

# Heparina en quemaduras de segundo grado profundo en un modelo murino

*Heparin in a deep second degree burn in a murine model*

Luis Sigler, Edgar Krotzsch, Fernando Bretón-Mora, Luis Padilla, Mauricio DiSilvio, Ricardo Álvarez-Jiménez

## Resumen

**Objetivo:** Demostrar los efectos de la heparina tópica e intraperitoneal en la recuperación de quemaduras de segundo grado en un modelo murino.

**Sede:** Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE.

**Diseño:** Estudio experimental.

**Análisis estadístico:** *t* de Student.

**Material y métodos:** Se estudiaron tres grupos de cinco ratas cada uno, a las que se les produjo una quemadura por escaldadura de segundo grado en el dorso, del 10% de la superficie corporal. Al grupo control se le aplicaron 5 ml de solución salina en la zona quemada al día durante 30 días. Al segundo grupo se le aplicó heparina en la zona quemada y un tercer grupo recibió heparina intraperitoneal y solución salina en la quemadura. Se obtuvieron biopsias de la zona quemada, se realizaron determinaciones de fosfatasa alcalina y se tomaron fotografías en los días 0, 15 y 30 posteriores a la quemadura. Se demostró, por biopsia, el grado de la zona quemada similar en los tres grupos.

**Resultados:** Cuando las ratas recibieron heparina, tópica o en el peritoneo, tuvieron una curación más temprana (50% más rápida) y con menos cicatrices que el grupo control. Los niveles de fosfatasa alcalina mostraron una respuesta inflamatoria mayor en el grupo control. Todas las diferencias fueron significativas  $P < 0.05$ .

**Conclusiones:** La heparina administrada en el peritoneo o de manera tópica en grupos similares de ratas con quemaduras de segundo grado indujo cicatrización en la mitad del tiempo con menos inflamación y mejor recuperación epitelial en comparación con

## Abstract

**Objective:** To demonstrate the effects of heparin topically or intraperitoneally applied on the recovery from second degree burns in a murine model.

**Setting:** Third level health care center Centro Médico Nacional “20 de Noviembre”, ISSSTE.

**Design:** Experimental study.

**Statistical analysis:** *t* de Student.

**Material and methods:** We studied three groups of five rats each in which a second-degree thermal burn was produced on their back, 10% of the body surface. The control group received 5 ml of saline solution on the burned area per day during 30 days; the second group received heparin and the third group received intraperitoneally applied heparin and saline solution applied topically on the burn. A biopsy of the burned area was obtained, alkaline phosphatase was determined, and photographs were taken at days 0, 15, and 30 after causing the burn. Biopsy demonstrated a similar dermal burn degree in the three groups.

**Results:** When rats received heparin, either topically or peritoneally, they had a faster healing (50% faster) and with less scars than the control group. Level of alkaline phosphatase revealed a higher inflammatory response in the control group. All differences were significant at  $P < 0.05$ .

**Conclusions:** Heparin, administered either in the peritoneum or topically in similar groups of rats with second degree burns, induced wound healing in half the time with less inflammation, and better epithelial recovery than treatment with saline solution without heparin.

www.medigraphic.org.mx

Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE y Laboratorio de Tejido Conjuntivo Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados del Instituto Nacional de Rehabilitación

Recibido para publicación: 14 Diciembre 2009

Aceptado para publicación: 20 Septiembre 2010

Correspondencia: Acad. Dr. Luis Sigler

Paseo Tijuana 406-601, Zona Río, Tijuana BC. 22320,

E-mail: siglermo@yahoo.com.mx

Este artículo puede ser consultado en versión completa en: <http://www.medigraphic.com/cirujanogeneral>

**ratas quemadas de modo similar tratadas con solución salina sin heparina.**

**Palabras clave:** Heparina, quemaduras, cicatrización, modelo murino.

**Cir Gen 2011;33:86-90**

**Key words:** Heparin, burns, wound healing, murine model.

**Cir Gen 2011;33:86-90**

## Introducción

Como resultado de una exposición térmica directa, las células y tejidos se lesionan y se producen fenómenos de isquemia secundaria, desnaturalización de proteínas, así como modificación del metabolismo celular. Esta destrucción es causada en parte por alteraciones en la circulación sanguínea como estasis, trombosis, isquemia e infartos, activando los mediadores inflamatorios que desencadenan una cadena de destrucción progresiva. Además, el tamaño y la profundidad de la quemadura pueden motivar complicaciones pulmonares, problemas intestinales, infecciones y otras fallas orgánicas. Estas heridas cicatrizan de modo lento y defectuoso y con frecuencia generan contracturas y cicatrices anormales.

Desde hace más de 60 años se ha demostrado que la heparina es útil en el tratamiento de las quemaduras, pues además de su propiedad anticoagulante tiene cualidades angiogénicas, antiinflamatorias, analgésicas y regenerativas del colágeno.<sup>1-14</sup> Los primeros estudios, en perros, cerdos y ovejas, en los que se utilizó heparina de un modo experimental, demostraron que se obtenían mejores resultados en el tratamiento de las quemaduras, por lo que se amplió el uso a seres humanos para tratar quemaduras de segundo y tercer grado; se observó mejoría notable al reducir el uso de analgésicos, mejoría del bienestar del paciente, reducción de la frecuencia de infecciones y mejoría en el tiempo de reparación tisular. También se demostró la utilidad de la heparina al usarla por vía sistémica y por vía tópica, en irrigación directa sobre la superficie quemada y en otro tipo de heridas.<sup>15-18</sup>

El objetivo de este trabajo es demostrar los efectos terapéuticos de la heparina en la recuperación de quemaduras de segundo grado profundo en un modelo murino al comparar la cicatrización producida al aplicar la heparina intraperitoneal o tópica.

## Material y métodos

Se realizó un estudio prospectivo, experimental, comparativo en modelo animal, previa aprobación de los Comités de Investigación y Ética del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” del ISSSTE en la Ciudad de México.

A quince ratas Wistar con peso promedio de 200 g se les anestesió con una combinación de ketamina-xilacina, a dosis de 0.2 ml intramuscular de ketamina (Ketaset<sup>®</sup>) y 0.1 ml intraperitoneal de xilacina (Rompum<sup>®</sup>). Posteriormente los animales fueron rasurados en un área aproximada de 9 cm<sup>2</sup> de la zona interescáculo-vertebral. Cada rata fue colocada en posición supina sobre un dispositivo de hule, tipo hamaca, con una perforación ovoide de 2.5 cm<sup>2</sup> la cual limitaba la superficie a quemar.

Así, uno a uno los sujetos de experimentación fueron sumergidos en un baño de agua a 90 °C (Poly Science<sup>®</sup>) durante cinco segundos, exponiendo sólo el área de la piel rasurada con lo que se provocó una quemadura de segundo grado profundo, equivalente al 10% de la superficie corporal total (**Figura 1**). Después fueron colocados en jaulas individuales y todos recibieron agua con una preparación de paracetamol a dosis de 4 mg/100 g de peso y alimento *ad libitum*.

Integramos tres grupos con cinco ratas cada uno. El grupo control recibió irrigación diaria de la herida con 5 ml de solución salina isotónica. El segundo grupo recibió irrigación tópica con una solución de heparina sobre la quemadura, utilizando la mezcla de 2 ml de solución de heparina (1,000 UI/ml) y 3 ml de solución salina. El tercer grupo recibió 0.5 ml de heparina por vía peritoneal, usando una solución que contenía 0.2 ml de heparina (1,000 UI/ml) diluidos en 4.8 ml de solución salina.

Se llevó un registro diario para cada animal con los siguientes parámetros: estado anímico, ingesta de agua y alimento, presencia de micciones y evacuaciones. En la lesión se observó la presencia de flictenas, sangrado, infección, característica de la costra, desprendimiento de la misma y muerte del animal en su caso. También llevamos un registro del área quemada copiándola en una plantilla de acetato y se obtuvieron fotografías en los días 0, 7, 14, 21 y 30 (**Figura 2**).

Se obtuvieron biopsias de la superficie quemada inmediatamente después de ocasionar la lesión (**Figura 3**). Las biopsias fueron procesadas por congelación y a



**Fig. 1. Método para producir quemaduras en el dorso de la rata por inmersión en agua caliente.**



**Fig. 2.** Plantilla de acetato para medir el área quemada.



**Fig. 4.** Rata del grupo control a 30 días postquemadura. Se observa la costra aún adherida.



**Fig. 3.** Sitio de la biopsia en el día 0 (día de la quemadura).



**Fig. 5.** Tratamiento con heparina tópica. Aspecto después de 30 días de la quemadura. La costra está ausente y la epitelización es adecuada.

los criocortes de  $6 \text{ m}\mu$  de espesor se les realizó tinción con hematoxilina y eosina para valorar el infiltrado inflamatorio y la morfología general. También se realizó una prueba histoquímica para valorar la actividad de la fosfatasa alcalina extracelular como marcador inflamatorio.<sup>20</sup>

El análisis estadístico se realizó por medio de  $t$  de Student con nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

## Resultados

En los tres grupos los animales tuvieron una ingestión de alimentos así como micciones y evacuaciones adecuadas. En ningún caso se observó la formación de flictenas. Se presentó infección auto-recuperada en un animal del grupo control, en otro del grupo de heparina intraperitoneal y en dos del grupo de heparina tópica. Cuando se desprendió la costra o se tomaron biopsias, hubo sangrado mínimo en las ratas que recibieron heparina. Falleció una rata del grupo control al día 20 postquemadura. En el resto de los animales no hubo complicaciones.

Los dos grupos tratados con heparina tuvieron una recuperación más rápida que los del grupo control (**Figuras 4-6**). El grupo de heparina tópica registró los mejores resultados al reducir de modo notable el tiempo de reparación, no sólo a nivel del tejido conjuntivo, sino también en la proporción de anexos cutáneos en el área lesionada, que se caracterizó por una cicatriz casi imperceptible. En cuanto al desprendimiento de la costra, también en este grupo se obtuvieron los tiempos más cortos. El grupo que recibió heparina por vía peritoneal presentó un tiempo de reepitelización más breve que el grupo control y la reconstrucción pilosa también fue completa, pero las heridas no lograron su recuperación al tiempo que lo hicieron los animales con heparina tópica.

En el día cero, cuando se realizó la quemadura y toma de la primera biopsia, las heridas tenían la misma característica en los tres grupos: una lesión del 10% de la superficie corporal de segundo grado profundo, en el área interescáculo-vertebral, ovoide, con toma



**Fig. 6.** Tratamiento con heparina por vía intraperitoneal. Aspecto al día 30, después de la quemadura. No hay costra. Epitelización adecuada. Crecimiento del pelo

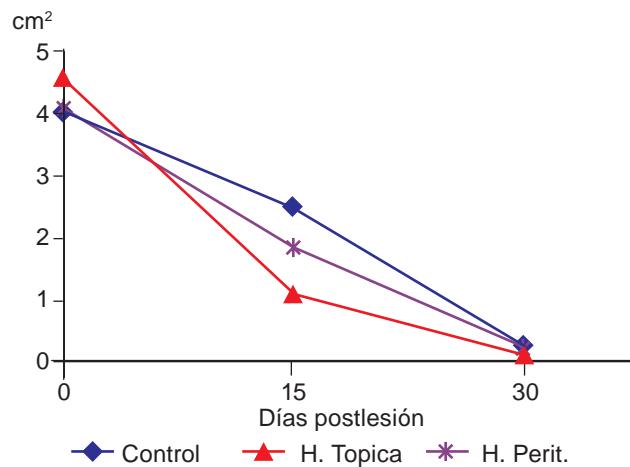
de biopsia en el área central y con sangrado mínimo. En el día siete la recuperación fue similar en los tres grupos: las lesiones en los animales tratados con heparina eran más pequeñas pero sin diferencia en el área entre los animales que recibieron heparina tópica o intraperitoneal. Al día 14, el grupo control apenas iniciaba la formación de una costra y la herida medía lo mismo que al inicio del estudio, mientras que en los grupos tratados con heparina en ese momento se comenzó a desprender la costra y las lesiones tenían un área menor. Los animales que recibieron heparina tópica evolucionaron mejor (**Figura 7**).

Para el día 21, el grupo control desarrolló una costra bien formada, pero aún adherida en su totalidad. En contraste, las ratas que recibieron heparina tópica desprendieron la costra y mostraban un proceso de reparación excelente, con una reducción importante de la lesión. El grupo que recibió heparina intraperitoneal mostró un 65% de desprendimiento de la costra y reducción del tamaño de la lesión, aunque en menor proporción que los animales que recibieron heparina tópica. La regeneración pilosa fue satisfactoria en los tres grupos, fue más evidente en los tratados con heparina.

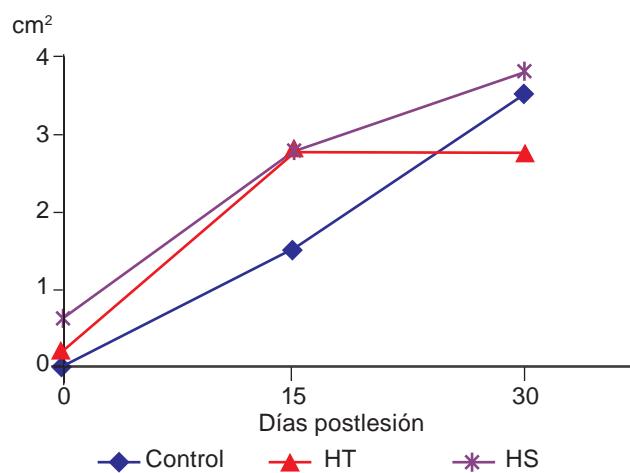
En el día 30 el grupo control se encontraba en fase de resolución, con disminución del área quemada al 60% del tamaño original. Los animales tratados con heparina tópica mostraron una resolución total, con regeneración pilosa y sólo una línea eritematosa en el límite de la lesión. El grupo con heparina intraperitoneal se recuperó en un 90% en relación al día cero.

La actividad de la fosfatasa alcalina extracelular, como indicadora de un proceso inflamatorio, en el día 15, mostró en las ratas del grupo control una elevación al doble en relación a los grupos tratados con heparina (**Figura 8**).

Todas las comparaciones tuvieron una significancia estadística entre los grupos de heparina tópica e intraperitoneal con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 7.** Reducción del área de lesión, más rápida en el grupo HT de heparina tópica y en el de heparina sistémica (intraperitoneal) que en el grupo control.



**Fig. 8.** Al día 15, la proporción de fosfatasa alcalina extracelular es tres veces menor en los grupos que recibieron heparina (heparina tópica y heparina sistémica, HT y HS) en contraste con el grupo control (Ctrl), indicando mayor efecto inflamatorio en los controles.

## Discusión

Según su extensión, profundidad y localización, las quemaduras pueden ser desde triviales hasta causar la muerte del paciente; ocasionan cicatrices visibles que afectan el desarrollo biopsicosocial del enfermo, además de causar otros problemas. Para su tratamiento, existen varios protocolos, pero en general en los primeros dos días se sigue el utilizado desde hace años para favorecer la hidratación adecuada. Las medidas locales varían y pueden ser cerradas o abiertas, con o sin remoción de tejido necrótico por excisión o dermoabrasión seguidos de cubiertas cutáneas diversas según el caso.

Con frecuencia se usa heparina sistémica como profilaxis de enfermedad tromboembólica venosa, pero no se ha considerado que, además del beneficio profiláctico, tiene efectos sobre el dolor local y la cicatrización de la

lesión. Aunque hace más de seis décadas ha habido interés por emplear heparina en los quemados, existe resistencia para usarla. En México, Reyes y colaboradores<sup>15</sup> presentaron una experiencia favorable con el uso de heparina tópica en pacientes quemados, e incluso también la han usado en pacientes con quemaduras eléctricas.

Existe un acuerdo generalizado de que la heparina tiene efectos útiles en el tratamiento de quemaduras por inhalación y en quemaduras esofágicas después de la ingestión de cáusticos, donde ayuda a evitar secuelas cicatriciales en el esófago; también ha sido utilizada en otras heridas.<sup>11,16-23</sup>

En el presente estudio confirmamos que el uso de heparina tópica o por vía intraperitoneal en animales de experimentación, reduce el tiempo de cicatrización, epitelización, eliminación de la costra y mejores resultados a 30 días que en aquellos animales en los que se aplicó solución salina como control.

### Agradecimientos

Al matemático Jorge Galicia por el procesamiento estadístico.

Al Técnico Químico Marco A. Ávila por su participación en los estudios de laboratorio.

### Referencias

1. Alrich EM. The effect of heparin on the circulating blood plasma and proteins in experimental burns. *Surgery* 1949; 25: 676-680.
2. McCleery RS, Schaffarzick WH, Light RA. An experimental study of the effect of heparin on local pathology of burns. *Surgery* 1949; 26: 548-564.
3. Elrod PD, McCleery RS, Ball CO. An experimental study of the effect of heparin on survival time following lethal burns. *Surg Gyn Obstet* 1951; 92: 35-42.
4. Dolowitz DA, Dougherty TF. The use of heparin as an anti-inflammatory agent. *Laryngoscope* 1960; 70: 873-884.
5. Saliba MJ Jr. Heparin in the treatment of burns. *JAMA* 1967; 200: 650-651.
6. Saliba MJ Jr., Griner LA. Heparin efficacy in burns. I. Significant early modifications of experimental third degree guinea pig thermal burn and ancillary findings. A double blind study. *Aerosop Med* 1970; 41: 179-87.
7. Saliba MJ Jr. Heparin efficacy in burns. II. Human thermal burn treatment with large doses of topical and parenteral heparin. *Aerosop Med* 1970; 41: 1302-1306.
8. Saliba MJ Jr, Dempsey WC, Kruggel JL. Large burns in humans. Treatment with heparin. *JAMA* 1973; 225: 261-269.
9. Saliba MJ Jr, Saliba RJ. Heparin in burns. Dose related and dose dependent effects. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 33: 113-23.
10. Carr J. The anti-inflammatory action of heparin: heparin as an antagonist to histamine, bradykinin, and prostaglandin E1. *Thromb Res* 1979; 16: 507-516.
11. Ehrlich HP, Griswold TR, Rajaratnam JB. Studies on vascular smooth muscle cells and dermal fibroblasts in collagen matrices. Effects of heparin. *Exp Cell Res* 1986; 164: 154-162.
12. Saliba MJ Jr. The effects and uses of heparin in the care of burns that improves treatment and enhances the quality of life. *Acta Chir Plast* 1997; 39: 13-16.
13. Cribbs RK, Luquette MH, Besner GE. Acceleration of partial-thickness burn wound healing with topical application of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). *J Burn Care Rehabil* 1998; 19: 95-101.
14. Cen Y, Luo P, Liu XX. The effect of heparin on wound healing of second-degree burned rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2000; 14: 264-267.
15. Reyes AE, Aztiazaran JA, Chávez CC, Jaramillo F, Saliba MJ Jr. Burns treated with and without heparin: Controlled use in a thermal disaster. *Ann Burns Fire Disasters* 2001; 14: 183-191.
16. Saliba MJ Jr. Heparin in the treatment of burns: a review. *Burns* 2001; 27: 349-358.
17. Matzsch T, Bergqvist D, Blomquist P, Jiborn H. Influence of standard heparin or low molecular weight heparin on healing of abdominal wounds and colonic anastomoses in rats. *Acta Chir Scand* 1987; 153: 593-598.
18. Galvan L. Effects of heparin on wound healing. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 1996; 23: 224-226.
19. Ehrlrich HR, Griswold TR, Rajaratnam JBM. Studies on vascular smooth muscle cells and dermal fibroblasts in collagen matrices. Effects of heparin. *Exp Cell Res* 1986; 164: 154-62.
20. Suárez A, Salgado RM, Apis Z, Krötzsch E. Inducción del tejido de granulación por pasta de Lassar vs colágeno-polivinilpirrolidona en úlceras por insuficiencia venosa. *Cirugía Plástica* 2004; 141: 5-13.
21. Young E. The anti-inflammatory effects of heparin and related compounds. *Thromb Res* 2008; 122: 743-752.
22. Barreto MG, Costa Mda G, Serra MC, Afune JB, Praxedes HE, Pagani E. Comparative study of conventional and topical heparin treatments for burns analgesia. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 51-55.
23. Toon MH, Maybauer MO, Greenwood JE, Maybauer DM, Fraser JF. Management of acute smoke inhalation injury. *Crit Care Resusc* 2010; 12: 53-61.