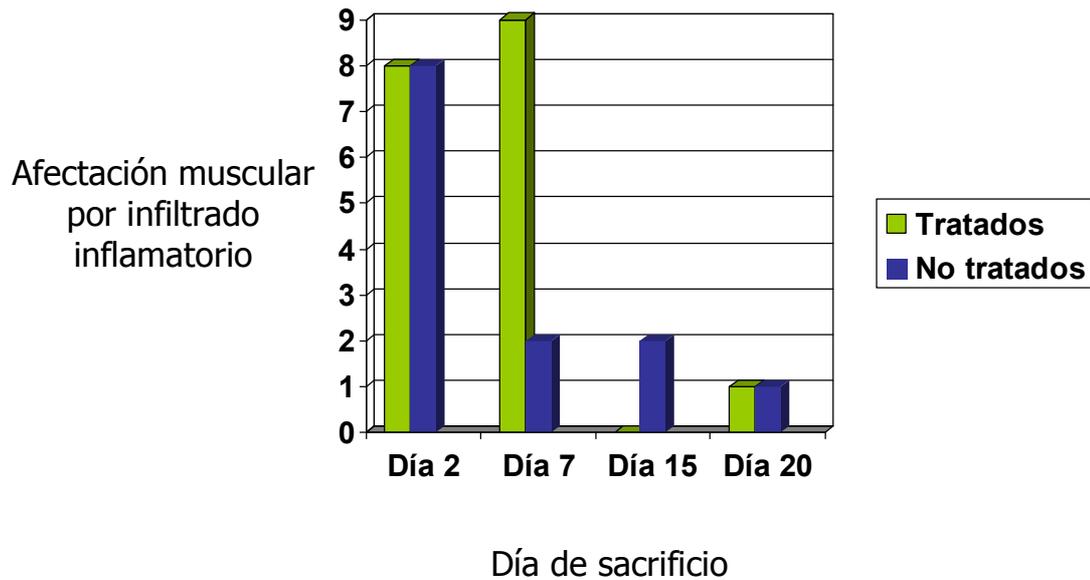
14.3 Ratones sacrificados en el día 15 (Test exacto de Fischer; $p=0,474$)

DÍA 15			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Afectación muscular por el infiltrado inflamatorio	Ausencia	Número casos	8	10	18
		%	44,4%	55,6%	100,0%
	Presencia	Número casos	2	0	2
		%	100,0%	,0%	100,0%
Total		Número casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

14.4: Ratones sacrificados en el día 20 (Test exacto de Fischer; $p=1$)

DÍA 20			tratamiento		Total
			no tratados	tratados	
Afectación muscular por el infiltrado inflamatorio	Ausencia	Número casos	9	9	18
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	Presencia	Número casos	1	1	2
		%	50,0%	50,0%	100,0%
Total		Número casos	10	10	20
		%	50,0%	50,0%	100,0%

Gráfica 7.- Comparación del grado de afectación muscular por el infiltrado inflamatorio de los ratones tratados con respecto a los no tratados en los días señalados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el día siete (Test exacto de Fischer; $p= 0,005$).

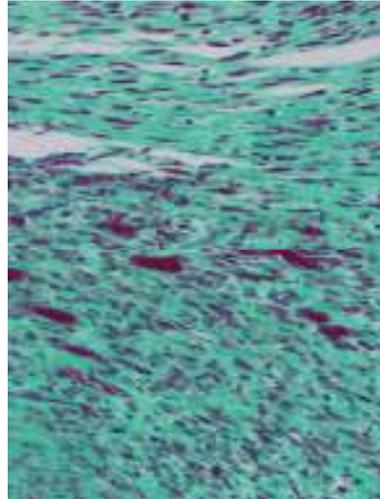


2.2.9- CANTIDAD DE TEJIDO DE GRANULACIÓN PRESENTE EN LA HERIDA

Definimos presencia de tejido de granulación como la existencia de vasos y fibroblastos en el área de la herida.



Tejido de granulación (4x)



Tejido de granulación (10x)

Imágenes R12: Imágenes del tejido de granulación formado en la herida del ratón número 6 (control) en el día siete del experimento, teñidas con Tricrómico de Masson y visualizadas al microscopio óptico con aumento 4x y 10x. En ellas se pueden observar los capilares formados (teñidos de rojo), y los fibroblastos migrando a la zona de la herida (teñidos de verde).

Las siguientes imágenes muestran los grados de la variable cantidad de tejido de granulación. Todas ellas son cortes de las heridas de los ratones obtenidos en su día de sacrificio teñidos con hematoxilina-eosina y objetivados al microscopio óptico con aumento x4 y x20. Para el estudio estadístico recodificamos la variable como sigue: 0= ausencia de tejido de granulación/cantidad mínima; 1= tejido de granulación en cantidad moderada.

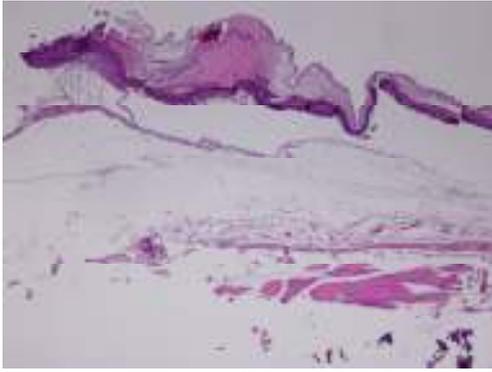


Imagen R13.1: Tejido granulación=0 (x4)



Imagen R11.2: Tejido granulación=0 (x20)

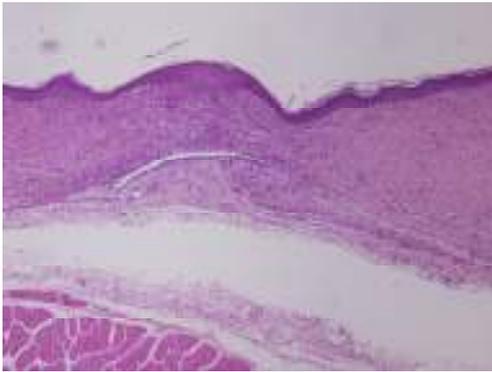


Imagen R13.3: Tejido granulación=1 (x4)

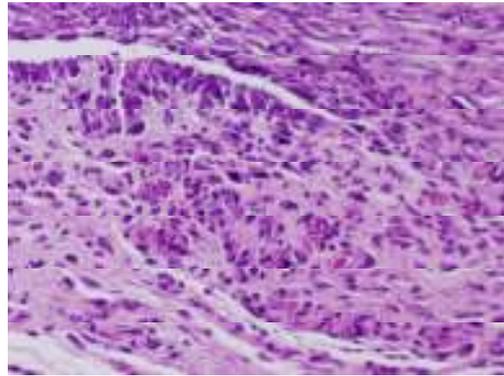


Imagen R13.4: Tejido granulación=1 (x20)

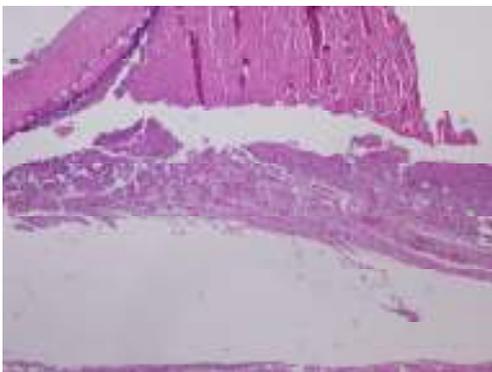


Imagen R13.5: Tejido granulación=2 (x4)

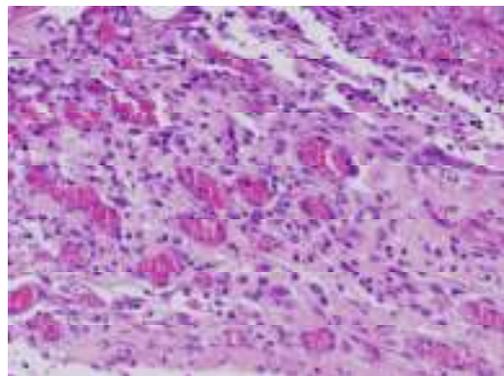


Imagen R13.6: Tejido granulación=2 (x20)

Imágenes R13.- cortes de las heridas teñidos con hematoxilina-eosina y visualizados al microscopio óptico con aumento x4 y x20 para comprobar la existencia o no de tejido de granulación y la cuantía de este en caso de existir. Imágenes R13.1/R13.2: Tejido de granulación=0; Imágenes R13.3/R13.4: Tejido de granulación=1; Imágenes R13.5/R13.6: Tejido de granulación=2.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de esta variable en función del tratamiento (tabla 15).

Tabla 15. Distribución de los ratones en función de la cantidad de tejido de granulación presente en la herida en su día de sacrificio (15.1: Ratones sacrificados en el día 2; 15.2: Ratones sacrificados en el día 7; 15.3: Ratones sacrificados en el día 15; 15.4: Ratones sacrificados en el día 20)

15.1: Ratones sacrificados en el día 2 (Test exacto de Fischer; $p=0,474$)

DÍA 2			Tejido de granulación		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
tratamiento	no tratados	Número casos	10	0	10
		%	100,0%	,0%	100,0%
	tratados	Número casos	8	2	10
		%	80,0%	20,0%	100,0%
Total		Número casos	18	2	20
		%	90,0%	10,0%	100,0%

15.2: Ratones sacrificados en el día 7; (Test exacto de Fischer; $p=1$)

DÍA 7			Tejido de granulación		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
tratamiento	no tratados	Número casos	0	10	10
		%	,0%	100,0%	100,0%
	tratados	Número casos	1	9	10
		%	10,0%	90,0%	100,0%
Total		Número casos	1	19	20
		%	5,0%	95,0%	100,0%

15.3 Ratones sacrificados en el día 15; (Test exacto de Fischer; p=0,650)

DÍA 15			Tejido de granulación		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad moderada	
tratamiento	no tratados	Número casos	5	5	10
		%	50,0%	50,0%	100,0%
	tratados	Número casos	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%
Total		Número casos	12	8	20
		%	60,0%	40,0%	100,0%

15.4: Ratones sacrificados en el día 20 (Test exacto de Fischer; p=0,582)

DÍA 20			Tejido de granulación		Total
			Ausencia/cantidad mínima	Cantidad Moderada	
tratamiento	no tratados	Número casos	7	3	10
		%	70,0%	30,0%	100,0%
	tratados	Número casos	9	1	10
		%	90,0%	10,0%	100,0%
Total		Número casos	16	4	20
		%	80,0%	20,0%	100,0%

2.3- ANÁLISIS DIGITAL DE IMAGEN

El proceso del análisis digital de imagen y la definición de sus variables se ha explicado con anterioridad en el apartado de procedimiento y definición de variables de análisis digital de imagen en la parte de material y métodos.

Este tipo de análisis, al igual que el microscópico, sólo puede dar datos de cada ratón en un día determinado porque para realizar el análisis digital partimos de una muestra de microscopia óptica que se obtiene en el día de sacrificio del ratón (estudio transversal).

2.3.1- ÁREA DE COLAGENIZACIÓN DE LA HERIDA

El área ocupada por el tejido conectivo fue incrementándose con el tiempo en ambos grupos experimentales fundamentalmente a partir del decimoquinto día. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las áreas medias de fibrosis de las heridas de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día veinte (U Mann-Whitney; $p=0,026$), siendo mayor para los ratones tratados. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de las comparaciones (tabla 17; gráfica 9).

Tabla 17. Área media de colagenización de la herida en los ratones tratados y no tratados en su día de sacrificio (U Mann-Whitney)

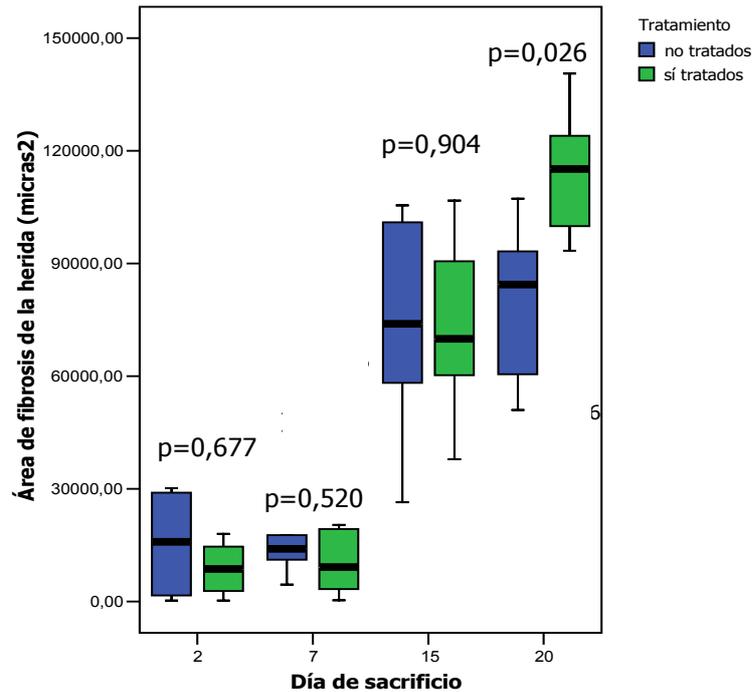
Variable	Tratamiento	Número de casos	Media (μm^2)	Desviación típica	Significación estadística
Área media de colagenización herida DÍA 2	no tratados	10	14800,093	13140,670	$P=0,677$
	tratados	8	19953,851	35781,662	

Área media de colagenización herida DÍA 7	no tratados	9	19421,001	16334,283	$p=0,519$
	tratados	10	14284,945	17520,444	

Área media de colagenización herida DÍA 15	no tratados	10	74684,764	27176,815	$p=0,904$
	tratados	10	73308,264	22797,590	

Área media de colagenización herida Día 20	no tratados	8	79305,882	19798,227	$p=0,026$
	tratados	9	109029,066	28489,957	

Gráfica 9.- Comparación del área de colagenización de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en los días señalados. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el día veinte (U Mann-Whitney; $p=0,026$)



2.3.2- ÁREA DE COLAGENIZACIÓN DEL TEJIDO SANO

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las áreas medias de colagenización en zonas sanas de los ratones tratados con respecto a los no tratados (tabla 19).

Se puede observar que es semejante y homogénea en todos los ratones y fue tomada como referencia para el estudio del grado de colagenización de las heridas. Éstas sólo alcanzan el mismo grado de colagenización que la zona sana tras 20 días e incluso superan la media, como en el caso de los ratones tratados (tabla 17).

Tabla 19. Área media de colagenización del tejido sano en los ratones tratados y no tratados en su día de sacrificio (U Mann-Whitney)

Variable	Tratamiento	Número de casos	Media (μm^2)	Desviación típica	Significación estadística
Area media de colagenización zona sana DÍA 2	no tratados	10	97172,312	24238,209	p=0,660
	tratados	9	91867,911	27347,221	

Area media de colagenización zona sana DÍA 7	no tratados	9	95079,708	24474,070	p=0,641
	tratados	10	89961,900	22473,948	

Area media de colagenización zona sana DÍA 15	no tratados	10	96400,846	17107,283	p=0,413
	tratados	10	160022,648	239357,175	

Area media de colagenización zona sana DÍA 20	no tratados	9	97731,473	20622,760	p=0,993
	tratados	9	97620,928	28195,246	

2.4 - RESUMEN DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS BIVARIANTE

La siguiente tabla (tabla 20) refleja las variables cuantitativas en las que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de los ratones tratados con etanercept con respecto al grupo control, así como el nivel de significación de dicha diferencia.

Como resumen de los datos estadísticamente significativos podemos decir que los ratones tratados con etanercept tienen, en el día dos, una menor reducción de la superficie de la herida, un mayor espesor del epitelio sano y una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio con respecto a los no tratados. En el día siete, los ratones tratados tienen una mayor longitud de la herida con un mayor espesor de su epitelio y una infiltración muscular más frecuente que en los ratones no tratados. Y en el día veinte, el análisis digital muestra una mayor colagenización de las heridas de los tratados con respecto a los no tratados.

En las variables cualitativas se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de infiltrado inflamatorio entre las fibras musculares presentes debajo de la herida en el día siete ($p=0,005$).

Tabla 20. Resumen de las variables cuantitativas en las que se encontraron diferencias estadísticamente significativas y grado de significación de la misma.

Variable	Tratamiento	Número de casos	Media	Desviación típica	Significación estadística
% área de la herida DÍA 2	no tratados	40	108,924	16,719	p=0,017
	tratados	39	119,661	22,042	
Superficie de herida reducida en el DÍA 2	no tratados	40	-8,906	16,734	p=0,017
	tratados	39	-19,661	22,042	
Longitud herida DÍA 7	no tratados	9	3,469	1,186	p=0,007
	tratados	10	4,883	,367	
Espesor epitelio sano DÍA 2	no tratados	10	,199	,048	p=0,038
	tratados	9	,255	,058	
Espesor epitelio herida DÍA 7	no tratados	9	,537	,146	p=0,029
	tratados	10	,785	,283	
Grado de colagenización de la herida Día 20	no tratados	8	79305,882	19798,227	p=0,026
	tratados	9	109029,066	28489,957	

3.- ESTUDIO MULTIVARIANTE

3.1- VARIABLE RESULTADO: LONGITUD DE LA HERIDA

Tablas correspondientes a los distintos modelos de regresión multivariante siendo la variable resultado la longitud de la herida, quedando en el modelo todas las variables predictoras, independientemente de su significación estadística. Cada modelo corresponde a un día de sacrificio.

Tabla 1: Análisis de regresión multivariante en el día 2 con variable resultado la longitud de la herida y variables predictoras el tratamiento, cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo de infiltrado inflamatorio, porcentaje de la herida en el día 2, cantidad de tejido de granulación y espesor del epitelio de la herida

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estandar	Beta		
	Constante	4,434	,648		6,840	,000
	Tratamiento	-,119	,251	-,134	-,475	,642
	Infiltrado Inflamatorio	,429	,300	,405	1,427	,175
	Porcentaje del área herida día 2	,001	,005	,055	,220	,829

Variable dependiente: longitud de la herida (mm); Tratamiento (0=no; 1=sí); Infiltrado inflamatorio (0=ausencia/mínimo; 1=moderado/abundante); Porcentaje del área de la herida: expresada como porcentaje con respecto a su valor en el día cero; B= coeficiente de regresión

Se incluyeron en el modelo predictivo las variables tipo de infiltrado inflamatorio (0=agudo; 1=crónico), cantidad de tejido de granulación (0=ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada/abundante) y espesor del epitelio de la herida (micras), pero fueron excluidas del análisis al no existir (valor cero) en el día 2 para estas variables.

Obsérvese la ausencia de significación estadística de las variables predictoras.

Tabla 2: Análisis de regresión multivariante en el día 7 con variable resultado la longitud de la herida y variables predictoras el tratamiento, cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo de infiltrado inflamatorio, porcentaje de la herida en el día 7, cantidad de tejido de granulación y espesor del epitelio de la herida

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estandar	Beta		
	Constante	,893	,733		1,218	,254
	Tratamiento	,495	,397	,221	1,249	,243
	Infiltrado Inflamatorio	1,232	,446	,367	2,761	,022
	Tipo infiltrado	1,142	,279	,497	4,093	,003
	Tejido de granulación	-,289	,492	-,063	-,588	,571
	Espesor epitelio herida	-,367	,813	-,077	-,451	,662
	Porcentaje del área herida día 7	,022	,004	,768	5,356	,000

Variable dependiente: longitud de la herida (mm); Tratamiento (0=no; 1=sí); Infiltrado inflamatorio (0=ausencia/mínimo; 1=moderado/abundante); Tipo de infiltrado inflamatorio (0=agudo; 1=crónico); Tejido de granulación (0= ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada/abundante); Espesor del epitelio de la herida (micras); Porcentaje del área de la herida: expresada como porcentaje con respecto a su valor en el día cero; B= coeficiente de regresión

Como puede apreciarse, la presencia de infiltrado inflamatorio en grado moderado hace que la longitud de la herida sea, por término medio, 1,3 mm mayor que si no existiese esa cantidad de infiltrado. Algo parecido ocurre con el infiltrado inflamatorio crónico en relación con este mismo de carácter agudo. El porcentaje de la herida es este día está relacionado con la longitud de la misma.

Tabla 3: Análisis de regresión multivariante en el día 15 con variable resultado la longitud de la herida y variables predictoras el tratamiento, cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo de infiltrado inflamatorio, porcentaje de la herida en el día 15, cantidad de tejido de granulación y espesor del epitelio de la herida

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
	Constante	6,206	2,809		2,209	,114
	Tratamiento	-,801	,808	-,427	-,991	,395
	Infiltrado Inflamatorio	-,096	,853	-,056	-,113	,917
	Tipo infiltrado	-1,863	1,230	-,867	-1,514	,227
	Tejido de granulación	-1,214	1,002	-,706	-1,212	,312
	Espesor epitelio herida	-2,262	2,408	-,589	-,939	,417
	Porcentaje del área herida día 15	,018	,017	,473	1,087	,356

Variable dependiente: longitud de la herida (mm); Tratamiento (0=no; 1=sí); Infiltrado inflamatorio (0=ausencia/mínimo; 1=moderado/abundante); Tipo de infiltrado inflamatorio (0=agudo; 1=crónico); Tejido de granulación (0= ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada/abundante); Espesor del epitelio de la herida (micras); Porcentaje del área de la herida: expresada como porcentaje con respecto a su valor en el día cero; B= coeficiente de regresión

No hay ninguna variable que sea predictora de la longitud de la herida de forma estadísticamente significativa.

Tabla 4: Análisis de regresión multivariante en el día 20 con variable resultado la longitud de la herida y variables predictoras el tratamiento, cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo de infiltrado inflamatorio, porcentaje de la herida en el día 20, cantidad de tejido de granulación y espesor del epitelio de la herida

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
	Constante	5,482	2,885		1,900	,154
	Tratamiento	,103	,811	,072	,127	,907
	Infiltrado Inflamatorio	2,346	3,012	1,091	,779	,493
	Existencia o no de TG	-,880	1,059	-,409	-,831	,467
	Espesor epitelio herida	-3,837	6,782	-,858	-,566	,611
	Porcentaje del área herida día 20	-,068	,065	-,594	-1,035	,377

Variable dependiente: longitud de la herida (mm); Tratamiento (0=no; 1=sí); Infiltrado inflamatorio (0=ausencia/mínimo; 1=moderado/abundante); Tipo de infiltrado inflamatorio (0=agudo; 1=crónico); Tejido de granulación (0= ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada/abundante); Espesor del epitelio de la herida (micras); Porcentaje del área de la herida: expresada como porcentaje con respecto a su valor en el día cero; B= coeficiente de regresión

No hay ninguna variable que sea predictora de la longitud de la herida de forma estadísticamente significativa.

3.2 - VARIABLE RESULTADO: COLAGENIZACIÓN DE LA HERIDA

Tablas correspondientes a los distintos modelos de regresión lineal multivariante siendo la variable resultado la colagenización de la herida medida mediante análisis digital de imagen, quedando en el modelo todas las variables predictoras independientemente de su significación estadística. Cada modelo corresponde a un día de sacrificio.

Tabla 5: Análisis de regresión multivariante en el día 2 con variable resultado la fibrosis de la herida y variables predictoras el tratamiento, cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo de infiltrado inflamatorio, porcentaje de la herida en el día 2, cantidad de tejido de granulación y espesor del epitelio de la herida

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
	Constante	-15918,069	32246,822		-,494	,633
	Tratamiento	-18531,629	15529,008	-,551	-1,193	,263
	Infiltrado Inflamatorio	-6872,391	16334,035	-,136	-,421	,684
	Tipo infiltrado	14667,298	11092,558	,425	1,322	,219
	Tejido de granulación	-13940,718	18670,297	-,202	-,747	,474
	Porcentaje del área herida día 2	671,977	275,608	1,114	2,438	,037
	Espesor epitelio herida	-33279,883	30933,855	-,462	-1,076	,310

Variable dependiente: área media de fibrosis de la herida (μm^2); Tratamiento (0=no; 1=sí); Infiltrado inflamatorio (0=ausencia/mínimo; 1=moderado/abundante); Tipo de infiltrado inflamatorio (0=agudo; 1=crónico); Tejido de granulación (0= ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada/abundante); Espesor del epitelio de la herida (micras); Porcentaje del área de la herida: expresada como porcentaje con respecto a su valor en el día cero; B= coeficiente de regresión

Como puede observarse, el aumento en un 1% del porcentaje de la herida supone un aumento en $671,97 \mu\text{m}^2$ su tejido conectivo.

Tabla 6: Análisis de regresión multivariante en el día 7 con variable resultado la fibrosis de la herida y variables predictoras el tratamiento, cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo de infiltrado inflamatorio, porcentaje de la herida en el día 7, cantidad de tejido de granulación y espesor del epitelio de la herida

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
	Constante	18631,734	30729,593		,606	,559
	Tratamiento	-8710,529	16621,934	-,259	-,524	,613
	Infiltrado Inflamatorio	-9658,007	18716,845	-,191	-,516	,618
	Tipo infiltrado	2400,571	11691,587	,070	,205	,842
	Tejido de granulación	660,031	20614,112	,010	,032	,975
	Espesor epitelio herida	-17796,123	34097,552	-,247	-,522	,614
	Porcentaje del área herida día 7	258,054	171,282	,603	1,507	,166

Variable dependiente: área media de fibrosis de la herida (micras²); Tratamiento (0=no; 1=sí); Infiltrado inflamatorio (0=ausencia/mínimo; 1=moderado/abundante); Tipo de infiltrado inflamatorio (0=agudo; 1=crónico); Tejido de granulación (0= ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada/abundante); Espesor del epitelio de la herida (micras); Porcentaje del área de la herida: expresada como porcentaje con respecto a su valor en el día cero; B= coeficiente de regresión

No hay ninguna variable predictora de la colagenización de la herida de forma estadísticamente significativa.

Tabla 7: Análisis de regresión multivariante en el día 15 con variable resultado la fibrosis de la herida y variables predictoras el tratamiento, cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo de infiltrado inflamatorio, porcentaje de la herida en el día 15, cantidad de tejido de granulación y espesor del epitelio de la herida

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar	Beta		
	Constante	12839,398	101317,453		,127	,907
	Tratamiento	1836,052	29144,802	,036	,063	,954
	Infiltrado Inflamatorio	3416,137	30784,021	,074	,111	,919
	Tipo infiltrado	28671,955	44379,672	,496	,646	,564
	Tejido de granulación	6993,570	36133,275	,151	,194	,859
	Espesor epitelio herida	62660,894	86846,460	,607	,722	,523
	Porcentaje del área herida día 15	235,193	610,327	,225	,385	,726

Variable dependiente: área media de fibrosis de la herida (micras²); Tratamiento (0=no; 1=sí); Infiltrado inflamatorio (0=ausencia/mínimo; 1=moderado/abundante); Tipo de infiltrado inflamatorio (0=agudo; 1=crónico); Tejido de granulación (0= ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada/abundante); Espesor del epitelio de la herida (micras); Porcentaje del área de la herida: expresada como porcentaje con respecto a su valor en el día cero; B= coeficiente de regresión

No hay ninguna variable predictora de la colagenización de la herida de forma estadísticamente significativa.

Tabla 8: Análisis de regresión multivariante en el día 20 con variable resultado la fibrosis de la herida y variables predictoras el tratamiento, cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo de infiltrado inflamatorio, porcentaje de la herida en el día 20, cantidad de tejido de granulación y espesor del epitelio de la herida

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error estándar			
	Constante	23868,595	88788,868		,269	,805
	Tratamiento	-17243,599	24961,975	-,355	-,691	,539
	Infiltrado Inflamatorio	-22994,964	92695,705	-,315	-,248	,820
	Existencia o no de TG	-42537,270	32589,350	-,583	-1,305	,283
	Porcentaje del área herida día 20	3510,176	2013,006	,909	1,744	,180
	Espesor epitelio herida	129866,565	208703,319	,857	,622	,578

Variable dependiente: área media de fibrosis de la herida (micras²); Tratamiento (0=no; 1=sí); Infiltrado inflamatorio (0=ausencia/mínimo; 1=moderado/abundante); Tipo de infiltrado inflamatorio (0=agudo; 1=crónico); Tejido de granulación (0= ausencia/cantidad mínima; 1= cantidad moderada/abundante); Espesor del epitelio de la herida (micras); Porcentaje del área de la herida: expresada como porcentaje con respecto a su valor en el día cero; B= coeficiente de regresión

No hay ninguna variable predictora de la colagenización de la herida de forma estadísticamente significativa.

3.3- RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO MULTIVARIANTE

3.3.1- VARIABLE RESULTADO: LONGITUD DE LA HERIDA

Las relaciones estadísticamente significativas encontradas entre las variables predictoras cantidad de infiltrado inflamatorio, tipo del mismo, y porcentaje de la herida para la variable resultado longitud de la herida se refieren únicamente al día siete. No se han encontrado relaciones estadísticamente significativas en ninguno de los otros días.

La presencia de infiltrado inflamatorio en grado moderado en el día siete hace que la longitud de la herida en ese día sea, por término medio, 1.3 mm mayor que si no existiese esa cantidad de infiltrado. Si el infiltrado inflamatorio presente en la herida en el día siete es de predominio crónico la longitud de la misma será 1.2 mm mayor que si fuese de predominio agudo. El porcentaje de la herida en este día está relacionado con la longitud de la misma en el día siete.

3.3.2 - VARIABLE RESULTADO: COLAGENIZACIÓN DE LA HERIDA

Para la variable resultado fibrosis de la herida se ha encontrado relación estadísticamente significativa con la variable predictora porcentaje del área de la herida en el día dos, de forma que, un aumento en un 1% del porcentaje de la herida en dicho día aumenta en $671,97 \mu\text{m}^2$ su tejido conectivo en el mismo.

4.- CORRELACIONES

La siguiente tabla muestra los coeficientes de correlación y variables asociadas por ellos según el día de sacrificio en los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas

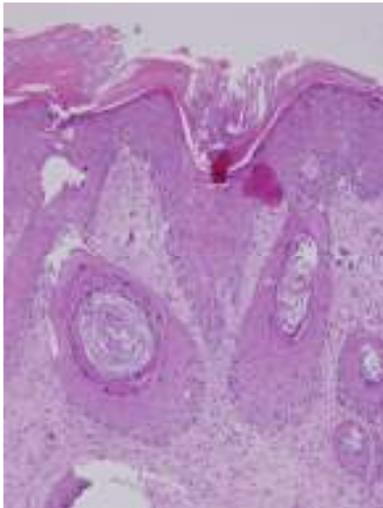
DÍA DE CORRELACIÓN	VARIABLE 1º	VARIABLE 2º	COEFICIENTE CORRELACIÓN	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA
DÍA DOS	Área absoluta en el día cero	Área media de fibrosis de la herida	- 0,703	0,001
DÍA SIETE	Grado curación día dos	Longitud de la herida	- 0,538	0,017
DÍA VEINTE	Área absoluta día cero	Área de fibrosis herida	-0,631	0,005
	Grado de curación día dos	Espesor epitelio de la herida	0,557	0,031

Los ratones que tenían un área absoluta en el día cero menor tienen, en el día dos, un menor grado de colagenización de la herida ($p=0,001$).

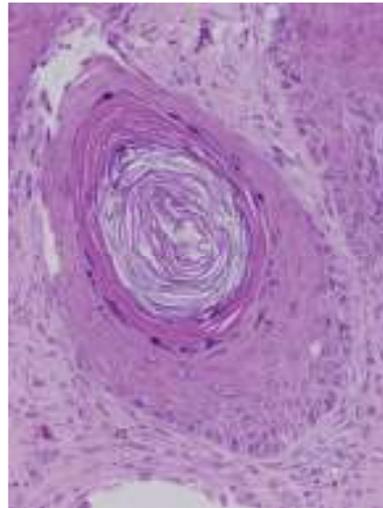
Los ratones que en el día cero tenían una menor área de la herida tienen un menor grado de colagenización en el día veinte ($p=0,005$), y, los que tenían un grado de curación mayor en el día dos tienen un mayor espesor del epitelio de la herida en el día veinte ($p=0,031$)

5.- IMÁGENES A DESTACAR

A continuación se muestran una serie de imágenes observadas en algunos ratones del experimento que queremos destacar por su curiosidad:

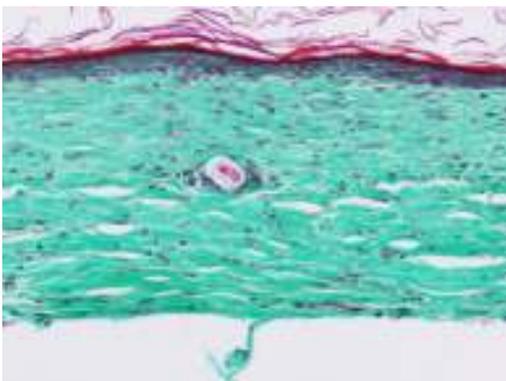


Quistes córneos (x10)



Quiste córneo (x40)

Imágenes R14: Imágenes de la herida del ratón número 12 (control) obtenidas en el día quince del experimento, teñidas con hematoxilina-eosina y visualizadas al microscopio óptico con aumento x10 y x40. En este ratón hay que destacar que además de tener una reepitelización completa ha formado quistes córneos, proceso extraño en este tipo de animales.

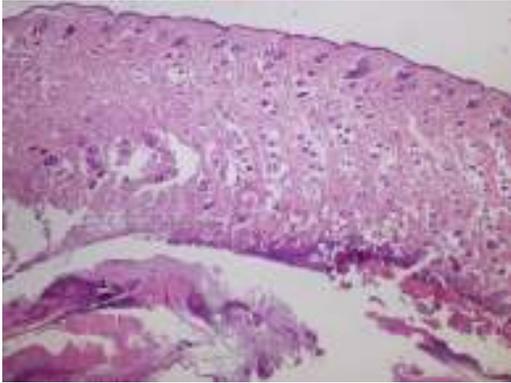


Microgranuloma frente a queratina (x10)

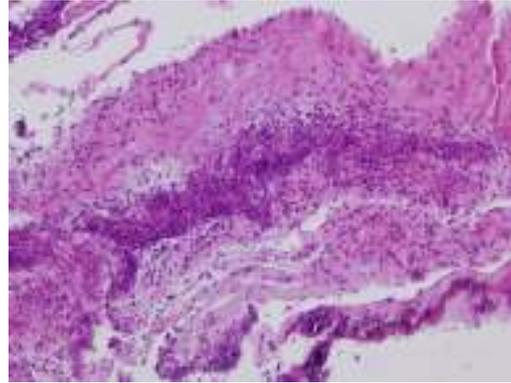


Microgranuloma frente a queratina (x40)

Imágenes R15: Imágenes de la herida del ratón número 18 (control) obtenidas en el día 20 del experimento, teñidas con Tricómico de Masson y visualizadas al microscopio óptico con aumento x10 y x40. En ellas se observa la formación de un microgranuloma frente a queratina.

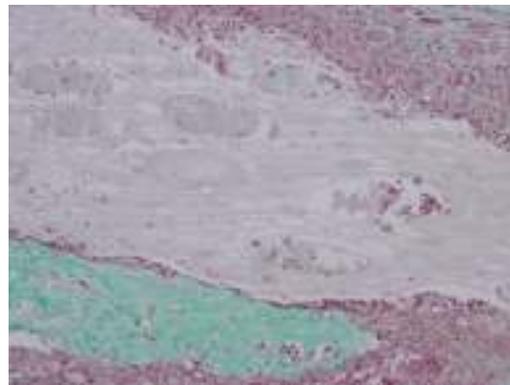
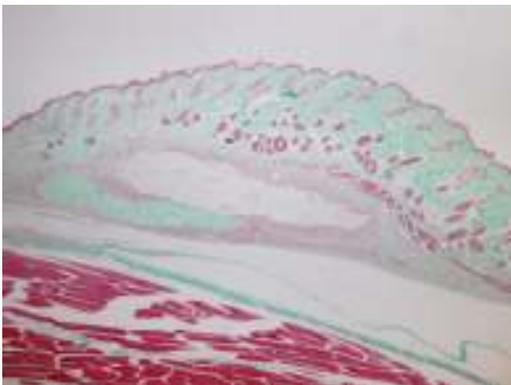


Absceso hipodérmico (x2)



Absceso hipodérmico (x10)

Imágenes R16: Imágenes de la herida del ratón número 25 (tratado) obtenidas en el día 7 del experimento, teñidas con hematoxilina-eosina y visualizadas al microscopio óptico con aumento x2 y x10. En ellas se observa la formación de un absceso en la hipodermis con abundantes polimorfonucleares.



Imágenes R17: Imágenes de la herida del ratón número 51 (control) obtenidas en el día 7 del experimento, teñidas con Tricrómico de Masson y visualizadas al microscopio óptico con aumento x2 y x10. En ellas se observa la formación de un absceso perilesional, próximo a la zona de reparación de la herida en el que una fibra vegetal ha generado una reacción granulomatosa. Probablemente se trata de un pequeño trozo de papel presente en la jaula del ratón.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN GENERAL

El papel del TNF alfa en la cicatrización de las heridas es múltiple, estando implicado en distintos pasos del proceso así como en cada una de sus fases. En la fase inflamatoria, una vez realizada la hemostasia, aproximadamente en los primeros cuatro días tras la realización de la herida, el TNF alfa contribuye a la atracción de los neutrófilos para la liberación de enzimas proteolíticas y generación de radicales libres que esterilizarán la zona de la herida. Asimismo, tras la apoptosis de los neutrófilos, se atraerán monocitos a la herida que una vez transformados en macrófagos promoverán, a través del TNF alfa, la angiogénesis, la fibroplasia y la síntesis de metaloproteinasas que destruirán la matriz extracelular dañada. La fase proliferativa de la cicatrización ocurre aproximadamente desde el cuarto día al día decimocuarto y la epitelización esta asegurada por la influencia del TNF alfa así como de la IL-1 en el aumento de la expresión del gen codificador del factor de crecimiento de queratinocitos en los fibroblastos, por lo que los queratinocitos próximos migran al lecho de la herida, proliferan y se diferencian. A su vez, de forma indirecta, el TNF alfa estimula la angiogénesis ya que los queratinocitos sintetizarán factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que estimulará las células endoteliales de las vénulas para la formación de nuevos capilares precisos para que siga avanzando el proceso. Por último, el TNF alfa influirá en la formación de tejido de granulación al aumentar las integrinas que servirán de andamio en la matriz provisional. A partir del octavo día de la cicatrización y a lo largo de un año podemos decir que tiene lugar el depósito de colágeno en una red organizada, es decir, que la matriz de fibrina y fibronectina formada se reemplazará por una matriz de colágeno inicial de fibras delgadas paralelas a la piel que posteriormente será remodelada y se depositarán fibras gruesas paralelas a las líneas de estrés. En este último paso influye también el TNF alfa de forma indirecta mediante el estímulo de la síntesis de metaloproteinasas (George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Manis MD, Christopher E. Attinger MD, 2006).

Los estudios que investigan la influencia del TNF alfa en la curación de las heridas son escasos. Disponemos de un total de nueve estudios desde el año

1990, cinco de los cuales estudian la influencia de la aplicación local del TNF alfa mientras que los otros cuatro investigan los efectos del antagonismo sistémico.

En el año 1990 Mooney y colaboradores demostraron que el TNF alfa influía en la cicatrización de las heridas, y que la concentración del mismo, el horario, y su vehículo de administración modulaba dicha cicatrización (Mooney DP, O'Reilly M, Gamelli RL. 1990). Los estudios animales de los que disponemos para constatar los resultados de la aplicación local de TNF en la cicatrización nos ofrecen datos contradictorios. Así, Fu y colaboradores en el año 1996 encontraron beneficios para la cicatrización en la aplicación local del TNF alfa en modelos de ratas usando heridas incisionales (Fu X, Tian H, Hsu S, Wang D, Sheng Z. 1996), mientras que Rapala y colaboradores, y Salomon y colaboradores en el año 1991 y, posteriormente de nuevo Rapala en un segundo estudio en 1997, mostraron que existía un descenso en la producción de colágeno y de tejido de granulación y una disminución de la fuerza tensil (Rapala K, Laato M, Niinikoski J, Kujari H, Soder O, Mauviel A, Pujol JP. 1991; Rapala K, Peltonen J, Heino J, Kujari H, Pujol JP, Niinikoski J, Laato M. 1997; Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, Norton JA. 1991).

Los cuatro estudios publicados sobre la influencia de la antagonización sistémica del TNF alfa concluyen que mejora la cicatrización de las heridas porque aumenta la fuerza de ruptura y la organización y el depósito de colágeno de la herida incisional en ratas sépticas (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998), mejora la calidad y cantidad del tejido de granulación en estado séptico en ratas (Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997), aumenta la angiogénesis, el contenido en colágeno y la reepitelización de la herida en ratas deficientes del receptor p55 del TNF alfa (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002), y disminuye la apoptosis de los fibroblastos en la herida de ratas diabéticas aumentando su grado final de fibrosis (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006).

La discusión de nuestro trabajo vamos a dividirla en tres apartados: discusión metodológica, donde comentaremos por qué hemos realizado este diseño y por

qué el material y método utilizado; discusión de los resultados obtenidos, donde realizaremos un comentario de nuestros resultados comparándolos con las funciones atribuidas al TNF alfa en la cicatrización y con los estudios publicados en relación con este tema; y aplicación clínica donde explicaremos la importancia del experimento y la posibilidad de extrapolación a la práctica clínica diaria.

DISCUSIÓN METODOLÓGICA

1.- Discusión del modelo experimental

1.1- Animal de experimentación

El primer estudio experimental sobre la influencia del TNF alfa en la cicatrización de las heridas fue realizado en el año 1990 por Mooney y colaboradores y desde entonces hasta hoy sólo se han publicado ocho estudios más. Seis de estos estudios emplearon ratas como animal de experimentación, Sprague-Dawley en cinco de ellos (Rapala K, Laato M, Niinikoski J, Kujari H, Soder O, Mauviel A, Pujol JP. 1991; Rapala K, Peltonen J, Heino J, Kujari H, Pujol JP, Niinikoski J, Laato M. 1997; Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998; Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997; Fu X, Tian H, Hsu S, Wang D, Sheng Z. 1996) y Fischer en el otro (Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, Norton JA. 1991), mientras que los restantes utilizaron distintos tipos de ratones como los B6DF1 (Mooney DP, O'Reilly M, Gamelli RL. 1990), BALB/c (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002), y C57BL/J (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006). En nuestro estudio hemos utilizado ratones machos de la raza SWISS-OF1. La razón por la que se emplea este animal es porque comparten los receptores el TNF alfa con los humanos

Sólo cuatro de los nueve estudios investigan la influencia del antagonismo sistémico del TNF alfa en la curación de las heridas (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998; Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997; Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002; Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006), y de esos cuatro estudios, tres emplean ratones deficitarios para la cicatrización con ratones sépticos en dos de ellos (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998; Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997) y diabéticos en el otro (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006), y el cuarto estudio emplea ratones knockeados para el receptor p55 del TNF alfa (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002).

Nosotros decidimos emplear ratones sanos en nuestro estudio para investigar la influencia del TNF alfa en la curación de las heridas "en estado puro" y no en una situación en la que las alteraciones de la cicatrización pudiesen deberse a un exceso de TNF alfa.

1.2- Diseño del experimento

Los cuatro estudios experimentales publicados que investigan la influencia del antagonismo sistémico del TNF alfa en la curación de las heridas lo hacen en la primera semana tras la realización de la herida, lo que correspondería a la fase inflamatoria y comienzo de la fase proliferativa. En nuestro experimento investigamos la influencia del TNF alfa en cada una de las fases de curación de la herida puesto que el papel del TNF alfa no se limita al comienzo del proceso. Utilizamos el día dos como representante de la fase inflamatoria, el siete de la fase proliferativa, y, el decimoquinto y vigésimo como representantes de la de maduración y remodelado.

Realizamos las heridas en el dorso del animal porque era una zona a la que no tendría acceso para manipularla.

En ensayos previos intentamos tomar biopsias de la herida con punch para poder biopsiar una misma herida en cada uno de los días marcados del experimento en lugar de tener muestras de heridas distintas en cada uno de los días pero, aunque utilizamos el punch de menor diámetro, la muestra se estropeaba, por lo que decidimos conveniente extraer la herida completa y fijarla a una superficie consistente para su introducción en formol y manipularla posteriormente para realizar los corte una vez la muestra se hubiese endurecido.

1.3- Antagonismo del TNF alfa

De los cuatro estudios mencionados, dos de ellos antagonizan el TNF alfa mediante una proteína de unión al mismo (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998; Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997), otro mediante ratones deficientes del receptor p55 del TNF alfa (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002) y el último administrando etanercept intraperitoneal

en el periodo perioperatorio y subcutánea en el momento de realizar la herida (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006). Creemos que esta pauta de administración no es equivalente a la utilizada en humanos.

Nosotros empleamos etanercept porque de los tres antagonistas sistémicos de esta citoquina utilizados en la práctica clínica su vía de administración subcutánea resulta cómoda para emplearlo en ratones, y disponemos de datos farmacológicos para la experimentación en animales (Pharmacokinetics and product metabolism in animals, etanercept). Lo utilizamos con la pauta y vía de administración empleada en humanos para que el experimento fuese lo más parecido a la práctica clínica.

2.- Discusión de los métodos de evaluación de curación de la herida

Utilizamos tres métodos distintos para evaluar la curación de la herida: macroscópico para medir área de la herida y superficie de reducción de la misma; microscópico para medir longitud de la herida, espesores epiteliales, cantidad y tipo de tejido inflamatorio, frecuencia de afectación muscular por el mismo y cantidad de tejido de granulación; y digital para medir grado de colagenización de la herida.

2.1- Estudio macroscópico

Sólo uno de los estudios mencionados mide cierre macroscópico de la herida (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002) realizando fotografías digitales que analizan con el programa informático PhotoShop®. Expresan los cambios en el área de la herida como cambios en su porcentaje con respecto al día cero pero sólo lo hacen en los días uno y tres tras la realización de la herida, por lo que sólo estarían estudiando la influencia del TNF alfa en el cierre macroscópico de la herida en la fase inflamatoria de la cicatrización. Nosotros estudiamos esta variable a lo largo de todo el proceso de cicatrización para estudiar la influencia del TNF alfa en cada una de sus fases. Para el estudio macroscópico de la herida nosotros utilizamos imágenes digitales de la herida obtenidas en cada uno de los días señalados con una cámara digital y procesadas con el programa AutoCAD® 2005 de diseño gráfico asistido por ordenador. No podemos

comparar la exactitud del método de medida porque no disponemos de la explicación metodológica del estudio mencionado.

Como luego veremos en la discusión de los resultados obtenidos, creemos que nuestro estudio macroscópico puede tener un sesgo de medición en los días dos, quince y veinte del ensayo, que explicaríamos porque en el día dos, lo que realmente estamos midiendo es la costra de la herida y no su área exacta, y en los días quince y veinte, la herida está ya tan cicatrizada microscópicamente que la realización de la línea que delimite el área de la herida es un poco grosera ya que, a diferencia de los humanos, los animales recuperan los anejos cutáneos.

2.2- Estudio microscópico

Realizamos además un estudio microscópico en el que analizamos longitud de la herida y espesores epiteliales como variables cuantitativas y cantidad y tipo de tejido inflamatorio, frecuencia de afectación más profunda en planos musculares por el mismo y cantidad de tejido de granulación como variables cualitativas. Las variables cuantitativas nos permitieron emplear tests estadísticos más potentes que las cualitativas. Debido al escaso tamaño muestral tuvimos que transformar las variables cualitativas en dicotómicas para poder emplear los tests estadísticos con muestra suficiente perdiendo potencia en la comparación.

Los cuatro estudios comentados realizaron examen microscópico de las heridas pero estudiando sólo una o dos variables en cada uno de ellos y limitándose a uno o dos días de la primera semana del proceso de curación. Estudiaron depósito de colágeno de una forma indirecta mediante niveles de hidroxiprolina (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998; Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997) y de forma directa mediante birrefringencia con luz polarizada de una muestra teñida con rojo sirio (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. 1998) o con análisis asistido por ordenador sobre tinciones con tinción de Van-Gienso (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006); cantidad de neutrófilos cuantificando mieloperoxidasa y grado de reepitelización midiendo la distancia entre los bordes de la herida

(Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002); cantidad y calidad de tejido de granulaci3n cuantificando capas y componentes del mismo en la esponja implantada en el abdomen del animal (Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P, 1997); y, apoptosis de fibroblastos mediante un kit espec3fico (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006).

Nosotros estudiamos longitud de la herida y espesores epiteliales sobre una imagen digital de un corte de la herida del rat3n teñido con hemtoxilina-eosina y procesada con el programa AutoCad 2005[®] para conseguir la mayor exactitud posible en la medici3n. No podemos hacer una cr3tica minuciosa sobre el m3todo de medici3n de estas variables por falta de datos en los art3culos publicados, pero creemos son similares a nuestro m3todo. La diferencia principal con nuestro estudio es que nosotros medimos m3s variables en cada animal y que lo hacemos en cuatro d3as distintos a lo largo de todo el proceso. Si queremos destacar la exactitud de nuestro m3todo para medir colagenizaci3n (an3lisis digital de imagen) que comentaremos a continuaci3n.

2.3- An3lisis digital de imagen

Utilizamos el an3lisis digital de imagen por tratarse de un estudio m3s preciso y reproducible que nos permitiese detectar diferencias no detectables con los m3todos anteriores. En los estudios anatomo-patol3gicos y, en general, en todos los campos donde el objeto del an3lisis es una imagen, resulta inmediata la aplicaci3n, por lo menos te3rica, de metodolog3as de an3lisis de imagen digital. Por este motivo, desde hace algunos años se empezaron a generar im3genes digitales de los tejidos y a realizar evaluaciones t3cnicas autom3ticas de elaboraci3n de imagen; su aplicaci3n se reduc3a exclusivamente a procedimientos de digitalizaci3n y cuantificaci3n de la imagen, no utilizando las t3cnicas de realce y filtrado de la misma, y realizando de forma manual todas las operaciones de extracci3n, identificaci3n y clasificaci3n de las 3reas de inter3s en la imagen (Yasuda M, Miwa A, Kitagawa M. 1995; Marcussen N, Nyengaard JR, Christensen S. 1994; Lane PH. 1995; Dodane V, Chevalier J, Bariety J, Pratz J, Corman B. 1991; Remuzzi A, Mazerska M, Gephardt GN, Novick AC, Brenner BM, Remuzzi G. 1995; Remuzzi A, Pergolizzi R, Mauer MS,

Bertani T. 1990; Remuzzi A, Puntorieri S, Alfano M, Macconi D, Abbate M, Bertani T, Remuzzi G. 1992). Esto, además de enlentecer y hacer muy tediosa la evaluación, y de imponer su realización por parte de observadores expertos, no asegura la objetividad y reproducibilidad de los resultados. En efecto, el solo hecho de hacer cuantitativa una evaluación no significa por sí que ésta sea mejor de un análisis semicuantitativo. La mejoría real se obtiene cuando se realizan cuantificaciones precisas, exactamente reproducibles y lo más objetivas posible. A pesar de ser bien conocidos estos conceptos, en la casi totalidad de los trabajos médicos publicados que utilizan metodologías manuales de análisis de imagen, no se realizan evaluaciones de la variabilidad intra- o interobservadores de las cuantificaciones presentadas, dejando suspensa su efectiva objetividad (Dodane V, Chevalier J, Bariety J, Pratz J, Corman B. 1991; Remuzzi A, Puntorieri S, Alfano M, Macconi D, Abbate M, Bertani T, Remuzzi G. 1992; Puglisi RN, Doolin EJ, Hewitt CW. 1995; Tatem L, Hou A, Black KS, Lull R, Hewitt C. 1995).

Esta comprobación aparece claramente no relevante en el caso en que los únicos pasos manuales de la cuantificación consistan, por ejemplo, en el aislamiento de estructuras bien definidas en la imagen a través del seguimiento con el ratón de sus bordes. Sin embargo, el análisis de la reproducibilidad y objetividad de las evaluaciones efectuadas resultaría indispensable en otros casos, cuando los bordes a seguir no sean claramente visibles, o la clasificación de los elementos de la imagen resulta incierta, o simplemente la segmentación de las áreas de interés, por su extensión y características, se realiza por umbralización de la imagen, con la posibilidad que al variar limitadamente el valor del umbral varíe considerablemente la superficie de las áreas segmentadas.

Tan solo en los últimos años se están aplicando, a la medicina en general y a la videomicroscopia en particular, técnicas automáticas de elaboración de imagen ya desarrolladas desde el punto de vista teórico y aplicadas en otros campos científicos. A través de éstas, en algunos casos se realizan de forma automática los pasos manuales antes utilizados en la cuantificación de una imagen, intentando resolver los problemas de segmentación e identificación que

presentan las imágenes biológicas (Sassy-Prigent C, Heudes D, Jouquey S, Auberval D, Belair MF, Michel O, Hamon G, Bariety J, Bruneval P. 1995). En otros casos, se definen nuevas metodologías y parámetros de cuantificación para evaluar cuantitativamente una imagen (Moreso F, Seron D, Vitria J, Grinyo JM, Colome-Serra FM, Pares N, Serra J. 1994). Estas aportaciones automáticas resultan seguramente muy importantes dado que permiten obtener cuantificaciones objetivas y reproducibles. Sin embargo, en varios casos, ya que los algoritmos utilizados se engloban en aplicaciones comerciales, es difícil encontrar la documentación precisa de su funcionamiento y, en general, los artículos publicados con los datos obtenidos usando estas aplicaciones describen sólo limitadamente los pasos de elaboración seguidos, no especificando en cualquier caso si se trata de operaciones totalmente automáticas o parcialmente interactivas (Sassy-Prigent C, Heudes D, Jouquey S, Auberval D, Belair MF, Michel O, Hamon G, Bariety J, Bruneval P. 1995). La aplicación de análisis de imagen presentada en este trabajo de Tesis Doctoral se enmarca en la idea anterior de aplicar técnicas automáticas de análisis digital de imagen a la videomicroscopia en el campo anatomopatológico, con el propósito de obtener cuantificaciones precisas, objetivas y reproducibles de los componentes de una imagen o de su totalidad. Con este fin se diseñó el método de cuantificación de diferentes parámetros para evaluar el grado del proceso de cicatrización, empezando con la elección del tipo de tinción tisular más adecuada para resaltar los diferentes elementos y permitir su segmentación automática e identificación. Los programas de elaboración y cuantificación de imagen se realizaron de forma totalmente automática con excepción del paso de identificación de la zona de heirda, que se decidió introducir de forma interactiva ya que no hemos encontrado en la literatura ningún trabajo donde se resuelva de forma automática el aislamiento de estas estructuras.

En videomicroscopia, la elección de la tinción tisular resulta de fundamental importancia dado que las estructuras que se pueden medir por análisis de imagen son solamente las puestas en evidencia por el colorante utilizado. Por este motivo, la tinción empleada tiene que ser la más específica posible, en

relación con el objetivo de la evaluación, y la más adecuada para el tipo de parámetros que se quieren evaluar (densitométricos o morfológicos). Para una correcta evaluación por análisis digital de imagen, se requiere que la tinción sea reproducible con la menor variabilidad posible.

Dado que el objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral es el de diseñar un método para la cuantificación automática del grado de colagenización de la herida, se nos presentó la posibilidad de elegir entre diferentes técnicas de tinción posibles, tanto histoquímicas, como inmunohistoquímicas. Aunque existan técnicas más específicas para la identificación de los tipos de colágenos y distintos componentes de la matriz extracelular, se eligió la técnica del rojo sirio-ácido pícrico basada en el método de Llewellyn dado que esta permite teñir con diferentes matices también moléculas distintas de la colágena que contribuyen al ensanchamiento del intersticio normal. Por otro lado, la técnica del rojo sirio, al ser muy simple y convencional, presenta una elevada reproducibilidad en los matices de tinción y bajo coste, hechos que permiten aplicar de forma rutinaria el método diseñado. De todas formas, se ha podido utilizar esta tinción principalmente porque se consiguió, a través de métodos ópticos y de análisis de imagen, eliminar entre los elementos teñidos los componentes no específicos para nuestros objetivos, como los elementos celulares.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Como resumen de los datos estadísticamente significativos podemos decir que los ratones tratados con etanercept tienen, en el día dos, una menor reducción de la superficie de la herida, un mayor espesor del epitelio sano y una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio con respecto a los no tratados. En el día siete, los ratones tratados tienen una mayor longitud de la herida con un mayor espesor de su epitelio y una infiltración muscular más frecuente que en los ratones no tratados. Y en el día veinte, el análisis digital muestra una mayor colagenización de las heridas de los tratados con respecto a los no tratados.

Si como refieren los artículos sobre el papel del TNF alfa en la cicatrización de las heridas esta citoquina atrayese los neutrófilos a la misma en la fase inflamatoria (George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Manis MD, Christopher E. Attinger MD, 2006), deberíamos encontrar una mayor cantidad de infiltrado inflamatorio agudo en la herida del día dos de los ratones sin tratamiento, o lo que es lo mismo, una menor cantidad del mismo en la herida de los ratones en los que se antagoniza el efecto del TNF alfa. En nuestro estudio encontramos diferencias estadísticamente significativas que contradicen el papel teórico del TNF alfa en esta fase del proceso. Los resultados obtenidos muestran que los ratones tratados con anti TNF alfa presentan una cantidad de infiltrado inflamatorio en la herida mayor que en los controles en el día dos del experimento.

La función de los neutrófilos en esta fase es la liberación de enzimas proteolíticas y generación de radicales libres que esterilizarán la zona de la herida (George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Manis MD, Christopher E. Attinger MD, 2006). Podríamos pensar que el mayor acúmulo de neutrófilos se debiese a una mayor frecuencia de infección de las heridas de los ratones tratados con etanercept ya que se ha documentado una mayor incidencia de infecciones en pacientes tratados con anti TNF alfa. No hemos investigado la frecuencia de infecciones de una forma reglada pero no hemos encontrado mayor mortalidad ni complicaciones infecciosas como abscesos en los ratones tratados con etanercept. Además, suponiendo que la infección

complicase la cicatrización, si el mayor acúmulo de neutrófilos se debiese a ésta deberíamos haber encontrado dificultada la cicatrización en los ratones tratados. Sólo Mori y colaboradores estudiaron cantidad de neutrófilos en la herida de los ratones knockeados para el receptor p55 del TNF alfa y lo hicieron de una forma indirecta mediante actividad de la mieloperoxidasa. Encontraron que los ratones con receptor p55 para el TNF alfa tenían una mayor cantidad estimada de neutrófilos en la herida en el día uno y concluyeron la importancia del TNF alfa como quimiotáctico de neutrófilos (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002).

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de monocitos de la herida, en la angiogénesis, ni en el grado de fibrosis de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día dos, funciones en las que está implicado el TNF alfa en esta fase del proceso al atraer a la herida los monocitos que promoverán, a través del TNF alfa, la angiogénesis, la fibroplasia y la síntesis de metaloproteinasas que destruirán la matriz extracelular dañada (George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Manis MD, Christopher E. Attinger MD, 2006).

Creemos que de existir diferencias en la cantidad de monocitos, fibroblastos o vasos en la herida en función del tratamiento en la fase inflamatoria podríamos no haberlas encontrado por la falta de precisión en nuestro método de medición de estas variables, aunque puede ser también que el día señalado sea demasiado precoz dentro de la fase inflamatoria para detectar estas diferencias. Lo que sí es cierto es que el método utilizado para cuantificar el grado de colagenización en la herida es el más exacto de los disponibles hoy en día, y no hemos encontrado diferencias, por lo que nos decantamos porque se trate de una determinación precoz más que de un problema de medida. De nuevo, sólo Mori y colaboradores determinaron el número de monocitos en la herida de forma indirecta y exclusivamente en el día seis tras la realización de la herida, encontrando una mayor cantidad de monocitos en la herida de los ratones con receptor p55 para el TNF alfa y concluyendo otra vez la importancia del TNF alfa como quimiotáctico para las células de la inflamación (Mori R, Kondo T,

Ohshima T, et al. 2002). Hay que destacar que la determinación se realiza en el día seis, aunque nosotros no hemos encontrado diferencias en este tipo de células en el resto de los días.

En cuanto al resto de las variables comparadas en nuestro estudio en el día dos sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grado de curación de la herida, con una menor reducción del área de la herida en los ratones tratados, y en el espesor del epitelio sano, con un mayor grosor epitelial en la zona de tejido sano de los ratones tratados. Las diferencias que encontramos en la medición del grado de curación de la herida en la macroscopía no se ven reflejadas en la medición de la longitud de la herida en el mismo día, no encontrando diferencias en la comparación de esta última variable en el día dos. Si realizamos una correlación de Spearman para las variables grado de curación de la herida en el día dos y longitud de la misma en dicho día vemos que no existe una relación entre ambas estadísticamente significativa. Creemos que la hiperplasia de la costra de la herida en el día dos produce un sesgo en la medición del área de la herida en dicho día, ya que en el día siete ya sí existe una relación estadísticamente significativa entre el área de la herida y su longitud en dicho día. En los días quince y veinte las correlaciones de Spearman para dichas variables (grado curación y longitud de la herida) vuelven a ser no significativas y creemos que de nuevo se debe a un sesgo de la medición del análisis macroscópico en estos días. Si en el día dos la costra sobrepasaba los límites netos de la herida, en los días quince y veinte ya no se encuentra ninguna lesión costrosa, y medimos el área de la herida a grosso modo sobre una piel ya epitelizada y con anejos cutáneos. Por ello, creemos que el estudio microscópico es más exacto para medir el tamaño de la herida expresado como longitud de la misma.

Sólo Mori y colaboradores estudiaron el cierre macroscópico de la herida en el mismo estudio realizado con ratones deficientes para el receptor p55 del TNF alfa y lo hicieron en los días uno, tres, y seis, tras la realización de la herida. Encontraron que los ratones que no tenían receptor p55 para el TNF alfa tenían una reducción de la herida mayor a partir del día tres, concluyendo que el cierre macroscópico de la herida estaba acelerado en ausencia de TNF alfa (Mori R,

Kondo T, Ohshima T, et al. 2002). Nosotros no hemos encontrado diferencias en la reducción macroscópica de la superficie de la herida en el resto de los días, aunque parece existir tendencia a la significación estadística en el día quince, con un mayor grado de reducción de la herida en los ratones tratados. Las diferencias en el espesor del epitelio sano en el día dos podríamos interpretarlas como que los ratones en tratamiento con etanercept podrían tener un estado proliferativo mayor que los ratones no tratados. La comparación del epitelio de la herida no es posible en el día dos puesto que todavía no existe reepitelización de la misma en ninguno de los grupos, pero en el día siete sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas en el espesor del epitelio de la herida en función del tratamiento con un mayor espesor epitelial en los ratones tratados. Ninguno de los estudios referidos investigan espesor epitelial.

En la fase proliferativa de la cicatrización el TNF alfa contribuye a la epitelización de la herida, angiogénesis y formación del tejido de granulación (George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Manis MD, Christopher E. Attinger MD, 2006). Esta fase esta representada en nuestro estudio por el día siete del experimento y basándonos en el papel teórico de esta citoquina deberíamos encontrar una disminución en la epitelización, de la angiogénesis y de la cantidad de tejido de granulación de las heridas de los ratones tratados con respecto a los no tratados. En nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grado de epitelización, angiogénesis ni cantidad de tejido de granulación en función del tratamiento. De nuevo, como ocurría en el día dos, nuestro estudio vuelve a no cumplir el papel teórico del TNF alfa en la curación de las heridas, si bien las variables estudiadas en este día son cualitativas dicotómicas, por lo que, como hemos dicho con anterioridad puede que no sean lo suficientemente discriminativas para encontrar las diferencias.

Aunque no encontramos diferencias en el grado de reepitelización de la herida si que encontramos que el espesor del epitelio de la herida en los ratones

tratados es mayor con respecto a los no tratados con diferencias estadísticamente significativas, por lo que volvemos a plantearnos el posible papel del antagonismo del TNF alfa como proliferador epitelial.

Tenemos que destacar, por último en los datos del día siete, que los ratones tratados tienen una mayor longitud de la herida con respecto a los no tratados, y que la frecuencia de infiltración muscular por el infiltrado inflamatorio es mayor en los ratones que reciben tratamiento. Como hemos visto en los resultados la correlación de Spearman entre las variables grado de curación y longitud de la herida en el día siete tienen una correlación estadísticamente significativa, pero no encontramos diferencias en el cierre macroscópico de la herida. Como hemos citado sólo Mori y colaboradores investigaron el cierre macroscópico de la herida encontrando un mayor cierre en los ratones que no tenían receptor para el TNF alfa. En ninguno de los estudios se realiza medición microscópica de la misma.

Ya por último, en la fase de maduración y remodelado de la herida, el TNF alfa contribuiría a la formación de una matriz de colágeno con fibras más gruesas y orientadas de forma paralela a las líneas de estrés ([George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Manis MD, Christopher E. Attinger MD, 2006](#)). En nuestro estudio esta fase estaría representada por los días decimoquinto y vigésimo, midiendo el grado de colagenización de la herida mediante análisis digital de imagen. Encontramos diferencias estadísticamente significativas con un mayor grado de colagenización de la herida de los ratones tratados con respecto a los no tratados en el día veinte. No encontramos diferencias significativas en el resto de los días en el área de la herida ni en ninguno de ellos en la colagenización del tejido sano. Creemos que la ausencia de TNF alfa puede tener un papel fibrogenético de forma exclusiva en el área de la herida puesto que no encontramos una mayor colagenización en el tejido sano. podemos concluir que el tratamiento con etanercept aumenta el grado de colagenización de la herida en la fase de remodelado, lo que creemos consecuencia de un desbalance entre el TNF- α , antagonizado de forma

iatrogénica mediante la administración de etanercept, y TGF- β , citoquina antiinflamatoria y con poder fibroplásico, presente en condiciones fisiológicas en el proceso de curación de las heridas. Hay que recordar que el TNF alfa es uno de los estímulos para la síntesis de metaloproteinasas que destruirán el exceso de colágeno mientras que el TGF beta bloquearía la síntesis de las mismas (Jones et al, 1995). Este desbalance provocado mediante el bloqueo del TNF alfa con etanercept puede ser responsable del exceso de colagenización de la herida en los ratones tratados.

De los cuatro estudios citados, en tres de ellos se determinó grado de colagenización. Mori y colaboradores lo hicieron de una forma indirecta determinando cantidad de hidroxiprolina en la herida, encontrando una mayor cantidad de la misma en los ratones sin receptor para el TNF alfa en los días 3 y 6 tras la realización de la herida, sugiriendo un aumento de la colagenización en ausencia de TNF alfa (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002). No determinaron colagenización en fases más avanzadas del proceso de curación. Creemos que cuando hablan de colagenización en estos días se refieren a la migración de los fibroblastos a la herida para la formación del tejido de granulación. Nosotros no hemos encontrado diferencias en la cantidad de tejido de granulación en ninguno de los días, aunque puede que nuestra forma de medición del mismo no sea la más adecuada.

Maish y colaboradores estudiaron la colagenización de dos formas distintas: mediante contenido en hidroxiprolina de la esponja implantada en el abdomen de los animales y mediante birrefringencia con luz polarizada de tinciones con rojo sirio de la herida. Encontraron un descenso del depósito de colágeno en la herida y del contenido en hidroxiprolina de la esponja en las ratas sépticas que no aparecía en los animales sépticos con antagonismo del TNF alfa, sugiriendo que en el estado séptico existe una sobreproducción de TNF alfa que sería el responsable del empeoramiento de la cicatrización de las heridas, ya que al anular este exceso de citoquina la cicatrización era similar a los ratones sanos aunque sin llegar a igualarse. Concluyen que el TNF alfa tiene un importante papel inhibitorio de la curación de las heridas en una situación de exceso de TNF alfa como el estado séptico (Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al.

1998). Nuestro estudio no es comparable en este sentido ya que nosotros utilizamos ratones sanos en los que no existe un exceso de TNF alfa basal. Podría ser objetivo de un futuro estudio investigar la influencia del antagonismo del TNF alfa en la curación de las heridas en ratones con artritis inducida con colágeno.

El último estudio que investiga colagenización lo hace mediante análisis informático sobre una tinción de Van-Gienso complementándolo con el estudio de la apoptosis de fibroblastos. Lo realizan Rongkun y colaboradores con el objetivo de investigar si el TNF alfa está implicado en el empeoramiento de la cicatrización de los ratones diabéticos. Observan que los ratones diabéticos tienen un mayor nivel de TNF alfa y que la administración de etanercept disminuye la apoptosis de fibroblastos aumentando la densidad de los mismos en la herida equiparándolo a un ratón no diabético. Observan que esta disminución de la apoptosis también ocurre en los ratones no diabéticos aunque de una forma menos importante y sin llegar a aumentar la densidad de fibroblastos en la herida. Concluyen que en los ratones diabéticos existe un exceso de TNF alfa que se acentúa con la inoculación de bacterias y que en este contexto de sobreexpresión del TNF alfa al antagonismo del mismo mejorat la densidad de fibroblastos en la herida (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006).

Volvemos entonces nosotros a plantearnos la posibilidad de un mayor efecto del antagonismo del TNF alfa en las situaciones en las que exista sobreexpresión del mismo, con mayor interés en la investigación futura de la curación de heridas en ratones con artritis.

Aunque este último estudio no es comparable al nuestro por el diferente diseño metodológico hay que destacar que observan una disminución de la apoptosis de los fibroblastos también en los ratones sanos.

En resumen, nuestro estudio contradice el papel teórico del TNF alfa en la cicatrización de las heridas cutáneas en los días dos y veinte. En el primero, encontrando una mayor cantidad de neutrófilos en la herida de los ratones en los que se antagoniza el TNF alfa, y en el día veinte, siendo mayor el grado de colagenización de la herida en los ratones tratados.

Creemos que de los cuatro estudios experimentales disponibles los de Rongkun (Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. 2006) y Mori (Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. 2002) son los más comparables al nuestro por disponer de ratones sanos en su comparación y eliminar así la influencia de factores confusores como puede ser la sepsis, y, de acuerdo con sus resultados, afirmamos que el grado de colagenización de la herida de los ratones con una antagonización sistémica del TNF alfa es mayor con diferencias estadísticamente significativas. Este aumento podría ser más notable en una situación en la que existiese sobreexpresión de TNF alfa como en la artritis reumatoide, lo que nos lleva a plantearnos un futuro estudio en el que investigar la influencia de la antagonización del TNF alfa en la curación de las heridas cutáneas en ratones con artritis.

Encontramos además un posible papel proliferativo epitelial del antagonismo del TNF alfa en la curación de las heridas.

APLICACIÓN CLÍNICA

Sólo existe un estudio en la literatura actual que investigue la influencia del infliximab y del etanercept en pacientes sometidos a cirugía ortopédica. Este estudio fue realizado en 2004 por Bibbo y colaboradores quienes concluyeron que los inhibidores del TNF-alfa podrían administrarse de forma segura en el periodo perioperatorio sin aumento del riesgo de infecciones o complicaciones de la cicatrización (Bibbo C, Goldberg JW. 2004). Las complicaciones postoperatorias estudiadas en cuanto a cicatrización fueron retraso en la cicatrización y complicaciones en la cicatrización ósea, aunque el estudio no explica cómo se valoraron éstas. No se realizó estudio anatomopatológico de la herida.

El resto de los estudios en los que se aplicó un anti TNF alfa utilizado en la práctica clínica actual son los realizados en pacientes con Enfermedad de Crohn que estaban recibiendo infliximab y en pacientes sometidos a cirugía abdominal en contexto de dicha enfermedad, y todos avalan la eficacia de su aplicación tanto sistémica como local para la curación de las úlceras y fístulas asociadas a esta enfermedad y la no existencia de complicaciones con el uso concomitante de la terapia anti TNF alfa y la cirugía abdominal (Topstad DR, Panaccione R, Heine JA, et al. 2003; Colombel JF, Loftus EV, Tremaine WJ, et al, 2004; Regueiro M, Mardini H, 2003; van der Hagen SJ, Baeten CG, Soeters PB, Russek MG, Beets-Tan RG, van Gemert WG, 2005; Hyder SA, Travis SP, Jewell DP, McC Mortensen NJ, George BD, 2006; Brzezinski A, Armstrong L, Del Real GA, et al, 2002; Marchal L, D´Haens G, Van Assche G, et al, 2003). La aplicación local de infliximab adyacente al tracto fistuloso de la enfermedad de Crohn perianal se ha demostrado segura y que ayuda a la cicatrización de dichas fístulas (Poggioli G, Laureti S, Pierangeli F, Rizzello F, Ugolini F, Gionchetti P, Campieri M, 2005), así como la mejoría de la cicatrización de heridas crónicas con la aplicación tópica del dicho fármaco (Streit M, Belezny Z, Braathen LR, 2006).

En la práctica clínica se están suspendiendo los tratamientos con terapia anti TNF alfa en el periodo perioperatorio ante la falta de estudios que investiguen la influencia del mismo en el proceso de curación de las heridas. Creemos

importantes los resultados obtenidos con este proyecto de investigación, que aunque es un modelo experimental en ratones, es el primer estudio que investiga el efecto de estos tratamientos en la cicatrización. Sería conveniente realizar en un futuro un nuevo estudio experimental cuyo objetivo fuese investigar la influencia de estos tratamientos en la curación de heridas en un estado con sobreexpresión de TNF alfa como la artritis reumatoide en un modelo experimental de ratones con artritis reumatoide (González-Rey E, Chomy A, Varela N, O´Valle F, Delgado M. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. Arthritis Rheum. 2007 Feb;56(2):531-43) y otro que investigase el riesgo de infección de la herida en los ratones tratados.

CONCLUSIONES

1.- El modelo experimental en ratones SWISS-OF1 analizando en un periodo de 20 días superficie de la herida reducida a lo largo del proceso como variable de macroscopia, longitud de la herida, grosores epiteliales de la herida y de la zona sana, cantidad y tipo de infiltrado inflamatorio, grado de afectación muscular por el infiltrado inflamatorio y cantidad de tejido de granulación como variables de microscopia, y grado de colagenización de la herida y del tejido sano mediante análisis digital de imagen, es un diseño adecuado para el estudio del efecto del bloqueo del factor de necrosis tumoral alfa en la curación de las heridas puesto que analiza la influencia del mismo en cada una de las fases del proceso.

2.- El análisis digital de imágenes microscópicas y su aplicación específica al análisis del tejido de la herida constituye el método más preciso y reproducible para detectar diferencias en el grado de colagenización de las heridas al tratarse de un proceso de análisis automático en el que el investigador sólo interviene para elegir la zona a analizar.

3.- El estudio de la cicatrización de heridas en un modelo experimental en ratones SWISS-OF1 analizando en un periodo de 20 días, superficie de la herida reducida a lo largo del proceso como variable de macroscopia, longitud de la herida y grosores epiteliales de la herida y de la zona sana como variables de microscopia, todas ellas medidas con el programa AutoCAD2005[®], cantidad y tipo de infiltrado inflamatorio, grado de afectación muscular por el infiltrado inflamatorio y cantidad de tejido de granulación mediante análisis semicuantitativo en muestras de la herida visualizadas el microscopio óptico, y grado de colagenización de la herida y del tejido sano mediante análisis digital de imagen, permite concluir que el tratamiento con etanercept no empeora la cicatrización de heridas en ratones.

4.- El estudio del grosor epitelial medio de la herida y del tejido sano en los ratones tratados con etanercept y en sus controles no tratados con el programa

AutoCAD2005[®], permite concluir que el antagonismo del TNF- α en la fase precoz de cicatrización podría tener un papel proliferativo epitelial al encontrar, en los ratones tratados con etanercept, mayor grosor epitelial del tejido sano en la fase inflamatoria (día dos) y en la proliferativa (día siete) de la cicatrización.

5-. Tras el estudio del grado de colagenización de la herida con análisis digital de imagen podemos concluir que el tratamiento con etanercept aumenta el grado de colagenización de la herida en la fase de remodelado, lo que creemos consecuencia de un desbalance entre el TNF- α , antagonizado de forma iatrogénica, y TGF- β , citoquina antiinflamatoria y con poder fibroplásico, presente en condiciones fisiológicas en el proceso de curación de las heridas.

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, D., Shiwen, X., Black, C., et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 275: 15220, 2000.

Aderka, D, Engelmann, H, Maor, Y, et al. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 1992; 175:323.

Álvarez Gomez de Segura I, Tendillo Cortijo FJ. Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. p387. *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal.* Zúñiga JM, Tur Marí JA, Milocco SN, Piñeiro R. Mc Graw Hill-Interamericana. 2001.

Alvaro-Gracia, JM, Zvaifler, NJ, Firestein, GS. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Clin Invest* 1990; 86:1790.

Ander, SD, Cotas, AJ. How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL, and ATTACH. *Int J Cardiol* 2002; 86:123.

Annane D, Sebille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002, 288:862-871.

Arend, WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 1991; 88:1445.

Bacon PA, Stevens RJ, Carruthers DM et al. Accelerated atherogenesis in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2002, 1:338-347.

Bathon, JM, Martin, RW, Fleischmann, RM, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343:1586.

Bendtsen, K, Hansen, MB, Ross, C, et al. Cytokines and autoantibodies to cytokines. *Stem Cells* 1995; 13:206.

Bertolini, DR, Nedwin, GE, Bringman, TS, et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986; 319:516.

Bevilacqua, M., Pober, J., Wheeler, M., et al. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J. Clin. Invest.* 76: 2003, 1985.

Bibbo C, Goldberg JW. Infectious and healing complications after elective orthopaedic foot and ankle surgery during tumor necrosis factor-alpha inhibition therapy. *Foot Ankle Int.* 2004; 25(5):331-5.

Blumenauer, B, Judd, M, Cranney, A, et al. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; :CD004525.

Bosca MM, Pérez-Baylach CM, Solis MA, Anton R, Mayordomo E, Pons S, Minués M, Benagues A. Secondary amyloidosis in Crohn's Disease: treatment with tumour necrosis factor inhibitor. *Gut* 2006 Feb;55(2): 294-5.

Brandes, ME, Allen, JB, Ogawa, Y, Wahl, SM. Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest* 1991; 87:1108.

Bratt, J, Gyllenhammar, H. The role of nitric oxide in lipoxin A₂-induced polymorphonuclear neutrophil-dependent cytotoxicity to human vascular endothelium in vitro. *Arthritis Rheum* 1995; 38:768.

Brennan, FM, Maini, RN, Feldmann, M. TNF-alpha a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol* 1992; 31:293.

Brocq, O, Plubel, Y, Breuil, V, et al. Etanercept—infliximab switch in rheumatoid arthritis 14 out of 131 patients treated with anti TNFalpha. *Presse Med* 2002; 31:1836.

Brown, SL, Greene, MH, Gershon, SK, et al. Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum* 2002; 46:3151.

Brzezinski A, Armstrong L, Del Real GA, et al. Infliximab does not increase the risk of complications in the perioperative period in patients with Crohn's disease. *Digestive Disease Week, San Francisco, CA May 19-22, 2002, Abstract n° 104783.*

Busti AJ, Hooper JS, Amaya CJ, Kazi S. Effects of perioperative antiinflammatory and immunomodulating therapy on surgical wound healing. *Pharmacotherapy* 2005;25(11):1566-1591.

Caballero T, Pérez-Milena A, Masseroli M, O'Valle F, Salmerón FJ, Del Moral RMG, Sánchez-Salgado G. Liver fibrosis assessment with semiquantitative indexes and image analysis quantification in sustained-responder and non-

responder interferon-treated patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 2001; 34:740-747.

Carney, DH, Mann, R, Redlin, WR, et al. Enhancement of incisional wound healing and neovascularisation in normal rats by thrombin receptro-activating peptide. *J Clin Invest* 1992; 89:1469.

Catrina, AI, af Klint, E, Ernestam, S, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy increases synovial osteoprotegerin expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:76.

Colombel JF, Loftus EV, Tremaine WJ, et al. Early postoperative complications are not increased in patients with Crohn´s disease treated perioperatively with infliximab or immunosuppressive therapy. *Am J Gastroenterol* 2004;99:878-83.

Colombel JF, Loftus EV, Tremaine WJ, et al. Perioperative infliximab and/or immunomodulador therapy is not associated with increased postoperative complications in Crohn´s Disease. *Digestive Diseases Week, Orlando, FL; May 18-21, 2003. Abstract nº 102323.*

Cooney R, Iocono J, Maish G, Stanley Smith J, Ehrlich P. Tumor necrosis factor mediates impaired wound healing chronic abdominal sepsis. *J Trauma* 1997, 42:415-420.

Colville-Nash, PR, Scott, DL. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: Pathogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:919.

Cooper MS, Stewart PM. Corticoisteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 2003; 348:727-734.

Coursin DB, Word KE. Corticosteroid supplementation for adrenal insufficiency. *JAMA* 2002, 287:236-240.

Cusack C, Buckley C. Etanercept: Effective in the management of hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*. 2006 Apr;154(4):726-9.

Dayer, JM, Arend, WP. Cytokines and growth factors. *Textbook of Rheumatology*, 5th ed, Kelley, WN, Harris, ED Jr, Ruddy, S, et al. (Eds), WB Saunders, Philadelphia 1997.

Dayer, JM, Beutler, B, Cerami, A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; 162:2163.

De Bandt, M, Sibilia, J, Le Loet, X, et al. Systemic lupus erythematosus induced by anti-tumour necrosis factor alpha therapy : a French national survey. *Arthritis Res Ther* 2005 ; 7 :R545.

Diegelmann, R. Analysis of collagen síntesis. *Methods Mol. Med*. 78: 349, 2003.
Edward D Harris, Jr, MD, FRCP, MACR; Meter H Schur, MD. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *UpToDate* 2007.

Dinarello, CA. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:378.

Ekstrom, K, Hjalgrim, H, Bandt, L, et al. Risk of malignant lymphomas in patients with rheumatoid arthritis and in their first-degree relatives. *Arthritis Rheum* 2003; 48:963.

Dodane, V.; Chevalier, J.; Bariety, J.; Pratz, J.; Corman, B. Longitudinal study of solute excretion and glomerular ultrastructure in an experimental model of aging rats free of kidney disease. *Lab Invest* 1991; 64: 377-391.

Elliot, MJ, Maini, RN, Feldmann, M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1993 ; 36:1681.

Elliot, MJ, Maini, RN, Feldmann, M, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994; 344:1105.

Elliot, MJ, Maini, RN, Feldmann, M, et al. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994; 344:1125.

Edworthy, SM. Morning stiffness: Sharpening an old saw. *J Rheumatol* 1999: 26:1015.

Faber WR, Jensema AJ, Goldschmidt WF. Treatment of recurrent erythema nodosum leprosum with infliximab. *N Engl J Med*. 2006 Aug 17;355(7):739.

Feldmann, M, Brennan, FM, Maini, R. Cytokines in autoimmune disorders. *Int Rev Immunol* 1998 ; 17:217.

Fernandez-Botran, R. Soluble cytokine receptors: Their role in immunoregulation. *FASEB J* 1991; 5:2567.

Fernández-Nebro A, Ureña I, Irigoyen MV, García-Vicuña R. *Gut* 2006 Nov;55(11):1666-7.

FG Del Moral, F. O'Valle, M. Masseroli, RG Del Moral. Image analysis application for automatic quantification of intramuscular connective tissue in meat. *Journal of Food Engineering*. 2007;81(1):33-41.

Finckh, A, Huang, J, Liang, MH, et al. Are there differences in the ability of infliximab and etanercept to prevent structural joint damage in rheumatoid arthritis. An interim analysis from a population cohort (abstract). *Arthritis Rheum* 2003; 48:S333.

Firestein, GS. Naturally-occurring cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis. En: *Mechanisms and models in rheumatoid arthritis*. Henderson, B, Pettifer, R, Edwards, J (Eds), Academic Press, London 1995. P. 261.

Firestein, GS, Roeder, WD, Laxer, JA, et al. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 1989; 143:518.

Fleming, A, Crown, JM, Corbett, M. Early rheumatoid disease. I. Onset. II. Patterns of joint involvement. *Ann Rheum Dis* 1976; 35:357.

Forrest, L. Current concepts in soft connective tissue wound healing. *Br. J. Surg.* 70: 133, 1983.

Fu X, Tian H, Hsu S, et al. In vivo effects of tumor necrosis factor-alpha on incised wound and gunshot wound healing. *J Trauma* 1996, 40 (suppl 3):S140-S143.

Fujikawa K, Aratake K, Kawakami A, Aramaki T, Iwanaga N, Izumi Y, Arima K, Karachi M, Tamai M, Huang M, Nakamura H, Nishiura Y, Origuchi T, Ida H, Eguchi K. Successful treatment of refractory neuro-Behçet's disease with infliximab: a case report to show its efficacy by magnetic resonance imaging, transcranial magnetic stimulation and cytokine profile. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jan;66(1):136-7.

Gailit, J. X., Bueller, J., and Clark, H. R. Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins

alpha 1 beta 1 and alpha 5 beta 1 by human dermal fibroblasts in vitro. *J. Cell Physiol.* 169: 281, 1996.

Geboes K, Rutgeerts P, Opdenakker G, Olson A, Patel K, Wagner CL, Marano CW. Endoscopic and histologic evidence of persistent mucosal healing and correlation with clinical improvement following sustained infliximab treatment for Crohn's disease. *Curr Med Res Opin* 2005. Nov;21(11):1741-54.

George Broughton II MD PhD COL MC USA, Jeffrey E. Manis MD, Christopher E. Attinger MD. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun; 117 (7 Suppl): 12S-34S. Review.

Gerristen, ME, Kelley, KA, Ligon, G, et al. Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule-1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 1993; 36:593.

Gridley, G, McLaughlin, JK, kbom, A, et al. Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:307.

Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: Past, present, and future. *Adv. Skin Wound Care* 17: 24, 2004.

González-Rey E, Chomy A, Varela N, O'Valle F, Delgado M. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* 2007 Feb;56(2):531-43

Gossec, L, Dougados, M, Goupille, P, et al. Prognostic factors for remission in early rheumatoid arthritis : a multiparameter prospective study. *Ann Rheum Dis* 2004 ; 63:675.

Goodson N. Coronary artery disease and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2002, 14:115-120.

Halliwell, B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:505.

Hansen, KE, Hildebrand, JP, Genovese, MC, et al. The efficacy of switching from etanercept to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2004; 31:1098.

Heaney, ML, Golde, DW. Soluble cytokine receptors. *Blood* 1996; 87:847

Henry, G., and Garner, W. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg. Clin. North Am.* 83: 483, 2003.

Hyder SA, Travis SP, Jewell DP, McC Mortensen NJ, George BD. Fistulating anal Crohn's disease: results of combined surgical and infliximab treatment. *Dis Colon Rectum.* 2006 Dec;49(12):1837-41.

Iain B McInnes, FRCP, PhD. Role of cytokines in the immune system. *UpToDate* 2007.

Iain B McInnes, FRCP, PhD. Role of cytokines in rheumatic diseases. *UpToDate.* 2007.

Jacoby, RK, Jayson, MIV, Cosh, JA. Onset, early stages and prognosis of rheumatoid arthritis: A clinical study of 100 patients with 11 year follow-up. *Br Med J* 1973; 2:96.

Jones CL, Fecondo J, Kelynack K, Frobos J, Walker R, Becker G. Tissue inhibitor of the metalloproteinases and renal extracellular matrix accumulation. *Exp Nephrol* 1995; 3:80-86.

Kelley JT, Conn DL. Perioperative management of the rheumatic disease patient. Arthritis Foundation. Bull Rheum Dis 2002, 51.

Keystone, EC, Schiff, MH, Kremer, JM, et al. Once weekly administration of 50 mg etanercept (ENBREL®): a phase 3 clinical trial (abstract). Arthritis Rheum 2003; 48:S653.

Kikuchi, H, Tanaka, S, Matsuo, O. Plasminogen activator in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1987; 14:439.

Koch, A, Polverini, S, Kunkel, S, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science 1992; 258:1798.

Koch, AE, Harlow, LA, Haines, GK, et al. Vascular endothelial growth factor: A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. J Immunol 1994; 152:4149.

Kollias, G. Tumor necrosis factor: A specific trigger in arthritis. 51st Forum in Immunology 1994. p.342.

Konttinen, YT, Ainola, M, Valleala, H, et al. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1999; 58:691.

Konttinen, YT, Salo, T, Hanemaaijer, R, et al. Collagenase-3 (MMP-13) and its activators in rheumatoid arthritis: Localization in the pannus-hard tissue junction and inhibition by alendronate. Matrix Biol 1999; 18:401.

Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P., et al. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. Lab. Invest. 43: 47, 1980.

Kwon, HJ, Cote, TR, Cuffe, MS, et al. Case reports of heart failure after therapy with a tumor necrosis factor antagonist. *Ann Intern Med* 2003 ; 138 :807.

Lally, F, Smith, E, Filer, A, et al. A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3460.

Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. *N Engl J Med* 1997, 337:1285-1292.

Lane, P. H. Methods in laboratory investigation. Determination of mean glomerular volume in nephrectomy specimens. *Lab Invest* 1995; 72: 765-770.

Lee, DM, Weinblatt, ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; 358:903.

Licata G, Pinto A, Tuttolomondo A, Banco A, Ciccia F, Ferrante A, Triolo G. Anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody therapy for recalcitrant cerebral vasculitis in a patient with Behçet síndrome. *Ann Rheum Dis*. 2003 Mar;62(3):280-1.

Lineker, S, Badley, E, Charles, C, et al. Defining morning stiffness in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26:1052.

López Caballero, JJ; Peña, MC; De Federico, MJ. Coloraciones para fibras colágenas y elásticas del tejido conjuntivo. Coloraciones para sustancia amiloidea. En: García del Moral R, ed. *Laboratorios de Anatomía Patológica*. New-York-NY. Interamericana-Mc Graw-Hill, 1993: 181-182.

Madden, J. W., Smith, H. C. The rate of collagen synthesis and deposition in dehisced and resutured wounds. *Surg. Gynecol. Obstet*. 130: 487, 1970.

Maini, RN, Breedveld, FC, Kalden, JR, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody

combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1552.

Maish GO III, Shumate ML, Ehrlich HP, et al. Tumor necrosis factor binding protein improves incisional wound healing in sepsis. *J Surg Res* 1998, 78:108-117.

Marchal L, D'Haens G, Van Assche G, et al. Infliximab does not increase postoperative rates in patients with Crohn's Disease. *Digestive Diseases Week, Orlando, FL; May 18-21, 2003. Abstract nº 100519.*

Marcussen, N.; Nyengaard, J. R.; Christensen, S. Compensatory growth of glomeruli is accomplished by an increased number of glomerular capillaries. *Lab Invest* 1994; 70 (6): 868-874.

Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75, 1997.

Martínez-Montiel MP, Muñoz-Yague MT. Biologic therapies for chronic inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2006 Apr;98(4):265-91.

Masseroli, M. Manual del programa de análisis de imagen FIBROSIS HR para la cuantificación de la fibrosis intersticial. Granada: Master Diagnóstica. 1995.

Masseroli M, Caballero T, O'Valle F, Del Moral RMG, Pérez-Milena A, Del Moral RG. Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *Journal of Hepatology.* 2000;32:453-464.

Masseroli M, O'Valle F, Andujar M, Ramirez C, Gomez-Morales M, de Dios Luna J, Aguilar M, Aguilar D, Rodríguez-Puyol M, Del Moral RG. Design AND validation of a new image analysis method for automatic quantification of

interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Lab Invest.* 1998 May;78(5):511-22.

Massi, AT, Feigenbaum, SL, Kaplan, SB. Articular patterns in the early course of rheumatoid arthritis. *Am J Med* 1983; 75 (Suppl 6A): 26.

Miossec, P, Briolay, J, Dechanet, J, et al. Inhibition of the production of proinflammatory cytokines and immunoglobulins by interleukin-4 in an ex vivo model of rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 1992; 35:874.

Mohan, N, Edwards, ET, Cupps, TR, et al. Demyelination occurring during anti-tumor necrosis factor alpha therapy for inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* 2001 ; 44 :2862.

Molenaar, ET, Voskuyl, AE, Dinant, HJ, et al. Progression of radiologic damage in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission. *Arthritis Rheum* 2004 ; 50 :36.

Mooney DP, O'Reilly M, Gamelli RL. Tumor necrosis factor and wound healing. *Ann Surg* 1990, 211:124-129.

Moore, KW, O'Garra, A, de Waal Malefyt, R, et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:165.

Moreland, LW, Baumgartner, SW, Schiff, MH, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 1997; 337:141.

Moreland, LW, Cohen, SB, Baumgartner, SW, et al. Long-term safety and efficacy of etanercept in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28:1238.

Moreland, LW, Schiff, MH, Baugmgartner, SW, et al. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999; 130:478.

Moreso F, Seron D, Vitria J, Grinyo JM, Colome-Serra FM, Pares N, Serra J. Quantification of interstitial chronic renal damage by means of texture analysis. *Kidney Int* 1994; 46: 1721-1727.

Mori R, Kondo T, Ohshima T, et al. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J* 2002, 16:963-974.

Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348.

Mosmann, TR, Moore, KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today* 1991; 12:A49.

Nagashima, M, Asano, G, Yoshino, S. Imbalance in production between vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27:2339.

Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846, 2002.

Nikas, SN, Drosos, AA. Onercept Serono. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4:1369.

Noesis. Visilog 4.1 Programmer's guide. Velizy-France: Noesis SA, 1991a.

Noesis. Visilog 4.1 resource guide. Velizy- France: Noesis SA, 1991b.

Noesis. Visilog 4.1 User's guide. Velizy-France: Noesis SA, 1991c.

Norloka, K, Hara, M, Kitani, A, et al. Inhibitory effects of human recombinant interleukin-1^a and b on growth of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 145:969.

O'Connor, TM, O'Connell, J, O'Brien, DI, et al. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004; 201:167.

Petersen, K, Leff, R, Paulsen, G, et al. Etanercept in combination with sulfasalazine (SSA), hydroxychloroquine (HCQ), or gold in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) (abstract). *Arthritis Rheum* 2003; 48:S324.

Pierce, G., Mustoe, T., Altrock, B., et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J. Cell Biochem.* 45: 319, 1991.

Pinals, RS, Masi, AF, Larsen, RA, et al. Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 1982; 32:7.

PJW Venables, MA, MB BChir, MD, FRCP; RN Maini, BA, MB BChir, FRCP, FMedSci. Clinical features of rheumatoid arthritis. *UpToDate* 2007.

Pohlman, T., Stanness, K., Beatty, P., et al. An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J. Immunol.* 136: 4548, 1986.

Poggioli G, Laureti S, Pierangeli F, Rizzello F, Ugolini F, Gionchetti P, Campieri M. Local injection of infliximab for the treatment of perianal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 2005 Apr;48(4):768-74.

Prescribing Information, Etanercept (ENBREL®) Immunex Corporation, 11/3/98.

Prescribing Information, Etanercept (ENBREL®) Immunex Corporation, 5/12/99.

Prescribing Information, Etanercept (ENBREL®) Immunex Corporation, 10/10/00.

Puglisi RN, Doolin EJ, Hewitt CW. Morphometric analysis of rat renal allograft tolerance by computerized digital image processing. *Transplant Proc* 1995; 27: 555-556.

Rahier JF, Lion L, Dewit O, Lambert M. Regression of Sweeté Syndrome associated with Crohn's disease after anti-tumour necrosis factor therapy. *Acta Gastroenterol Belg.* 2005 Jul-Sep;68(3):376-9.

Rapala K, Laato M, Niinikoski J, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits wound healing in the rat. *Eur Surg Res* 1991, 23:261-268.

Rapala K, Peltonen J, Heino J, et al. Tumour necrosis factor-alpha selectivity modulates expression of collagen genes in granulation tissue. *Eur J Surg* 1997, 163:207-214.

Reguerio M, Mardini H. Treatment of perianal fistulizing Crohn's disease with infliximab alone or as an adjunct to exam under anesthesia with seton placement. *Inflamm Bowel Dis.* 2003 Mar;9(2):98-103.

Remuzzi, A.; Mazerska, M.; Gephardt, G. N.; Novick, A. C.; Brenner, B. M.; Remuzzi, G. Three-dimensional analysis of glomerular morphology in patients with subtotal nephrectomy. *Kidney Int* 1995; 48: 155-162.

Remuzzi, A.; Pergolizzi, R.; Mauer, M. S.; Bertani, T. Three-dimensional morphometric analysis of segmental glomerulosclerosis in the rat. *Kidney Int* 1990; 38: 851-856.

Remuzzi, A.; Puntorieri, S.; Alfano, M.; Macconi, D.; Abbate, M.; Bertani, T.; Remuzzi, G. Pathophysilogic implications of proteinuria in a rat model of progressive glomerular injury. *Lab Invest* 1992; 76: 572-579.

Rongkun L, Harbinder SB, Tesfahun D, Yugal B, Dana TG. Tumor necrosis factor- α mediates diabetes-enhanced apoptosis of matrix-producing cells and impairs diabetic healing. *Am J Pathol* 2006; 168:757-764.

Rosandich PA, Kelley JT, III and Conn DL. Perioperative management of patients with rheumatoid arthritis in the era of biologic response modifiers. *Curr Opin Rheumatol* 2004, 16:192-198.

Ruderman, EM, Markenson, JA. Ganulomatous infections adn tumor necrosis factor antagonist therapies: update through June 2002 (abstract). *Arthritis Rheum* 2003; 48:S241.

Rutgeerts P, DIamond RH, Bala M, Olson A, Lichtenstein GR, Bao W, Patel K, Wolf DC, Safdi M, Colombel JF, Lashner B, Hanauer SB. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodio treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn´s disease. *Gastrointest Endosc.* 2006 Mar;63(3):433-42.

Sabiston, D. *Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. 15th Ed. St. Louis, Mo.: Saunders, 1997. P. 209.

Saklatvala, J. Tumour necrosis factor stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986; 322:547.

Salem M, Tainsh RE Jr, Bromberg J, et al. Perioperative glucocorticoid coverage. A reassessment 42 years after emergence of a problem. *Ann Surg* 1994, 219: 416-425.

Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, Director E, Talbot TL, Sank A, Norton JA. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. *Ann Surg* 1991, 214:175-180.

Sari, I, Akar, S, Birlik, M, et al. Anti-Tumor Necrosis Factor- α -Induced Psoriasis. *J Rheumatol* 2006; 33:1411.

Sassy-Prigent C, Heudes D, Jouquey S, Auberval D, Belair MF, Michel O, Hamon G, Bariety J, Bruneval P. Morphometric detection of incipient glomerular lesion in diabetic nephropathy in rats. Protective effects of ACE inhibition. *Lab Invest* 1995; 73: 64-71.

Schafer AI. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol* 1995, 35:209-219.

Schreiber, S, Rutgeerts, P, Fedorak, RN, et al. A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 129:807.

Sheran, C., and Chiang, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution entrée for resoleemics. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 30: 69, 2004.

Shaw M, Mandell BF. Perioperative management of selected problems in patients with rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 1999, 25:623-638.

Shin, IS, Baer, AN, Kwon HJ, et al. Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes occurring with tumor necrosis factor alpha antagonist therapy. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1429.

Silman, A. Etanercept (Enbrel®) Safety Review, Amgen. Presentation to FDA Arthritis Advisory Committee. March 4, 2003.

Smola, H., Thiekotter, G., and Fusenig, N. Mutual induction of growth factor gene expression in by epidermal-dermal cell interaction. *J.Cell Biol.* 122: 417, 1993.

Soden, M, Rooney, M, Whelan, A, et al. Immunohistological analysis of the synovial membrane: Search for predictors of the clinical course in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991; 50:673.

Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003, 107:1303-1307.

Steed, PM, Tansey, MG, Zalevsky, J, et al. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* 2003; 301:1895.

Strand, V. OMERACT II: The biologics perspective. *J Rheumatol* 1995; 22:1415.

Streit M, Beleznay Z, Braathen LR. Topical application of the tumour necrosis factor-alpha antibody infliximab improves healing of chronic wounds. *Int Wound J.* 2006 Sep;3(3):171-9.

Tatem, L.; Hou, A.; Black, K. S.; Llull, R.; Hewitt, C. W. Digital image analysis of major histocompatibility complex class I and class II expression during site-specific immune suppression with topical cyclosporine. *Trasplant Proc* 1995; 27 (1): 344-345.

Topstad DR, Panaccione R, Heine JA, et al. Combined seton placement, infliximab infusion and maintenance immunosuppressives improve healing rate in fistulizing anorectal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003;46:577-83.

Trent JT, Kerdel FA. Tumor necrosis factor alpha inhibitors for the treatment of dermatologic diseases. *Dermatol Nurs.* 2005 Apr;17(2):97-107.

Ulfgren, AK, Andersson, U, Engstrom, M, et al. Systemic anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis down-regulates synovial tumor necrosis factor alpha synthesis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2391.

Valencia, X, Stephens, G, Goldbach-Mansky, R, et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 2006; 108:253.

Van der Hagen SJ, Baeten CG, Soeters PB, Russek MG, Beets-Tan RG, van Gemert WG. Anti-TNF-alpha (infliximab) used as induction treatment in case of active proctitis in a multistep strategy followed by definitive surgery of complex anal fistulas in Crohn's disease: a preliminary report. *Dis Colon Rectum* 2005 Apr;48(4):758-67.

Van Oosten, BW, Barkhof, F, Truyen, L, et al. Increases MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 1996; 47:1531.

Wahl, SM, Allen, JB, Wong, HL, et al. Antagonistic and agonistic effects of transforming growth factor.beta and IL-1 in rheumatoid synovium. *J Immunol* 1990; 145:2514.

Wei, N, Fiechtner, J, Boyle, D, et al. Synovial biomarker study of ISIS 104838, an antisense oligodeoxynucleotide targeting TNF-alpha, in rheumatoid arthritis (abstract), *Arthritis Rheum* 2003; 48:S133.

Weinblatt, MH, Kremer, JM, Bankhurst, AD, et al. A trial of etanercept, a TNF receptor: Fc fusion protein in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *N Engl J Med* 1999; 340:253.

Weisman, MH. What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety. *J Rheumatol Suppl* 2002; 65:33.

Williams, RO, Mason, LJ, Feldmann, M, Maini, RN. Synergy between anti-CD4 and anti.tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:2762.

Winthrop, KL, Siegel, JN, Jerez, J, et al. Tuberculosis associated with therapy against tumor necrosis factro alpha. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2968.

Witte, M., and Barbul, A. General principles of wound healing. *Clin. Noth Am.* 77:509, 1997.

Witte, M., and Barbul, A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg.* 183: 406, 2002.

Wolfe, F, Michaud, K, Anderson, J, Urbansky, K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis Rheum* 2004; 50:372.

Wolfe, F, Sharp, JT. Radiogrphic outcome of recent onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1571.

Xia, Y., Zhao, Y., Marcus, J., et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. *J. Pathol.* 188: 431, 1999.

Yager, D., and Nwomeh, B. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 7: 433, 1999.

Yasuda, M.; Miwa, A.; Kitagawa, M. Morphometric studies of renal lesion in Itai-Itai disease: Chronic cadmium nephropathy. *Nephron* 1995; 69: 14-19.

