

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

**Obtención, caracterización y evaluación de nitroderivados de heparina
y heparinas de bajo peso molecular para el tratamiento de úlceras**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M^a Teresa Gómez Ochoa

Director

Guillermo Franco Rodríguez

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Obtención, caracterización y evaluación
de nitroderivados de heparina y heparinas
de bajo peso molecular para el
tratamiento de úlceras.

TESIS DOCTORAL

M^a Teresa Gómez Ochoa

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Dpto de QUÍMICA ORGÁNICA y FARMACÉUTICA

***Obtención, caracterización y evaluación de
nitroderivados de heparina y heparinas de bajo
peso molecular para el tratamiento de úlceras.***

TESIS DOCTORAL

M^a Teresa Gómez Ochoa

Madrid, 2017

DIRECTOR: Dr. Guillermo Franco Rodríguez

Programa de doctorado: QUÍMICA MÉDICA

AGRADECIMIENTOS POR LA FINANCIACIÓN RECIBIDA

Esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente financiada a través de las siguientes entidades: Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial CDTI con N° Expediente IDI-20110747, Agencia de Innovación y Desarrollo de Andalucía IDEA con N° Expediente 430713, Corporación Tecnológica de Andalucía CTA N° Expediente 06059, Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial CDTI Programa CENIT N° Expediente CEN-20091021 consorcio Ceyec.

Quiero expresar mi agradecimiento,

A Iván López-Belmonte, por su apoyo, y por darme la oportunidad de realizar esta tesis y llegar hasta aquí.

A Guillermo, por sus enseñanzas, por su ayuda, por su confianza y por su amistad.

A Jose Carlos Menéndez, por su disponibilidad y su inestimable ayuda.

A mis compañeros de laboratorio, Miguel, Mónica, Susana, Antonio y Julia, por estar en el día a día, y especialmente a Jose y Gema, cuyo trabajo y colaboración son una parte importante de esta tesis.

A mis compañeros de Departamento de I+D, Ibon, Elena, Marisa, Lourdes y Jesús, por su disponibilidad y por todos los buenos ratos que hemos trabajado juntos.

A mi gente de Rovi, Pilar, Concha, Lola, Angelines y Pilar, porque desde hace mucho tiempo forman parte de mi familia, por su cariño incondicional.

A mis amigas, Marian, Mar y Angelines, por todo el cariño que me dan y porque con el paso del tiempo ya son más hermanas que amigas.

A todos, muchas gracias.

*A la memoria de mis padres,
que aunque ya no están siguen estando presentes cada día,
a mis hermanos y a mi familia,
y con un cariño especial a mi hija Patricia, mi ejemplo y mi motor.*

*"Los hombres geniales empiezan grandes obras,
los hombres trabajadores las terminan".*

Leonardo da Vinci

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AT III	Antitrombina III
BEMI, BP	Bemiparina
BEMP	2- <i>tert</i> -butilimino-2-dietilamino- 1,3-dimetil-perhidro-1,3,2-diazafosforina
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
C.A.I.	Centro de Apoyo a la Investigación
CCMIJU	Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón
CMCNa	Carboximetil celulosa sódica
DE	Disfunción endotelial
DM	Diabetes mellitus
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
F-IIa	Factor IIa
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
F-Xa	Factor Xa
GAGs	Glicosaminoglicanos
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
HE	Hematoxilina-eosina
HMBPM	Heparina de muy bajo peso molecular
HNF	Heparina no fraccionada
HPLC	Cromatografía de alta resolución
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón

ABREVIATURAS

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IM	Vía intramuscular
IR	Índice de refracción, infrarrojo
IV	Vía intravenosa
JPG	Joint Photographic Experts Group
MA	Membrana amniótica
mtALDH	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial
Mp	Pico máximo
Mw	Peso molecular medio
NEF	Nikon Electronic Format
NOS	Óxido nítrico sintasa
PAGEs	Productos avanzados de glicosilación
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pNA	<i>para</i> -nitro anilina
PRP	Plasma rico en plaquetas
RhPDGF-BB	Factor de Crecimiento plaquetario BB humano recombinante
RID	Detector de índice de refracción
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SCCED	Defecto corneal superficial crónico
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
STZ	Estreptozotocina

ABREVIATURAS

TCM	Tinción tricrómica de Masson
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UEX	Universidad de Extremadura
Ve	Volumen de elución

ÍNDICE

1. Summary	25
2. Resumen	33
3. Introducción	41
4. Síntesis general de compuestos	57
4.1. Materiales, Reactivos y Métodos:	60
4.1.1. Materiales y Reactivos:	60
4.1.2. Métodos:	60
4.1.2.1. Espectrometría de infrarrojo	60
4.1.2.2. Cromatografía de exclusión molecular, GPC:	62
4.1.2.3. Actividades anti Factor-Xa y anti Factor-IIa	63
4.1.2.4. Resonancia Magnética Nuclear	64
4.1.2.5. Análisis elemental	65
4.2. Obtención de los compuestos:	67
4.2.1. Preparación de Heparinatos de Benzalconio	67
4.2.2. Nitroderivados por nitración con Nitrato de Acetilo	69
4.2.3. Nitroderivados por Esterificación	81
4.2.3. Despolimerización en presencia de una base de Fosfaceno	88
4.2.4. Preparación de formulaciones Tópicas	91
5. Estudios <i>in vivo</i>	99
5.1.- Condiciones generales de los estudios	99
5.1.1- Bienestar Animal	99
5.1.2- Legislación BPL	100
5.1.3- Materiales y Equipos	100
5.1.3.1. Equipos e instalaciones	100
5.1.3.2. Fármacos y Material Fungible	103
5.1.4- Animales en estudio	104
5.1.5- Condiciones de alojamiento	104
5.1.6- Evaluación de los resultados	106

ÍNDICE

5.1.7- <i>Valoración histológica de las heridas</i>	107
5.2.- Compuestos utilizados en los estudios.....	110
5.3.- Estudios sobre úlceras diabéticas.....	111
5.3.1- <i>Estudio código SIF 109-1</i>	113
5.3.2- <i>Estudio código SIF 109-6</i>	127
5.3.3- <i>Estudio código SIF 109-7</i>	140
5.3.4. <i>Estudio código SIF 210-1, Grupos de estudio I, II y III</i>	154
5.4.- Estudios de úlceras por quemadura	192
5.4.1. <i>Estudio código SIF 210-1, grupos VI y VII</i>	192
5.5.- Estudios de úlceras corneales.....	213
5.5.1. <i>Estudio SIF 110-1</i>	213
6. Conclusiones.....	255
6.1. Estudio código SIF 109-1.....	255
6.2. Estudio código SIF 109-6.....	256
6.3. Estudio SIF 109-7.....	257
6.4. Estudio código SIF 210-1, Grupos de estudio I, II y III.....	258
6.5. Estudio código SIF 210-1, grupos VI y VII.....	259
6.6. Estudio SIF 110-1.....	260
6.7. Conclusiones generales	261
7. Bibliografía	265

SUMMARY

1. Summary

Title

Synthesis, characterization and evaluation of nitroderivatives of heparin and low-molecular weight heparins for the treatment of ulcers.

Introduction

Ulceration of the lower limbs represents a pathology with a high incidence and prevalence, affecting 1-3% of the population in developed countries. To the social problems derived from the disability, the high health cost generated by the treatment of these patients is added. When the patients affected are young, the negative implications in the quality of life, must be added to the loss of working days, thus increasing the social cost that this condition generates. The etiology of most ulcers is vascular, mainly due to venous insufficiency (80-90%), although they may also be of arterial origin.

Another pathology highly associated with this type of ulceration is diabetes, with a 50% incidence in patients, with 15% suffering from ulcer complications that result in the so-called diabetic foot syndrome. 90% of non-traumatic amputations are attributed to this cause, which increases morbidity in this pathology, since it is estimated that 50% of diabetic patients suffering from amputation require a second amputation in the following 5 years, reducing their survival to 40%. However, certain ulcers also respond to particular causes such as arterial occlusive disease or diabetes, as well as to tumor diseases, haematological causes, specific infections or traumatic processes. Although a correct etiological treatment can be performed and there is a wide variety of dressings available today, the percentage and speed of healing remain low. So there is no effective pharmacological treatment for diabetic foot ulcers. The products used consist of bandages, dressings and gels to hydrate the wound.

On the other hand, peripheral retinopathy is another pathology frequently associated with diabetes, both type I and type II, which can lead to affectations not only to the retina but also to the cornea and cranial nerves. Diabetic patients with diabetic retinopathy have a high risk of developing corneal disorders such as epithelial defects, susceptibility and ulcerations. This is associated with alterations in the composition of the basement membrane of the corneal epithelium, such as the decrease in entactin, laminin-1 and laminin-10, integrins $\alpha3\beta1$ (VLA-3). These alterations are more pronounced in the case of diabetic retinopathy than in non-diabetic retinopathy. It is believed that these alterations may be due to abnormal expression of growth factors in the diabetic eye.

SUMMARY

A topical treatment containing human platelet growth factor, whose efficacy is discrete and limited to small ulcers, has been marketed. In addition, its use has been associated with a possible carcinogenic adverse effect. Other possible treatments have a controversial efficacy or are in an early development stage.

Other alternatives, among the studies that have been carried out in the treatment of diabetic ulcers, are hyperbaric oxygen therapy and extracorporeal shock wave therapy.

Electrohydraulic shock waves appear to be more effective, improving healing by the topical anti-inflammatory response, increased vascularization, and tissue regeneration. However, these treatments are still complementary within the scope of healing of torpid ulcers.

Recently, platelet-rich plasma (PRP) has been proposed for the treatment of ulcers of torpid evolution in both diabetic patients and patients with peripheral vascular insufficiency. PRP is obtained from autologous platelet concentrates, which are activated by the addition of calcium chloride, and in this way release growth factors and cytokines stored in their granules. These substances promote healing by attracting undifferentiated cells to the newly formed matrix and stimulating their division. They also promote capillarogenesis, accelerate epithelialization, interaction with macrophages favoring the healing and regeneration of tissue. Treatment with PRP should be considered in ulcers with little or no response to conventional treatments. It presents a low cost, of easy generation and application. However, it is necessary to record the generation of the PRP and the frequency of application and thus to be able to carry out research work to evaluate the effectiveness of the treatment.

Conventional treatments do not always allow a stable evolution of the diagnosed cases, and hence the need arises to find drugs and therapeutic alternatives to treat these patients, with products that are really effective in the healing of ulcers.

There is basic and clinical evidence that heparins may play an important role in the therapeutic arsenal for the healing of diabetic foot ulcers. Although a clear cause-effect relationship with the benefits of Low Molecular Weight Heparins, LMWH, is not known in the evolution of ulcers, these could be due to several reasons such as its antithrombotic and angiogenic action, improving vascularization in the compromised area, as well as its anti-inflammatory effect.

Heparin is a highly sulfated and heterogeneous polysaccharide, belonging to the family of glycosaminoglycans (GAGs), found in mammalian tissues. It is presented as a mixture of heterogeneous molecules, with a molecular weight range ranging from 5 to 40 kDa, and an average molecular weight of approximately 15 kDa.

The biosynthesis of heparin and the regulatory mechanisms that ultimately provide its structure are only partly known. As in most members of the GAGs family, it consists of the formation of a linear saccharide chain extending perpendicular to a protein center.

The structure of the heparin consists of polysaccharide chains consisting of the repetition of a basic disaccharide sequence, consisting of a unit of uronic acid and a unit of glucosamine, united by a glucoside linkage α (1 \rightarrow 4). Heparin has a high heterogeneity and, depending on the length of the chain, up to 30 different disaccharide units have been described. As regards the three-dimensional structure it is known that the heparin chains adopt a helical arrangement in which two successive disaccharides are related to each other by a double helix operation involving a rotation followed by a translation along the axis of the helix. The charged groups, sulfates and carboxylates, are placed on both sides of the heparin helix, an aspect to consider when studying interactions with any molecule or protein.

Among the many biological functions attributed to heparin, the anticoagulant activity undoubtedly stands out. Thus, this polysaccharide is capable of activating antithrombin III (AT III), a protein that is found in blood plasma and which is responsible for the inhibition of thrombin, that is, it interrupts, in its active form, the process cascade involved in blood clotting. The key chemical sequence for the binding of heparin to antithrombin is a pentasaccharide present in the so-called irregular zone of the structure. It is composed of three sulfated glucosamines and two uronic acids, and binds and activates antithrombin, enhancing the inhibition of factor Xa and factor IIa.

While the first generation of heparins is represented by unfractionated heparin (UFH), the second generation includes low molecular weight heparins (LMWH), obtained by depolymerization or fractionation of heparin and with different chemical structures depending on the endpoint Terminus of the polysaccharide chains. They have an average molecular weight below 8 kDa and at least 60 percent of the total chains have a molecular weight of less than 8 kDa. Each LMWH has a specific molecular weight distribution that determines its anticoagulant activity.

Reducing the size of the polysaccharide chains implies a change in the anticoagulant mechanism. Thus, while unfractionated heparins inactivate Factor IIa and Factor Xa alike, LMWHs preferentially inactivate Factor Xa, so its main action is antithrombotic. This is a great advantage in relation to conventional heparins (UFH) in terms of their pharmacokinetics, having a predictable dose response and presenting fewer hemorrhagic side effects.

The potential benefits of heparins can be attributed to multiple mechanisms of action, such as the anti-inflammatory effect (by inhibition of the production of Tumor Necrosis Factor α , TNF- α), decrease in migration and

SUMMARY

adhesion of leukocytes to the site of injury, stimulation of the production of growth factors and induction of proliferation of fibroblasts, promotion of the synthesis of components of the extracellular matrix by endothelial cells and improvement of microcirculation and tissue oxygenation.

Goals

The line of research was directed towards the development of new molecules and formulations for the treatment of diabetic ulcers derived from diabetes, either topical (diabetic foot ulcers) or ophthalmic (diabetic retinopathy), and its possible extension to other chronic ulcers with different etiopathogenesis.

The general objective of this doctoral thesis consists of the hemisynthesis of new derivatives of glycosaminoglycans covalently attached to nitro groups and their preclinical evaluation *in vivo* for the treatment of chronic topical ulcers.

Results

A library of products was obtained, which after its characterization and selection were intended for animal experimentation. The administration of the products has been done to the subcutaneous and topical route.

The new chemical entities developed in this work have the characteristic that the saccharidic structure are covalently bonded to nitro groups and are able, under physiological conditions, to release nitric oxide (NO) to values that are therapeutically effective. This methodology is applicable to sodium heparin (HNF), low molecular weight heparins (LMWHs), very low molecular weight heparins (HMBPMs) and heparin oligosaccharides obtained from either HNF, LMWH or HMBPM or by organic synthesis (Fondaparinux, Idraparinux, etc.).

The synthetic procedure employed is based on the reaction a quaternary ammonium salt of heparin with a nitrating mixture in an organic medium.

The structural characterization of the compounds thus obtained has been carried out using several techniques of analysis, including infrared spectroscopy (IR) nuclear magnetic resonance (NMR) techniques, molecular exclusion chromatography (GPC) and combustion microanalysis. Methods of anti factor Xa and anti factor IIa activity have been used for the determination of biological activities.

The products have been tested *in vivo* in a total of six studies and the routes of administration studied have been the subcutaneous and topical route.

The results of *in vivo* studies are summarized below.

The SIF-109-1 study was carried out in the diabetic mouse model and after the subcutaneous administration of four test products, the group treated with the coded product HO5106C-116 batch 2, nitro derivative product, is the one with the highest stage of recovery.

The SIF-109-6 study was also carried out in a diabetic mouse model and after the subcutaneous administration of four test products, a very advanced reepithelization and an evident reduction of the lesion were observed in all groups.

The SIF-210-1 study groups I, II and III, have been carried out in the porcine model. After the creation of the diabetic model, skin ulcers were created and after topical administration of the three test products, the group treated with the coded product ROV1105 proved to be the one showing the best recovery, having the lowest values in inflammation, fibrosis and neovascularization.

The study SIF-210-1 groups VI and VII, has been carried out in porcine model. After the creation of the diabetic model, burn ulcers were created and after topical administration of two test products, no statistically significant differences were found between the treatment and control groups. However, the group treated with the coded product ROV1105 is the one that shows the best results of histological recovery of the ulcers.

The SIF-109-7 study has been carried out in the diabetic mouse model. Four test products have been administered topically. Groups 1 and 2, treated with the coded products RG-001 and RG-002 respectively, are those with a more advanced stage of histological recovery, and it is group 1 the one that shows better results of reduction of the wound.

The SIF-110-1 study has been carried out in experimental model of diabetic rabbit. Five test products have been administered topically for the evaluation of healing of corneal ulcers. The results obtained show that the group III, treated with the coded product SRO-002, is the one that has better results of histological recovery of the corneal epithelium.

Conclusions

Heparin sodium derivatives bearing nitro groups have been obtained. The synthetic method allows modulating the degree of substitution, average molecular weight, anticoagulant activity, etc.

SUMMARY

The derivatives obtained have a minimized anticoagulant activity, thereby preventing the occurrence of associated side effects such as hemorrhage, bruising, etc.

The compounds have shown their capacity to regenerate ulcerated tissue, and its capacity of reduction and reepithelialization of the different ulcers created in the experimental models in animals that have been studied. The regeneration capacity varies not only with the degree of substitution with nitro groups of the compounds, but also with their average molecular weight.

RESUMEN

2. Resumen

Título

Obtención, caracterización y evaluación de nitroderivados de heparina y heparinas de bajo peso molecular para el tratamiento de úlceras.

Introducción

La ulceración de las extremidades inferiores representa una patología con una alta incidencia y prevalencia, que afecta al 1-3% de la población en los países desarrollados. A la problemática social derivada de la invalidez, se suma el elevado coste sanitario generado por el tratamiento de estos pacientes. Cuando los afectados son jóvenes, a las implicaciones negativas en la calidad de vida, debe agregarse la pérdida de jornadas laborales, incrementándose así el coste social que esta afección genera. La etiología de la mayor parte de las úlceras es vascular, fundamentalmente debidas a insuficiencia venosa (80-90%), aunque también pueden ser de origen arterial.

Otra patología altamente vinculada a este tipo de ulceraciones es la diabetes, con una incidencia del 50% en pacientes, siendo un 15% los que sufren complicaciones ulcerosas que derivan en el llamado síndrome de pie diabético. El 90% de las amputaciones no traumáticas son atribuidas a esta causa, lo cual incrementa la morbilidad en dicha patología, ya que se estima que el 50% de los pacientes diabéticos que sufren una amputación requieren una segunda en los siguientes 5 años, reduciendo su supervivencia al 40%. No obstante, ciertas úlceras también responden a causas particulares como enfermedad oclusiva arterial o diabetes, así como a enfermedades tumorales, causas hematológicas, infecciones específicas o procesos traumáticos. A pesar de que se puede realizar un tratamiento etiológico correcto y existe una gran variedad de apósitos disponibles en la actualidad, el porcentaje y la velocidad de cicatrización siguen siendo bajos. De modo que no existe tratamiento farmacológico eficaz para las úlceras de pie diabético. Los productos empleados consisten en vendajes, apósitos y geles para hidratar la herida.

Por otra parte, la retinopatía periférica es otra patología frecuentemente asociada a la diabetes, tanto la de tipo I como la de tipo II, la cual puede derivar en afectaciones a nivel no sólo de la retina, sino también de la córnea y nervios craneales. Los pacientes diabéticos con retinopatía diabética presentan un riesgo elevado de desarrollar desórdenes a nivel corneal, como defectos epiteliales, susceptibilidad y ulceraciones. Esta se encuentra asociada a alteraciones a nivel de la composición de la membrana basal del epitelio corneal, como la disminución en entactina, laminina-1 y laminina-10, integrinas $\alpha3\beta1$ (VLA-3). Estas alteraciones se encuentran más pronunciadas para el caso de retinopatía diabética que en no diabética. Se cree que estas alteraciones pueden

RESUMEN

deberse a una anormal expresión de factores de crecimiento en el ojo diabético.

Se ha comercializado un tratamiento tópico que contiene el factor de crecimiento plaquetario humano, cuya eficacia es discreta y limitada a las úlceras de pequeño tamaño. Además, se ha asociado su uso a un posible efecto adverso carcinogénico. Otros posibles tratamientos tienen una eficacia controvertida o se encuentran en fase de desarrollo temprano.

Otras alternativas, dentro de los estudios que se han llevado a cabo en el tratamiento de las úlceras diabéticas, son la terapia de oxígeno hiperbárico y la terapia por ondas de choque extracorpóreas. Las ondas de choque electrohidráulicas parecen ser más efectivas, mejorando la curación por la respuesta anti-inflamatoria tópica, el incremento de la vascularización y la regeneración de los tejidos que provoca. Sin embargo estos tratamientos no dejan de ser tratamientos complementarios dentro del ámbito de la curación de las úlceras tórpidas.

Recientemente se ha comenzado a utilizar el plasma rico en plaquetas (PRP) para el tratamiento de úlceras de tórpida evolución tanto en pacientes diabéticos como en pacientes con insuficiencia vascular periférica. El PRP se obtiene a partir de concentrados autólogos de plaquetas, que son activadas mediante el agregado de cloruro cálcico, y de esta forma liberan factores de crecimiento y citoquinas almacenados en sus gránulos. Estas sustancias favorecen la cicatrización al atraer células indiferenciadas a la recientemente formada matriz y estimulan su división. Asimismo promueven la capilarogénesis, aceleran la epitelización, interactúan con macrófagos favoreciendo la curación y regeneración del tejido. El tratamiento con PRP debería considerarse en úlceras con escasa o nula respuesta a los tratamientos convencionales. Ahora bien, se trata de un tratamiento aún artesanal, por lo que es necesario realizar trabajos de investigación para evaluar la efectividad del tratamiento.

Los tratamientos convencionales no siempre permiten una evolución estable de los casos diagnosticados, razón por la cual surge la necesidad de buscar medicamentos y alternativas terapéuticas para tratar a estos pacientes, con productos que resulten realmente eficaces en la curación de las úlceras.

Existen evidencias básicas y clínicas que indican que las heparinas podrían jugar un papel importante en el arsenal terapéutico para la curación de las úlceras de pie diabético. Aunque no se conoce una clara relación causa-efecto en cuanto a los beneficios de las Heparinas de Bajo Peso Molecular, HBPM, en la evolución de las úlceras, éstos podrían ser debidos a varias razones como su acción antitrombótica y angiogénica, mejorando la vascularización en la zona comprometida, así como su efecto antiinflamatorio.

La heparina es un polisacárido heterogéneo y altamente sulfatado, que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos (GAGs), y que se encuentra en

tejidos de mamíferos. Se presenta como una mezcla de moléculas heterogéneas, con un rango de pesos moleculares que oscilan entre 5 y 40 kDa, y un peso molecular medio aproximado de 15 kDa.

La biosíntesis de la heparina y los mecanismos reguladores que proporcionan finalmente su estructura, sólo son conocidos en parte. Como ocurre en la mayoría de los miembros de la familia de GAGs, consiste en la formación de una cadena lineal sacárida que se extiende perpendicular a un centro proteico.

La estructura de la heparina está formada por cadenas polisacáridicas que consisten en la repetición de una secuencia disacáridica base, constituida por una unidad de ácido urónico y una unidad de glucosamina unidas por un enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow4)$. La heparina presenta una alta heterogeneidad y, dependiendo de la longitud de la cadena, se han descrito hasta 30 unidades disacáridicas distintas. En cuanto a la estructura tridimensional se sabe que las cadenas de heparina adoptan una disposición helicoidal en la que dos disacáridos sucesivos están relacionados entre sí por una operación de doble hélice que implica una rotación, seguida de una traslación a lo largo del eje de la hélice. Los grupos cargados, sulfatos y carboxilatos, se colocan a ambos lados de la hélice de heparina, aspecto a considerar cuando se estudian las interacciones con cualquier molécula o proteína.

De entre las muchas funciones biológicas que se atribuyen a la heparina, destaca sin duda su actividad anticoagulante. Así, este polisacárido es capaz de activar a la antitrombina III (AT III), proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo y que es responsable de la inhibición de la trombina, es decir, interrumpe, en su forma activa, la cascada de procesos implicados en la coagulación de la sangre. La secuencia química clave para la unión de la heparina a la antitrombina es un pentasacárido presente en la llamada zona irregular de la estructura. Está compuesto de tres glucosaminas sulfatadas y de dos ácidos urónicos, y se unen y activan a la antitrombina, potenciando la inhibición del factor Xa y del factor IIa.

Mientras que la primera generación de heparinas está representada por la heparina no fraccionada (HNF), la segunda generación incluye las heparinas de bajo peso molecular (HBPM), obtenidas por la despolimerización o fraccionamiento de la heparina y con diferentes estructuras químicas en función del extremo terminal de las cadenas polisacáridicas. Tienen un peso molecular medio por debajo de 8 kDa y al menos el 60 por ciento de las cadenas totales tienen un peso molecular inferior a 8 kDa. Cada HBPM tiene una distribución de pesos moleculares específica que determina su actividad anticoagulante.

La reducción del tamaño de las cadenas de polisacáridos supone un cambio en el mecanismo anticoagulante. Así, mientras las heparinas no fraccionadas inactivan por igual el Factor IIa y el Factor Xa, las HBPM inactivan preferentemente el Factor Xa, por lo que su acción principal es antitrombótica.

RESUMEN

Esto supone una gran ventaja en relación con las heparinas convencionales (HNF) en cuanto a su farmacocinética, teniendo una respuesta predecible a la dosis y presentando menos efectos secundarios hemorrágicos.

Los beneficios potenciales de las heparinas se pueden atribuir a múltiples mecanismos de acción, como son el efecto anti-inflamatorio (por inhibición de la producción del Tumor Necrosis Factor α , TNF- α), descenso en la migración y adhesión de leucocitos al lugar de la lesión, estímulo de la producción de factores de crecimiento e inducción de la proliferación de fibroblastos, promoción de la síntesis de componentes de la matriz extracelular por células endoteliales y mejoría de la microcirculación y oxigenación tisular.

Objetivos

La línea de investigación se dirigió hacia el desarrollo de nuevas moléculas y formulaciones para el tratamiento de úlceras tóricas derivadas de la diabetes, ya sean tóricas (úlceras de pie diabético) u oftálmicas (retinopatía diabética), y su posible extensión a otras úlceras crónicas con diferente etiopatogenia.

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en la hemisíntesis de nuevos derivados de glicosaminoglicanos unidos covalentemente a grupos nitro y su evaluación preclínica in vivo para el tratamiento de úlceras tóricas crónicas.

Resultados

Se ha obtenido una quimioteca de productos, que tras su caracterización y selección fueron destinados a la experimentación en animales. La administración de los productos en los distintos modelos animales estudiados se ha realizado por vía subcutánea y por vía tórica.

Las nuevas entidades químicas desarrolladas en este trabajo, presentan la característica que a la estructura sacarídica se unen covalentemente grupos nitro, y son capaces, en condiciones fisiológicas, de liberar óxido nítrico (NO) hasta valores que son terapéuticamente efectivos. Esta metodología es aplicable a heparina sódica (HNF), heparinas de bajo peso molecular (HBPM), heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM) y oligosacáridos de heparina obtenidos tanto a partir de HNF, HBPM o HMBPM o por síntesis orgánica (Fondaparinux, Idraparinux, etc.). El procedimiento de obtención se basa en hacer reaccionar una sal de amonio cuaternario de heparina, con una mezcla nitrante en un medio orgánico.

La caracterización estructural se ha llevado a cabo utilizando varias técnicas de análisis, entre las que se encuentran las técnicas espectroscópicas de infrarrojo (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN), y la técnica de HPLC de cromatografía de exclusión molecular (GPC) y el análisis elemental por

combustión. Para la determinación de las actividades biológicas se han usado los métodos de actividad anti Factor Xa y anti factor IIa.

Los productos de han ensayado *in vivo* en un total de seis estudios y las vías de administración estudiadas han sido la vía subcutánea y la vía tópica.

Los resultados de los estudios *in vivo* se resumen a continuación.

El estudio SIF-109-1 se ha llevado a cabo en modelo ratón diabético y tras la administración subcutánea de cuatro productos de ensayo, el grupo tratado con el producto codificado HO5106C-116 lote 2, producto nitro derivado, es el que presenta el mayor estadio de recuperación.

El estudio SIF-109-6 también se ha llevado a cabo en modelo ratón diabético y tras la administración subcutánea de cuatro productos de ensayo, en todos los grupos se ha observado una reepitelización muy avanzada y una evidente reducción de la lesión.

El estudio SIF-210-1 grupos I, II y III, se ha llevado a cabo en modelo porcino. Después de la creación del modelo diabético, se crearon las úlceras cutáneas y tras la administración tópica de los tres productos de ensayo, el grupo tratado con el producto codificado ROV1105 resultó ser el más recuperado, teniendo los valores más bajos en inflamación, fibrosis y neovascularización.

El estudio SIF-210-1 grupos VI y VII, se ha llevado a cabo en modelo porcino. Después de la creación del modelo diabético, se crearon las úlceras por quemadura y tras la administración tópica de dos productos de ensayo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratamiento y control. Sin embargo, el grupo tratado con el producto codificado ROV1105 es el que muestra mejores resultados de recuperación histológica de las úlceras.

En el estudio SIF-109-7 se ha llevado a cabo en modelo ratón diabético. Se han administrado por vía tópica cuatro productos de ensayo, encontrándose que los grupos 1 y 2, tratados con los productos codificados RG-001 y RG-002 respectivamente, son los que presentan un estadio más avanzado de recuperación histológica, y es el grupo 1 el que muestra mejores resultados de reducción de la herida.

En el estudio SIF-110-1 se ha llevado a cabo en modelo experimental de conejo diabético. Se han administrado por vía tópica cinco productos de ensayo, para la evaluación de la curación de úlceras corneales. Los resultados obtenidos muestran que el grupo III, tratado con el producto codificado SRO-002, es el que tiene mejores resultados de recuperación histológica del epitelio corneal.

Conclusiones

Se han obtenido derivados de heparina sódica unidos covalentemente a grupos donantes de óxido nítrico. El método de obtención de estos derivados permite modular el grado de sustitución, el peso molecular medio, la actividad anticoagulante, etc.

Los derivados obtenidos tienen una actividad anticoagulante minimizada, evitando así la aparición de efectos secundarios asociados tales como hemorragia, moratones, etc.

Los compuestos obtenidos han demostrado su capacidad para regenerar tejido ulcerado y su capacidad de reducción y reepitelización de las diferentes úlceras creadas en los modelos experimentales en animales que se han estudiado. La capacidad de regeneración varía no sólo con el grado de sustitución con grupos NO de los compuestos, sino también con el peso molecular medio de los mismos.

INTRODUCCIÓN

3. Introducción

La ulceración de las extremidades inferiores representa una patología con una alta incidencia y prevalencia, que afecta al 1-3% de la población en los países desarrollados [1]. A la problemática social derivada de la invalidez, se suma el elevado coste sanitario generado por el tratamiento de estos pacientes. Cuando los afectados son jóvenes, a las implicaciones negativas en la calidad de vida, debe agregarse la pérdida de jornadas laborales, incrementándose así el coste social que esta afección genera. La etiología de la mayor parte de las úlceras es vascular, fundamentalmente debidas a insuficiencia venosa (80-90%), aunque también pueden ser de origen arterial.

Otra patología altamente vinculada a este tipo de ulceraciones es la diabetes, con una incidencia del 50% en pacientes, siendo un 15% los que sufren complicaciones ulcerosas que derivan en el llamado síndrome de pie diabético. El 90% de las amputaciones no traumáticas son atribuidas a esta causa, lo cual incrementa la morbilidad en dicha patología [2], ya que se estima que el 50% de los pacientes diabéticos que sufren una amputación requieren una segunda en los siguientes 5 años, reduciendo su supervivencia al 40%. No obstante, ciertas úlceras también responden a causas particulares como enfermedad oclusiva arterial o diabetes, así como a enfermedades tumorales, causas hematológicas, infecciones específicas o procesos traumáticos [3]. A pesar de que se puede realizar un tratamiento etiológico correcto y existe una gran variedad de apósitos disponibles en la actualidad, el porcentaje y la velocidad de cicatrización siguen siendo bajos. De modo que no existe tratamiento farmacológico eficaz para las úlceras de pie diabético. Los productos empleados consisten en vendajes, apósitos y geles para hidratar la herida.

Por otro lado, se ha comercializado un tratamiento tópico que contiene el factor de crecimiento plaquetario humano, cuya eficacia es discreta y limitada a las úlceras de pequeño tamaño [4]. Además, se ha asociado su uso a un posible efecto adverso carcinogénico [5]. Otros posibles tratamientos tienen una eficacia controvertida o se encuentran en fase de desarrollo temprano [6].

Otras alternativas, dentro de los estudios que se han llevado a cabo en el tratamiento de las úlceras diabéticas, son la terapia de oxígeno hiperbárico y la terapia por ondas de choque extracorpóreas, [7,8]. Las ondas de choque electrohidráulicas parecen ser más efectivas, mejorando la curación por la respuesta anti-inflamatoria tópica, el incremento de la vascularización y la regeneración de los tejidos que provoca. Sin embargo estos tratamientos no dejan de ser tratamientos complementarios dentro del ámbito de la curación de las úlceras tórpidas.

INTRODUCCIÓN

Recientemente [9,10,11] se ha comenzado a utilizar plasma rico en plaquetas (PRP) para el tratamiento de úlceras de tórpida evolución tanto en pacientes diabéticos como en pacientes con insuficiencia vascular periférica. El PRP se obtiene a partir de concentrados autólogos de plaquetas, que se mezclan con cloruro cálcico para producir la agregación y desgranulación plaquetaria. De esta forma se liberan factores de crecimiento y citoquinas almacenados en sus gránulos. Estas sustancias favorecen la cicatrización al atraer células indiferenciadas a la recientemente formada matriz y estimulan su división. Asimismo promueven la capilarogénesis, aceleran la epitelización, e interactúan con macrófagos, favoreciendo la curación y regeneración del tejido. El tratamiento con PRP debería considerarse en úlceras con escasa o nula respuesta a los tratamientos convencionales. Presenta un costo bajo, de fácil generación y aplicación. Ahora bien, se trata de un tratamiento aún artesanal. Es necesario protocolizar la generación del PRP y la frecuencia de aplicación y así poder realizar trabajos de investigación para evaluar la efectividad del tratamiento [12].

Podemos concluir que esta patología es una clara necesidad médica no satisfecha y en consecuencia es prioritario el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces y seguros que permitan mejorar significativamente el manejo de esta terrible complicación de la diabetes, mediante la consecución de unas tasas de cicatrización más altas y rápidas de las lesiones, particularmente para aquellas que, por su duración y tamaño, son más difíciles de tratar.

Por otra parte, la retinopatía periférica es otra patología frecuentemente asociada a la diabetes, tanto la de tipo I como la de tipo II, la cual puede derivar en afectaciones a nivel no sólo de la retina, sino también de la córnea y nervios craneales [13]. Los pacientes diabéticos con retinopatía diabética presentan un riesgo elevado de desarrollar desórdenes a nivel corneal, como defectos epiteliales, susceptibilidad y ulceraciones [14].

Esta susceptibilidad se encuentra asociada a alteraciones en la composición de la membrana basal del epitelio corneal, como la disminución en entactina, laminina-1 y laminina-10, integrinas $\alpha 3 \beta 1$ (VLA-3). Estas alteraciones se encuentran más pronunciadas para el caso de retinopatía diabética que en no diabética. Se cree que estas alteraciones pueden deberse a una anormal expresión de factores de crecimiento en el ojo diabético.

Los tratamientos tradicionales resultan a menudo insuficientes, habiendo en algunos casos pérdidas de visión.

Existe una estrategia dirigida al tratamiento de las alteraciones oculares en superficie mediante la aplicación de gotas oculares hechas a base de suero autólogo, ya que dicho suero contiene una amplia variedad de factores de crecimiento: Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor, EGF), factor de crecimiento transformante β (Transforming Growth Factor β , TGF- β),

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor, PDGF), vitaminas e inmunoglobulinas en cantidades superiores a las de las lágrimas naturales. De hecho existen evidencias que sugieren que tales factores de crecimiento y proteínas presentes en el suero ayudan a la curación de los defectos epiteliales [15]. El suero autólogo presenta unas propiedades mecánicas y bioquímicas similares a las de la lágrima, y como ésta, contiene componentes como la fibronectina, vitamina A y factores de crecimiento que tienen un efecto epiteliotrófico sobre las células epiteliales de la superficie ocular. Por todos estos motivos, la utilización de suero autólogo en colirio ha sido referida por muchos autores como una nueva forma de terapia en el manejo de enfermedades de la superficie ocular [16].

No obstante, la principal limitación de la terapéutica ocular convencional consistente en soluciones oftálmicas o colirios, es su baja biodisponibilidad y por consiguiente su baja respuesta terapéutica. El intenso efecto de drenaje que provocan la secreción lacrimal y el pestañeo hacen que la penetración del fármaco en las estructuras del ojo se limite a un 3-5% de la dosis aplicada. Es por esto que actualmente los sistemas de gelificación *in situ* se presentan como una alternativa eficaz al encontrarse en forma líquida a temperatura ambiente aumentando su consistencia de manera prácticamente instantánea una vez que se produce el contacto con la superficie ocular. De esta manera se combina una fácil administración, en comparación con la de formulaciones convencionales que contienen elevadas cantidades de agentes viscosizantes que resultan difíciles de aplicar y producen sensación de visión borrosa, con un comportamiento adecuado en cuanto a resistencia al drenaje y permanencia en la zona de aplicación.

El plasma rico en plaquetas se ha usado en clínica [17] como un adyuvante en la regeneración tisular en el tratamiento de úlceras corneales. El PRP autógeno en su forma sólida tiene una gran validez para el tratamiento de casos severos de perforación corneal en los que actúa como un verdadero cicatrizante [18].

La membrana amniótica (MA) también ha sido usada para el tratamiento de las úlceras corneales y defectos de las células madre limbares [19]. Sin embargo, el origen heterólogo de la membrana amniótica puede ser un problema significativo, especialmente en lo que se refiere a la reacción inmune, morfología basal o riesgo de transmisión de enfermedades. Los efectos de los métodos de procesamiento, conservación y preparación preoperatoria de la membrana no están suficientemente aclarados. En oftalmología se comenzaron a utilizar las membranas fetales como implante para la reconstrucción de la superficie ocular en 1940, con malos resultados. Posteriormente se utilizó con éxito membrana amniótica procesada químicamente, como recubrimiento temporal, en el tratamiento de quemaduras químicas oculares. A pesar de los buenos resultados, durante un periodo de casi 50 años no se publicaron nuevos

INTRODUCCIÓN

trabajos utilizando membrana amniótica, probablemente por problemas en el procesamiento y conservación del tejido. En 1995, Kim y Tseng introducen el trasplante de membrana amniótica preservada en el tratamiento de la patología de la superficie ocular y con ellos renace un interés generalizado por el uso de este tejido.

Ahora bien, el trasplante de MA cuenta también con una serie de limitaciones, en las cuales el trasplante por sí solo no es suficiente para conseguir el éxito esperado, como es el caso del déficit absoluto de células madre, ojos con alteraciones alteraciones tróficas importantes, etc. De la misma manera, en ojos con isquemia severa o ausencia de lágrima, la MA puede no ser suficiente para conseguir la curación [20].

Por lo tanto, en este campo existe una creciente necesidad de encontrar productos que resulten realmente eficaces mejorando y acelerando la curación de las úlceras oculares. Los tratamientos convencionales no siempre permiten una evolución estable de los casos diagnosticados, razón por la cual surge la necesidad de buscar medicamentos y alternativas terapéuticas para tratar a estos pacientes.

Heparinas y otros glicosaminoglicanos en el tratamiento de úlceras crónicas

Existen evidencias básicas y clínicas que indican que las heparinas podrían jugar un papel importante en el arsenal terapéutico para la curación de las úlceras de pie diabético. Aunque no se conoce una clara relación causa-efecto en cuanto a los beneficios de las Heparinas de Bajo Peso Molecular, HBPM, en la evolución de las úlceras, éstos podrían ser debidos a varias razones como su acción antitrombótica y angiogénica, mejorando la vascularización en la zona comprometida, así como su efecto antiinflamatorio.

La heparina fue descubierta accidentalmente en 1916 por Jay McLean, un estudiante de segundo curso de medicina de la Johns Hopkins University, investigando sustancias coagulantes tromboplásticas obtenidas de hígado de perro.

Es un polisacárido altamente sulfatado y heterogéneo, que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos (GAGs) [21]. Se presenta como una mezcla de moléculas heterogéneas, con un rango de pesos moleculares que oscilan entre 5 y 40 kDa, y un peso molecular medio aproximado de 15 kDa. Se encuentra en tejidos de mamíferos y por lo general se obtiene a partir de la mucosa intestinal u otros tejidos de mamíferos domésticos usados para alimento por los seres humanos.

Debido a su alto contenido en grupos sulfato y carboxilo cargados negativamente, la heparina tiene la densidad de carga negativa más alta de cualquier macromolécula biológica conocida.

La heparina es producida por biosíntesis mayoritariamente en los mastocitos y como producto biológico, tiene variabilidad estructural pero no completamente aleatoria, así en las unidades de ácido urónico, el ácido idurónico compone aproximadamente el 90% del total y el ácido glucurónico aproximadamente un 10% del total.

La biosíntesis de la heparina y los mecanismos reguladores que proporcionan finalmente su estructura, sólo son conocidos en parte [22,23]. Como ocurre en la mayoría de los miembros de la familia de GAGs, consiste en la formación de una cadena lineal sacárida que se extiende perpendicular a un centro proteico. La unión de los GAGs a la proteína central consiste en un trisacárido específico compuesto por dos residuos de galactosa y un residuo de xilosa (GAG–Gal–Gal–Xyl–O–CH₂–proteína). El trisacárido de unión está acoplado a la proteína central a través de una unión O-glicosídica a un residuo de serina. Después de formar esta unión, un grupo de enzimas se encargan de construir la cadena lineal oligosacárida, insertando de manera alterna unidades de ácido glucurónico y unidades de glucosamina N-acetilada.

La estructura de la heparina [21, 24, 25] está formada por cadenas polisacáridicas que consisten en la repetición de una secuencia disacáridica base, constituida por una unidad de ácido urónico y una unidad de glucosamina unidas por un enlace glicosídico $\alpha(1\rightarrow4)$. La heparina presenta una alta heterogeneidad y, dependiendo de la longitud de la cadena, se han descrito preparaciones de heparina que contienen hasta 30 unidades disacáridicas distintas. La región regular está constituida por la repetición del disacárido trisulfatado [26] α -IdoA-(2OSO₃⁻)-(1→4)- α -GlcNSO₃⁻-(6-OSO₃⁻) y forma la parte mayoritaria de la heparina. Por otro lado, en la región irregular aparecen otros monosacáridos: α -IdoA, β -GlcA, β -GlcA-(2-OSO₃⁻), α -GlcNAc-(6-OSO₃⁻) o α -GlcNSO₃⁻-(3,6-di-OSO₃⁻), entre otros. El disacárido trisulfatado que aparece en la siguiente figura es la estructura más común de la heparina. Sin embargo, existe una serie de variaciones estructurales de este disacárido, lo que conduce a la microheterogeneidad de la heparina. El grupo amino del resto de glucosamina puede estar sustituido con un grupo acetilo o sulfato o no sustituido. Las posiciones 3 y 6 de los residuos de glucosamina pueden estar sustituidas con un grupo O-sulfato o no sustituidas. El ácido urónico, que puede ser idurónico o glucurónico, también puede contener un grupo 2-O-sulfato.

INTRODUCCIÓN

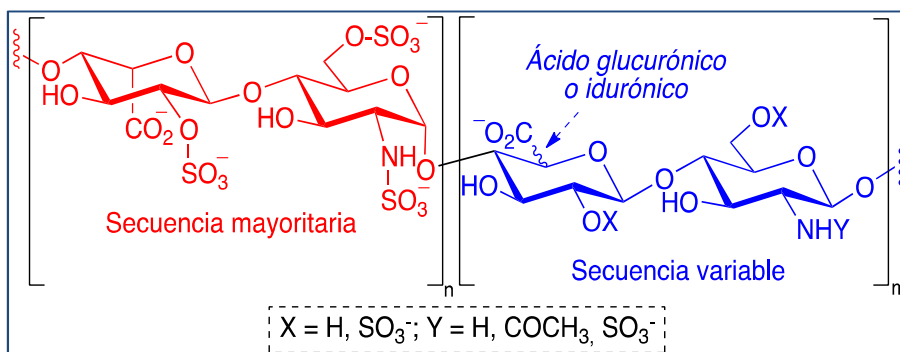


Figura 1. Secuencias mayoritaria y variable de las heparinas

Para nombrar las estructuras que componen este tipo de compuestos se suelen usar abreviaturas. Así, las unidades de glucosamina son representadas por la abreviatura “GlcN” y dependiendo de la sustitución de la posición -2 ($Y=H$, $-SO_3^-$ o $-COCH_3$) se representan como GlcN, GlcNS o GlcNAc respectivamente. Las posiciones -C3 y -C6, si están sulfatadas se representan como 3S y 6S. En el caso de las unidades ácidas, dependiendo del epímero formado se usan distintas abreviaturas. Así el ácido glucurónico se representa como “GlcA” y el ácido idurónico se representa como “IdoA”. Si la posición -C2 está sulfatada se representa como 2S.

En cuanto a la estructura tridimensional de este polisacárido [27] se sabe que las cadenas de heparina adoptan una disposición helicoidal en la que dos disacáridos sucesivos están relacionados entre sí por una operación de doble hélice que implica una rotación de aproximadamente 180° seguida de una traslación 8.0-8.7 Amstrons a lo largo del eje de la hélice. Por tanto, los grupos cargados, sulfatos y carboxilatos, se colocan a ambos lados de la hélice de heparina, aspecto a considerar cuando se estudian las interacciones de este carbohidrato con cualquier proteína.

De entre las muchas funciones biológicas [25,28] que se atribuyen a la heparina, destaca sin duda su actividad anticoagulante. Así, este polisacárido es capaz de activar a la antitrombina III (AT III), proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo y que es responsable de la inhibición de la trombina, es decir, interrumpe, en su forma activa, la cascada de procesos implicados en la coagulación de la sangre. El intenso trabajo realizado por Petitou y van Boeckel [24,29] durante las décadas de los 80 y 90 ha permitido esclarecer las bases moleculares de la interacción de la heparina y la AT III y establecer los requerimientos estructurales mínimos necesarios para producir dicha activación.

Estos estudios han demostrado que la interacción entre un complejo GAG y una proteína puede estar mediada por una única y definida secuencia oligosacáridica. Este oligosacárido en el caso de la AT III es el pentasacárido [30], perteneciente a la región irregular de la heparina, puesto que contiene una unidad de ácido D-glucurónico y una unidad de 3,6-di-O-sulfo- α -D-glucosamina. La secuencia específica corresponde a N-acetil-6-O-sulfo-glucosamina (GlcNAc6S), ácido glucurónico (GlcA), N-sulfo-3,6-di-O-sulfo-glucosamina (GlcNS3S6S), ácido 2-sulfo-idurónico (IdoA2S), y N-sulfo-6-O-sulfo-glucosamina (GlcNS6S), representada de manera resumida como GlcNAc6S-GlcA-GlcNS3S6S-IdoA2S-GlcNS6S [31,32], como se indica en la figura 2.

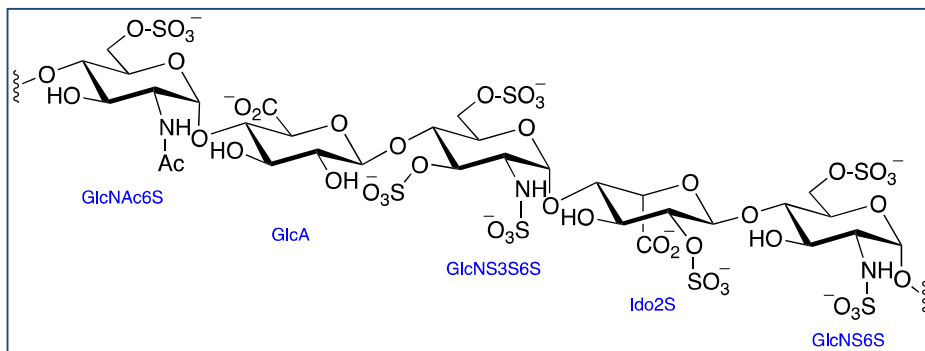


Figura 2. Secuencia pentasacáridica responsable de la afinidad por AT III

Heparinas de bajo peso molecular (HBPM)

Mientras que la primera generación de heparinas está representada por la heparina no fraccionada (HNF), la segunda generación incluye las heparinas de bajo peso molecular (HBPM). Estas se obtienen por la despolimerización o fraccionamiento de la heparina y poseen estructuras químicas adicionales que vienen determinadas por el procedimiento usado en su fabricación. Las modificaciones estructurales afectan principalmente a los residuos terminales de las cadenas polisacáridicas. Cada HBPM, obtenida por diferentes procesos de fabricación, tiene una distribución de pesos moleculares específica que determina su actividad anticoagulante y su actividad farmacológica.

Según figura en la definición de la farmacopea europea, las HBPM tienen un peso molecular medio por debajo de 8 kDa y al menos el 60 por ciento de las cadenas totales tienen un peso molecular inferior a 8 kDa. Cada HBPM tiene una distribución de pesos moleculares específica que determina su actividad anticoagulante.

INTRODUCCIÓN

La reducción del tamaño de las cadenas de polisacáridos supone un cambio en el mecanismo anticoagulante: las heparinas no fraccionadas inactivan por igual la trombina o Factor IIa y el Factor Xa, mientras que las HBPM inactivan preferentemente el Factor Xa, por lo que su acción principal es antitrombótica. Esto supone una gran ventaja en relación con las heparinas convencionales (HNF) en cuanto a su farmacocinética. Al igual que ocurre con la HNF, las HBPM inactivan varias enzimas de coagulación uniéndose a la AT III, pero tienen una menor tendencia a unirse a otras proteínas que no sean AT III y están, por tanto, asociadas a una respuesta predecible a la dosis y a menos efectos secundarios no hemorrágicos.

Los fragmentos de bajo peso molecular de las HBPM poseen una serie de características diferenciales respecto a la heparina no fraccionada. Las HBPM tienen una menor propensión a inactivar al factor IIa, debido a sus cadenas polisacáridas más cortas, pero conservan su capacidad para inactivar al factor Xa. Para que exista la acción antitrombótica sólo se requiere la unión de la cadena de heparina a la molécula de AT III, cualquiera que sea su longitud, siempre que contenga el pentasacárido específico. Sin embargo, para potenciar el efecto anticoagulante se requieren cadenas que contengan al menos 18 sacáridos, que pueden unirse a la vez a las moléculas de antitrombina y de trombina, formando un complejo ternario (figura 3).

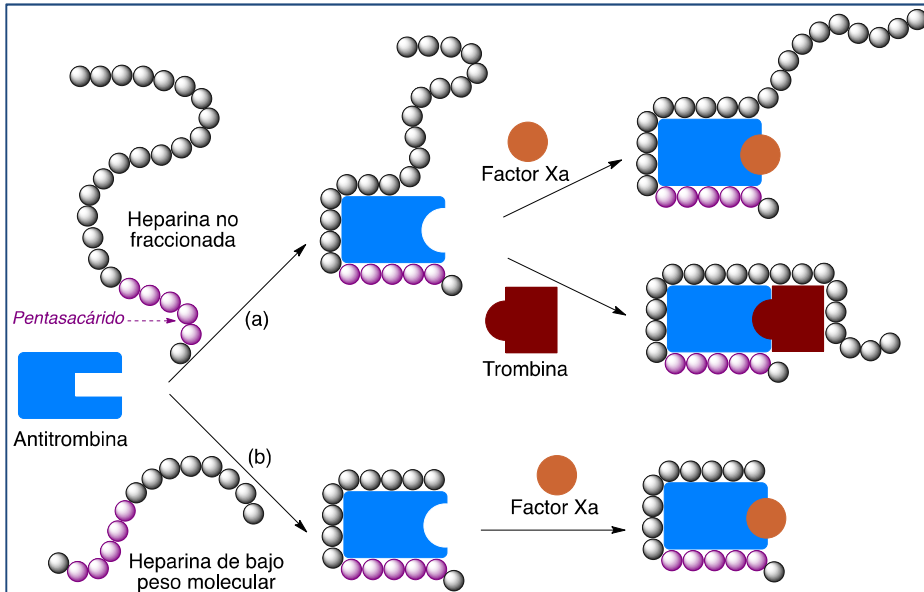


Figura 3. Representación esquemática de la acción de heparinas y heparinas de bajo peso molecular

Las HBPM que poseen gran proporción de cadenas con menos de 18 sacáridos, poseen una mayor capacidad de inhibición de la función anti-Xa que de la función anti-IIa, con una relación de actividad anti-Xa/anti-IIa mayor que 1. Así, el cociente de la actividad antifactor IIa es de aproximadamente 1:1 para la heparina [33], mientras que para las HBPM varía en función de la longitud de la cadena polisacáridica, oscilando generalmente entre 2:1 y 4:1. De ahí que la vida media de las HBPM sea más prolongada y que tengan menor riesgo de hemorragia, debido a que sus cadenas de polisacáridos son más cortas y no inhiben otros factores de coagulación. Las HBPM están asociadas a una respuesta más predecible a la dosis y tienen menores efectos secundarios no hemorrágicos que las HNF de las que proceden. Debido a estas ventajas clínicas, las HBPM han sustituido a la HNF en la mayoría de las indicaciones.

Presentan una elevada biodisponibilidad, incluso administradas por vía subcutánea (del 85-95%), un nivel en sangre predecible, escasa variabilidad individual y una semivida mayor. Sus características permiten una administración por vía subcutánea cada 12 o 24 h, a dosis fijas, sin necesidad de controles analíticos para monitorizar la respuesta anticoagulante, ni ajustes de dosis, a menos que estén presentes enfermedades como obesidad mórbida o insuficiencia renal avanzada.

Actualmente hay cinco HBPM disponibles y comercializadas en España: Bemiparina, Dalteparina, Enoxaparina, Nadroparina y Tinzaparina. Se diferencian básicamente en el método de despolimerización y en su peso molecular, siendo menos relevantes sus diferencias en actividad. En la práctica se las puede considerar terapéuticamente equivalentes, aunque no intercambiables, por lo que debe respetarse su indicación, dosificación y modo de empleo. La tabla siguiente resume las propiedades de estas HBPM [34].

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.- HBPM disponibles y comercializadas en España.

HBPM	FABRICANTE	MÉTODO OBTENCIÓN	MW (Da)	ACTIVIDAD ANTI F-Xa (UI/mg)	ACTIVIDAD ANTI F-IIa (UI/mg)	RELACIÓN Xa/IIa
Bemiparina (Hibor®)	ROVI	Despolimerización por β -eliminación en medio no acuoso	3600	80 - 110	5-10	8
Dalteparina (Fragmin®)	Pfizer	Despolimerización controlada por ácido nitroso.	5700	140 - 160	50 -60	2 - 3
Enoxaparina (Clexane®)	Sanofi-Aventis	Bencilación seguida por hidrólisis alcalina	4500	100 - 110	25 - 30	3 - 4
Nadroparina (Fraxiparina®)	Glaxo	Despolimerización controlada con ácido nitroso.	4300	90 - 100	25 - 30	3
Tinzaparina (Innohep®)	Leo	Digestión con heparinasa	6500	90	50	1.5–2.5

Estudios realizados con modelos animales de experimentación diabéticos han evidenciado el retroceso de algunas de las alteraciones de las membranas basales en tratamiento con HBPM y heparinoides [35]. Este efecto podría ser explicado por la inhibición de factores activados por el contacto con el colágeno endotelial o bien por la estimulación de la síntesis del heparán sulfato [36].

Además estudios con cultivos de fibroblastos procedentes de tejidos ulcerosos, tanto diabéticos como no diabéticos, donde su capacidad de proliferación se encuentra disminuida, indican que la heparina tiene la capacidad de revertir dicha situación [37].

Sin duda, la mejora en la cicatrización de las úlceras está íntimamente relacionada con la correcta regeneración del tejido, para la cual el factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor, FGF) juega un papel primordial ya que es capaz de medir la proliferación y diferenciación de los fibroblastos y mioblastos.

Es conocido que los polisacáridos tipo heparina y heparán sulfato son necesarios para la actividad biológica del FGF, mediante su unión y señalización [38]. Se postula que dicha interacción se produce a través de los grupos N-acetilados, lo cual podría corresponder a secuencias cortas de monosacáridos u oligosacáridos [39,40]. De modo que una de las posibles aproximaciones para el tratamiento de las úlceras consistiría en la identificación y síntesis de nuevas moléculas derivados oligosacáridos de la heparina implicados en la activación biológica del FGF.

Los beneficios potenciales de las heparinas se pueden atribuir a múltiples mecanismos de acción:

- Efecto anti-inflamatorio (por inhibición de la producción del Tumor Necrosis Factor α , TNF- α)
- Descenso en la migración y adhesión de leucocitos al lugar de la lesión
- Estímulo de la producción de factores de crecimiento e inducción de la proliferación de fibroblastos
- Promoción de la síntesis de componentes de la matriz extracelular por células endoteliales
- Mejoría de la microcirculación y oxigenación tisular

En un primer ensayo clínico realizado en un pequeño número de pacientes, el porcentaje de pacientes en los que mejoró la evolución de la úlcera (reducción > 50% en el área de la úlcera y/o de un grado según la clasificación de Wagner) fue significativamente mayor en el grupo que recibió bemiparina (HBPM) en comparación con el que recibió placebo (70,3% versus 45,5%; $p=0,035$), con un perfil de seguridad similar a placebo [41].

INTRODUCCIÓN

De otra parte, es conocido que el óxido nítrico (NO) juega un papel importante en la cicatrización de heridas debido a sus efectos sobre angiogénesis, inflamación, proliferación celular, deposición de matriz y remodelación. El óxido nítrico es un gas endógeno producido en las células por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) sobre la L-arginina que la convierte en citrulina con liberación de NO. En estudios realizados sobre ratas diabéticas inducidas se ha demostrado que el tratamiento con moléculas donadoras de óxido nítrico o con aporte suplementario de sustrato L-arginina mejora la cicatrización de úlceras.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en la hemisíntesis de nuevos glicosaminoglicanos unidos covalentemente a grupos nitro y su evaluación preclínica in vivo para el tratamiento de úlceras tópicas crónicas. La hipótesis farmacológica de partida es que las heparinas así modificadas mantendrán probablemente sus propiedades anticoagulantes y al mismo tiempo permitirán la liberación en el tejido ulcerado de la heparina original junto con óxido nítrico. Los nitratos de alquilo, como por ejemplo la nitroglicerina, son precursores de óxido nítrico. El mecanismo exacto por el que tiene lugar la transformación ha sido desconocido hasta que se demostró que la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (mtALDH) cataliza la reducción de la nitroglicerina a anión nitrito, que es transformado después en óxido nítrico por la nitrito reductasa [42] recientemente se han descrito un mecanismo adicional, no dependiente de aldehído deshidrogenasa, que opera en algunos casos [43]. En la figura 4 se muestra la forma en que se generaría óxido nítrico a partir de nuestras heparinas nitradas.

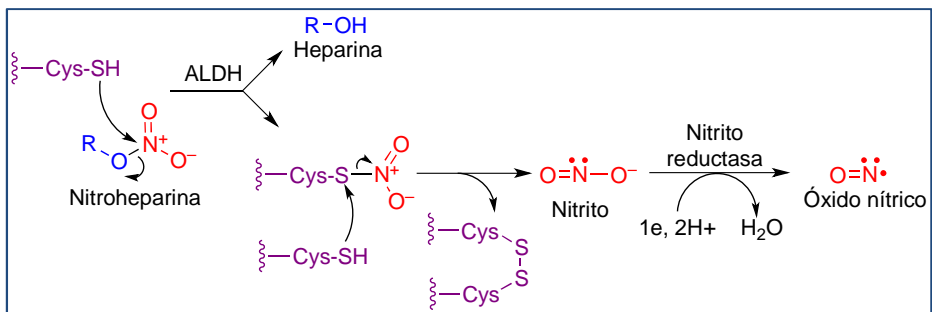


Figura 4. Mecanismo propuesto para la liberación de óxido nítrico a partir de nitroheparinas

INTRODUCCIÓN

Para la obtención de estos compuestos se plantean dos estrategias, que se resumen en la figura 5. En ambos casos el proceso se inicia con la transformación de la heparina de partida en el correspondiente heparinato de benzalconio para facilitar su solubilidad en medios orgánicos. La formación de O-nitro derivados en los grupos hidroxilo se ha planteado por tratamiento directo con ácido nítrico. Alternativamente, se puede lograr la incorporación de grupos nitro mediante la esterificación de los grupos carboxilato a través de su alquilación con nitratos de ω -haloalquilo.

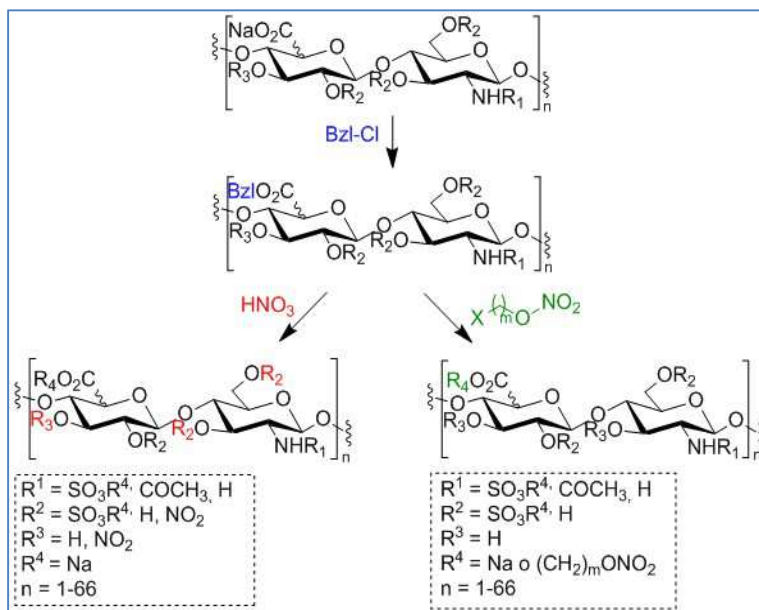


Figura 5. Propuesta sintética general

***SÍNTESIS GENERAL
DE COMPUESTOS***

4. Síntesis general de compuestos

Como se ha mencionado en el apartado de objetivos, las nuevas entidades químicas desarrolladas en este trabajo presentan la característica de que a la estructura sacarídica se unen covalentemente grupos nitro, por lo que se espera que sean capaces, en condiciones fisiológicas, de liberar óxido nítrico (NO) en concentraciones terapéuticamente efectivas. Esta metodología es aplicable a heparina sódica (HNF), heparinas de bajo peso molecular (HBPM), heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM) y oligosacáridos de heparina obtenidos tanto a partir de HNF, HBPM o HMBPM o por síntesis orgánica (fondaparinux, idraparinux, etc.).

El procedimiento de obtención utilizado [44], se inicia con la reacción de la heparina con cloruro de benzalconio, obteniendo una sal de amonio cuaternario de heparina, que es soluble en disolventes orgánicos tales como diclorometano, cloroformo, formamida, etc., lo que permite llevar a cabo su disolución y su reacción con una mezcla nitrante formada por ácido nítrico y anhídrido acético a una temperatura comprendida entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este ha sido el procedimiento empleado en la obtención de la mayoría de los productos descritos en esta tesis. Sin embargo, en un caso (BP-113/21), se ha incorporado el grupo nitro por reacción de la sal de heparina con un nitrato de haloalquilo (4-cloronitroxibutano, formándose el éster de heparina portador del grupo 4-nitrobutilo en los grupos carboxílicos de los ácidos urónicos.

En el esquema mostrado en la Figura 6 se observa que la región afectada del glicosaminoglicano es una unidad disacarídica general de una heparina, que puede ser no fraccionada, fraccionada, de bajo peso molecular o de muy bajo peso molecular.

En la figura 6 se resumen los métodos sintéticos utilizados.

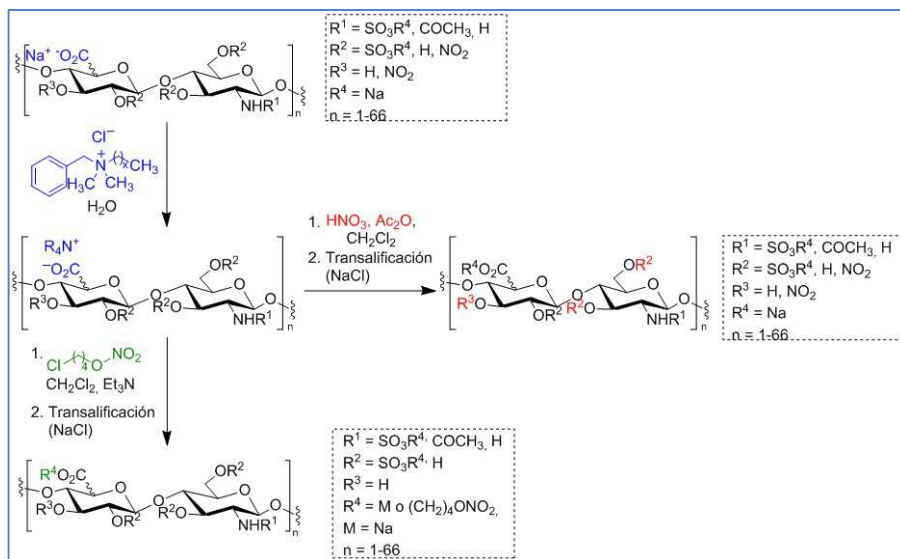


Figura 6. Rutas de síntesis de las heparinas precursoras de óxido nítrico

Se preparó también una heparina de muy bajo peso molecular (HMBPM), producto que ha sido utilizado como control en uno de los estudios. Para la obtención de estas heparinas, se utilizan reactivos que llevan a cabo una despolimerización selectiva, preservando el sitio de unión a la AT III, es decir, el pentasacárido, lo que les confiere la característica de tener valores de actividad anti Xa muy altos, y un muy bajo peso molecular, como consecuencia de la reducción considerable en el tamaño de las cadenas.

Para la despolimerización de heparinas, se utilizan habitualmente bases como el hidróxido de benciltrimetilamonio (Triton B). Sin embargo, en nuestro caso hemos estudiado el empleo de un nuevo reactivo con estructura de fosfaceno, la 2-*tert*-butilimino-2-dietilamino-1,3-dimetilperhidro-1,3,2-diazafosforina (BEMP). Los derivados de fosfaceno, que se consideran pertenecientes a la familia de las “superbases”, son bases nitrogenadas extremadamente fuertes a pesar de carecer de carga, y se utilizan, entre otras aplicaciones, para la despolimerización de macromoléculas mediante reacciones de β -eliminación [45].

En nuestro caso, el proceso de síntesis de HMBPMs se llevó a cabo por tratamiento de la heparina de partida con cloruro de benzalconio, seguida de una despolimerización mediante una reacción en medio orgánico con el reactivo BEMP y una transalifación final para obtener la heparina despolimerizada en forma de sal sódica (Figura 7).

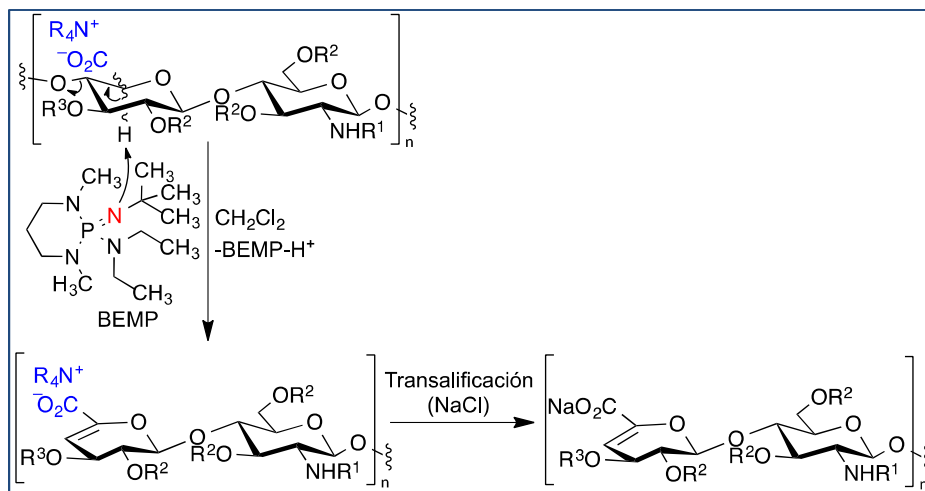


Figura 7. Síntesis de heparinas de muy bajo peso molecular a través de despolimerizaciones promovidas por bases de fosfaceno

En el desarrollo de esta línea de trabajo, se evaluó la realización del screening in vitro de los nuevos derivados obtenidos, sin embargo la búsqueda bibliográfica realizada así como la evaluación de diversas citoquinas (TGF- β , PDGF y FGF-2) en tejidos cercanos a la úlcera no mostraron una correlación directa entre ellas y el grado de curación de las heridas. Por tanto, la quimioteca de productos fue destinada a la experimentación animal. Se optó por realizar un diseño de pruebas encaminados a la evaluación in vivo de las nuevas entidades moleculares obtenidas, seleccionadas en función de diversos parámetros (peso y distribución molecular, actividad antitrombótica, grado de sustitución, etc).

El abordaje principal de esta línea de investigación se dirigió hacia el desarrollo de moléculas y formulaciones para el tratamiento de úlceras tórpidas derivadas de la diabetes, ya sean tópicas (úlceras de pie diabético) u oftálmicas (retinopatía diabética), y su posible extensión a otras úlceras crónicas con diferente etiopatogenia.

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

4.1. Materiales, Reactivos y Métodos:

4.1.1. Materiales y Reactivos:

Heparina sódica fue suministrada por Opocrin SPA (Módena, ITALIA) y Welding GmbH (Hamburgo, ALEMANIA). Bemiparina sódica fue suministrada por Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A. Cloruro de benzalconio, solución de cloruro benzalconio 50% en H₂O, diclorometano $\geq 98\%$ puro, Ácido nítrico fumante $\geq 99,5\%$ y metanol ACS reactivo $\geq 99,8\%$ fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Anhídrido acético $\geq 99,0\%$ y 2-propanol $\geq 99,0\%$ fueron suministrados por Fluka. Cloruro sódico grado síntesis y acetato sódico trihidratado grado síntesis fueron suministrados por Scharlab.

4.1.2. Métodos:

4.1.2.1. Espectrometría de infrarrojo

La espectroscopía infrarroja (Espectroscopía IR) es la rama de la espectroscopía que estudia la parte infrarroja del espectro electromagnético. Esta cubre un conjunto de técnicas, siendo la más común la espectroscopía de absorción. Así como otras técnicas espectroscópicas, puede usarse para identificar un compuesto e investigar la composición de una muestra. Esta se puede dividir según el tipo de la radiación que se analiza, en: Espectroscopía del Infrarrojo cercano, Espectroscopía del infrarrojo medio y Espectroscopía del infrarrojo lejano.

Esta espectroscopía se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se de una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión suponen cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces.

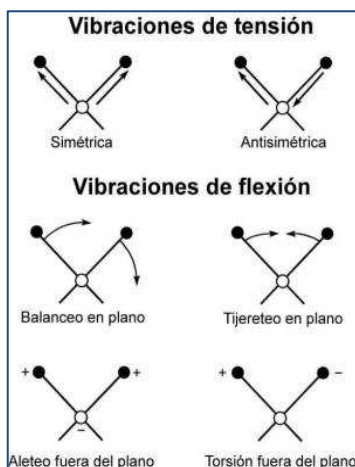


Figura 8. Tipos de vibraciones

En principio, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo.

De esta forma, analizando cuales son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en la zona del infrarrojo, podemos obtener información acerca de las moléculas que componen dicha sustancia.

La espectroscopía infrarroja tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo: detección de las moléculas presentes en el material.

En la zona del espectro electromagnético IR con número de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones entre únicamente dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados.

En la zona del espectro electromagnético IR con número de onda comprendidas entre 1300 y 400 cm^{-1} (infrarrojo lejano), la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales sumadas (multiplicidad de las bandas). Es la denominada zona de la huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.). En esta zona de longitudes de onda, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción.

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

En la caracterización de los compuestos obtenidos, con el estudio del espectro IR se ha estudiado la aparición de los grupos nitrados. Las señales que estamos buscando son las del grupo nitrato, correspondientes a la vibración de tensión asimétrica, comprendida entre $1625-1660\text{ cm}^{-1}$, y señales correspondientes a la vibración de tensión simétrica, comprendidas entre $1270-1285\text{ cm}^{-1}$:

Para poder evaluar las reacciones y comparar los espectros, se han estudiado en paralelo con los espectros de referencia de los productos de partida de la síntesis.

Para la espectrometría de absorción en la región infrarroja se ha usado un espectrómetro Jasco FT/IR 4100 dotado de un accesorio ATR (MIRacle, Pike technologies).

4.1.2.2. Cromatografía de exclusión molecular, GPC:

La cromatografía es una técnica que permite la separación de moléculas diferentes presentes en una misma muestra.

En cromatografía de exclusión molecular, la fase estacionaria consiste en polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. Las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por esos polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no pueden pasar a través de esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta.

Para evaluar el peso molecular de los productos se usa el equipo de HPLC Agilent 1100, equipado con bomba cuaternaria, horno termostático para albergar las columnas cromatográficas y detector termostático de índice de refracción (RID). Las columnas de cromatografía que se usan son TSK 2000 y TSK 3000 de dimensiones $7,8 \times 300\text{ mm}$ (TOSOH Bioscience) y como eluyente se usa una disolución acuosa de NaCl $0,1\text{ M}$.

La muestra se inyecta al $0,5\%$ en NaCl $0,1\text{ N}$, el flujo de inyección es 1 ml/minuto y la temperatura a la que está el horno y el detector de índice de refracción (RID) es $30\text{ }^\circ\text{C}$.

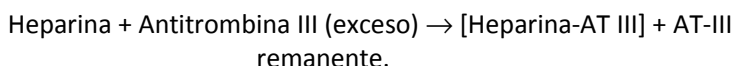
4.1.2.3. Actividades anti Factor-Xa y anti Factor-IIa

La actividad anticoagulante de la Heparina de Bajo Peso Molecular se determina in vitro por dos valoraciones, las cuales definen su capacidad para acelerar la inhibición del factor Xa e inhibición de la trombina, o factor IIa, a través de la antitrombina III (cofactor de la heparina)

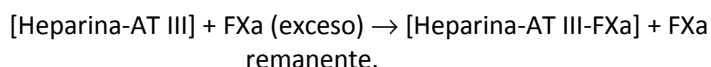
Para determinar las actividades anti Factor-Xa y anti Factor-IIa de los productos, las muestras a analizar se preparan en disolución acuosa a una concentración de 1 mg/mg. Los reactivos que intervienen son Antitrombina III, Factor Xa, y sustrato cromogénico S-2765 para Xa, y Antitrombina III, Trombina y sustrato cromogénico 2238 para IIa.

El análisis de la actividad anti F-Xa consiste en el desarrollo in vitro de la reacción que tiene lugar, para la inhibición del Factor Xa, por el complejo de Heparina y Antitrombina III. Esta reacción sucede en tres etapas:

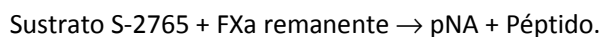
- Primera etapa: La Heparina de bajo peso molecular se incuba a 37 °C con un exceso de Antitrombina III formándose un complejo:



- Segunda etapa: El complejo [Heparina-AT III] se incuba a 37 °C con un exceso de Factor Xa formándose un segundo complejo:



- Tercera etapa: Incubación a 37 °C con el sustrato cromogénico. El factor Xa remanente hidroliza el sustrato cromogénico (S-2765) liberando el grupo cromóforo paranitroanilina (pNA):



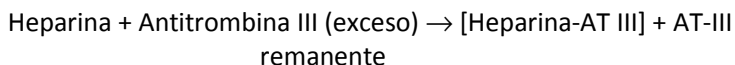
Transcurrido el tiempo de incubación con el sustrato cromogénico, se añade ácido acético al 75% para detener la reacción y proceder al análisis espectrofotométrico a 405 nm.

El nivel de actividad residual del factor Xa es evaluado en la tercera etapa con la adición del sustrato cromogénico. La concentración de dicho sustrato ha de ser suficiente para obtener un aumento lineal de la absorbancia medida a 405 nm.

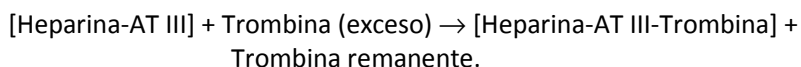
SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

El análisis de actividad anti F-IIa consiste en el desarrollo in vitro de la reacción que tiene lugar, para la inhibición de la trombina, por el complejo de heparina y antitrombina III. Esta reacción sucede en tres etapas:

- Primera etapa: La heparina de bajo peso molecular se incubaba a 37 °C con un exceso de Antitrombina III formándose un complejo:



- Segunda etapa: El complejo [Heparina-AT III] se incubaba a 37 °C con un exceso de trombina formándose un segundo complejo:



- Tercera etapa: Incubación a 37 °C con el sustrato cromogénico. La trombina remanente hidroliza el sustrato cromogénico (S-2238) liberando el grupo cromóforo paranitroanilina (pNA):



Transcurrido el tiempo de incubación con el sustrato cromogénico, se añade ácido acético al 75% para detener la reacción y proceder al análisis espectrofotométrico a 405 nm.

El nivel de actividad residual de la trombina es evaluado en la tercera etapa con la adición del sustrato cromogénico. La concentración de dicho sustrato debe ser suficiente para obtener un aumento lineal de la absorbancia medida a 405 nm.

4.1.2.4. Resonancia Magnética Nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es la herramienta analítica que proporciona mayor información estructural y estereoquímica en un tiempo asequible. La técnica no es destructiva y tiene aplicaciones en todas las áreas de la Química y en algunas de la Biología.

La Resonancia Magnética Nuclear es una espectroscopía de absorción cuyo fundamento es la absorción de energía (radiofrecuencias) por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Las partes fundamentales de un espectrómetro de RMN son un imán, actualmente una bobina superconductora, que suministra el campo magnético principal, un oscilador de radiofrecuencias que suministra la energía necesaria para cambiar la orientación de los núcleos, una bobina detectora que recibe las señales y un sistema informatizado que gobierna todo el aparato y que incluye un sistema de amplificación y registro.

Entre los núcleos más frecuentes en los compuestos orgánicos son magnéticamente activos el protón (^1H), carbono (^{13}C), nitrógeno (^{15}N), fósforo (^{31}P) y flúor (^{19}F).

Las muestras, generalmente, son disoluciones en disolventes que no tengan protones (^1H). Frecuentemente se usan el deuterocloroformo, hexadeuterodimetilsulfóxido, óxido de deuterio, deuterobenceno, deuteropiridina y otros.

El alcance de esta técnica para el análisis de estos compuestos funcionalizados con grupos nitro es bastante limitado. No obstante, se han realizado para poder disponer de una caracterización más completa, y poder detectar cambios estructurales entre los productos obtenidos y las muestras de referencia, que permitan evaluar si las modificaciones estructurales están relacionadas con las reacciones llevadas a cabo.

Los análisis se realizaron en el centro C.A.I. Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico, de la Universidad Complutense de Madrid, por el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia.

El equipo utilizado para el análisis RMN es el espectrómetro 500AV-Brucker. Las muestras se disuelven en agua deuterada y los experimentos ^1H RMN se han adquirido en el espectrómetro mencionado de 500 MHz, a 25 °C, con 32 acumulaciones, 90° de pulso y el espectro centrado a 4,5 ppm.

4.1.2.5. Análisis elemental

El análisis elemental es una técnica que proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en un amplio rango de muestras de naturaleza orgánica e inorgánica tanto sólidas como líquidas. La técnica está basada en la completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000 °C. Los diferentes productos de combustión CO_2 , H_2O y N_2 , son

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

transportados mediante el gas portador (He) a través de un tubo de reducción y después selectivamente separados en columnas específicas para ser luego desorbidos térmicamente. Finalmente, los gases pasan de forma separada por un detector de conductividad térmica que proporciona una señal proporcional a la concentración de cada uno de los componentes individuales de la mezcla.

Los análisis elementales se realizaron en el C.A.I. Microanálisis Elemental de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia y Facultad de Ciencias Químicas.

En la caracterización de los compuestos obtenidos, el análisis elemental se ha estudiado en paralelo con los productos de partida de la síntesis, para comprobar cómo varían los % de los elementos estudiados en función del grado de nitración.

Cuando la nitración se realiza con éxito, el %N debería verse aumentado. Una forma de medir del grado de nitración de los productos es la relación de grupos nitrados por unidad sacarídica, $\text{ONO}_2/\text{unidad sacarídica}$. Este parámetro se obtiene por comparación entre el contenido de nitrógeno en el producto nitrado y sin nitrar:

$$\frac{\frac{\text{Grupos nitro}}{\text{Unidad sacarídica}}}{\frac{\text{Átomos de N}}{\text{Unidad sacarídica (producto nitrado)}}} = \frac{\text{Átomos de N}}{\text{Unidad sacarídica (producto no nitrado)}}$$

Puesto que el número de carbonos que tiene la unidad sacarídica es 6, para calcular el número de átomos de nitrógeno por unidad sacarídica se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Átomos de N}}{\text{Unidad sacarídica}} = \frac{\frac{\%N}{\text{Peso atómico N}}}{6 \frac{\%C}{\text{Peso atómico C}}}$$

Para una heparina sin nitrar, la relación átomos N/unidad sacarídica, en el análisis elemental se ha de obtener un valor de aproximadamente 0,5, que corresponde al átomo de nitrógeno de la glucosamina constituyente de la unidad disacarídica.

Por tanto, restando a la relación átomos N/unidad sacarídica del producto nitrado obtenido, la cantidad de 0,5 unidades, obtenemos la relación de los grupos nitrados/unidad sacarídica = $\text{ONO}_2/\text{unidad sacarídica}$.

4.2. Obtención de los compuestos:

Los compuestos obtenidos se han codificado con un sistema alfanumérico. Cada código está formado por una parte inicial que se corresponde con el material de partida, seguido de un guión, las letras o números que codifican a su vez el método de obtención empleado, y la parte final del código corresponde al número de lote correlativo obtenido del producto de partida y el método.

4.2.1. Preparación de Heparinatos de Benzalconio

HO854-BZL/1L

50 g de heparina sódica lote HO854 se disuelven en 360 mL de agua. Sobre esta solución se añade durante 35 minutos una solución de cloruro de benzalconio (110,6 g en 110 mL de agua). La solución se mantiene 60 minutos en agitación y se deja reposar. El líquido sobrenadante se retira y el precipitado se lava tres veces con agua, se liofiliza y se obtienen 128,18 g del heparinato de benzalconio.

BEMI-BZL/10L

50 g de Bemiparina sódica lote BP02807C se disuelven en 360 mL de agua. Sobre esta solución se añade durante 35 minutos una solución de cloruro de benzalconio (110,62 g en 110,62 mL de agua). La solución se mantiene 60 minutos en agitación y se deja reposar. El líquido sobrenadante se retira y el precipitado se lava tres veces con agua, se liofiliza y se obtienen 123,74 g del heparinato de benzalconio.

HO5106C-BZL/81L

20 g de sal de benzalconio lote HO5106C-BZL (producto de fabricación, formado a partir de la heparina sódica lote HO5106C) se disuelven en 100 ml de bromo-clorometano. Se precipitan sobre 100 ml de una solución de acetato sódico en metanol al 10% w/v. Se obtienen 7,17 g de producto. A continuación se pesan 5 g del producto obtenido y se disuelven en 36 mL de Agua. Sobre esta solución se añade durante 35 minutos una solución de cloruro de benzalconio (11,07 g en 11,07 mL de agua). La solución se mantiene 60 minutos en agitación y se deja reposar. El líquido sobrenadante se retira y el precipitado se lava tres veces con agua, se liofiliza y se obtienen 9,91 g del heparinato de benzalconio.

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

HW1214-BZL/1L

100 g de Heparina sódica lote HW1214 se disuelven en 725 mL de agua. Sobre esta solución se añade durante 35 minutos una solución de 439,6 g cloruro de benzalconio al 50% w/v en agua). La solución se mantiene 60 minutos en agitación y se deja reposar. El líquido sobrenadante se retira y el precipitado se lava tres veces con agua, se liofiliza y se obtienen 233 g del heparinato de benzalconio.

4.2.2. Nitroderivados por nitración con Nitrato de Acetilo

HO5106C-116, lote 1

En un matraz de 50 mL, se añaden 0,26 mL de anhídrido acético a 5 mL de diclorometano a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trascorridos 10 minutos con agitación y a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añaden 0,10 mL de ácido nítrico. La mezcla se agita y se mantiene a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, y después se agita y mantiene a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora más. A continuación se gotea durante 5 minutos 1,98 g de la sal de benzalconio lote HO5106C-BZL/81L disuelta previamente en 20 mL de diclorometano a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se agita y se mantiene la reacción a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. El crudo obtenido se añade sobre 12 mL AcONa/MeOH 10% (w/v) y se deja 16 horas en reposo. Se separa el sólido por centrifugación y se lava con dos volúmenes de $^i\text{PrOH}$. El sólido se redissuelve en 20 mL de agua purificada, se neutraliza con NaOH 1N, se añaden y disuelven 2 g NaCl, se añaden 3 volúmenes (3V) $^i\text{PrOH}$ y se deja 24 horas en reposo. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtienen 0,89 g.

El producto obtenido presenta las siguientes características:

- Análisis por GPC:
Peso molecular: 15.382 Da
- Actividad anti-FXa:
18,7 UI/mg
- Actividad anti-FIIa:
25 UI/mg
- Ratio actividad anti-FXa/anti-FIIa:
0,75
- Estudio espectroscópico en el infrarrojo:
FT/IR: $\bar{\nu}_{\text{ONO}_2}=1275,7\text{ cm}^{-1}$; $\bar{\nu}_{\text{NO}}=1628,6\text{ cm}^{-1}$.

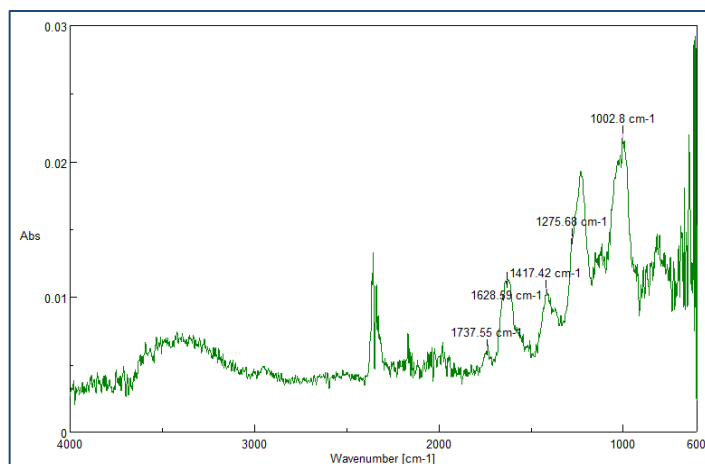


Figura 9. Espectro IR producto HO5106C-116, lote 1

En el espectro IR aparecen las señales a $1275,7 \text{ cm}^{-1}$ y $1628,6 \text{ cm}^{-1}$, que están dentro de la zona del espectro comprendida entre $1270\text{-}1285 \text{ cm}^{-1}$ (ONO_2) y $1625\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$ (NO), confirmando la nitración del producto (ver comparación abajo con el espectro IR del producto de partida).

- Estudio espectroscópico en el infrarrojo de producto de partida:
FT/IR: $\bar{\nu}_{\text{ONO}_2}=1218.79\text{cm}^{-1}$; $\bar{\nu}_{\text{NO}}=1611,23\text{cm}^{-1}$.

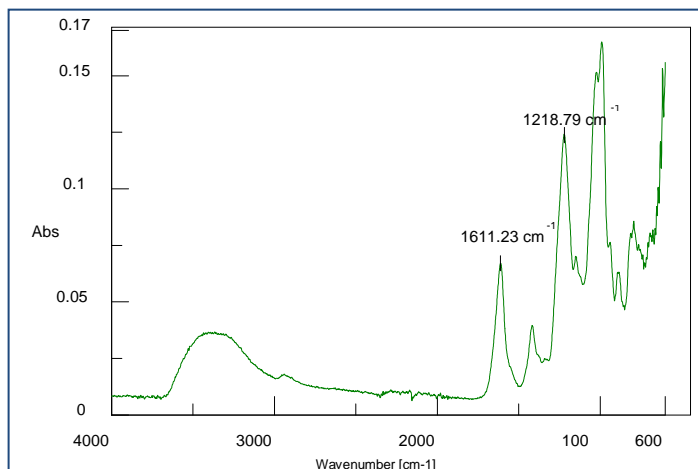


Figura 10. Espectro IR de referencia del producto de partida,

- Análisis elemental:
%C=6,84; %H=1,38; %N=1,25; %S=3,01. Átomo N/unidad sacarídica: 0,94 y por tanto ONO_2 /unidad sacarídica: 0,44

El análisis elemental de la heparina de partida es el siguiente:
%C=20,44; %H=3,93; %N=2,13; %S=7,18. Átomo N/unidad sacarídica:

0,56

El contenido en nitrógeno en el producto obtenido se ve aumentada casi al doble, confirmándose la nitración del producto.

HO5106C-116, lote 2

A una solución de 1 g de la sal de benzalconio lote HO5106C-BZL/81L disuelto en 20 de diclorometano y mantenida a 0 °C, se le añade 0,57 mL de anhídrido acético y 0,22 mL de ácido nítrico y la reacción se mantiene durante 24 h a 0 °C. Transcurrido ese tiempo, la solución se añade sobre 6 mL de solución de acetato sódico al 10 % en metanol y se deja 16 horas en reposo. Se separa el sólido por centrifugación y se lava con dos volúmenes de MeOH. El sólido se redissuelve en 10 mL de agua purificada, se neutraliza con NaOH 1N, se añaden 2 g NaCl y 3V de MeOH y se deja 24 horas en reposo. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío a 35°C. Se obtienen 0,20 g de precipitado. El producto obtenido presenta las siguientes características:

- Análisis por GPC:
Peso molecular medio Mw 7.251 Da
- Actividad anti factor Xa:
18 UI/mg
- Estudio espectroscópico en el infrarrojo:
FT/IR: $\bar{\nu}_{\text{ONO}_2}=1276,7\text{cm}^{-1}$; $\bar{\nu}_{\text{NO}}=1640,2\text{cm}^{-1}$.

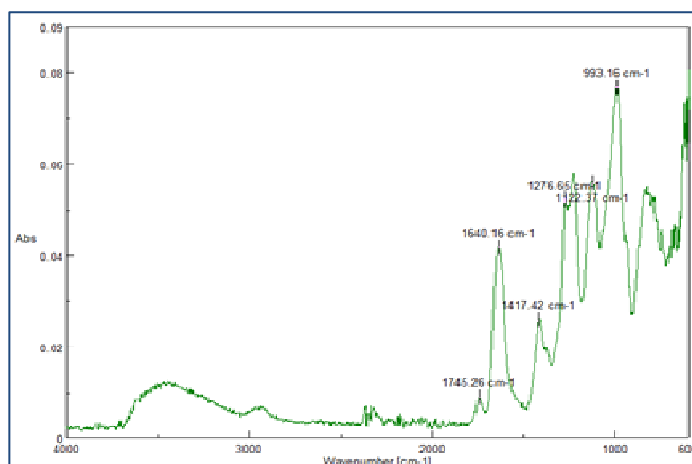


Figura 11. Espectro IR producto HO5106C-116, lote 2

En el espectro IR se aprecian señales a $1276,7\text{ cm}^{-1}$ y $1640,2\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a los grupos ONO_2 y NO respectivamente, indicativas de que el producto se ha nitrado.

- Análisis elemental:
%C=22,37; %H=3,97; %N=6,22; %S=6,53. ONO_2 /unidad sacarídica: 0,93

Del análisis elemental podemos observar que el %N es aproximadamente 3 veces superior (6,22%) al del producto de referencia heparina (2,13%), indicativo de que el producto se ha nitrado.

HO5106C-116, lote 5

En un matraz de 500 mL, se enfría a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añade 1,71 mL de Ac_2O en 30 mL de cloruro de metileno. Se agita y enfría durante 30 minutos a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se gotea 0,66 mL de HNO_3 . Se deja una hora a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se deja una hora a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se añade 3 g de la sal de benzalconio lote HO516C-BZL/81L disueltos en 60 mL de cloruro de metileno. Se deja 24 horas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras 24 horas se añade sobre 50 mL de AcONa /metanol al 10% w/v. Se centrifuga. Se lava con 2 volúmenes de $^i\text{PrOH}$. El sólido se disuelve en 30 mL de agua purificada. Se neutraliza. Se añaden 3 g de NaCl . Se añaden 300 mL de $^i\text{PrOH}$. Se filtra y se seca a vacío. Se obtiene 3,08 g.

Los 3,08 g se disuelven en 10 mL. Se siembran en 3500 mL de Biogel P-2. $V_e = 1025\text{ mL}$. $\phi = 0,42\text{ mL/min}$. Se concentra el producto eluido en el rotavapor, se congela y se liofiliza. Se obtiene 0,967 g. El producto obtenido tiene las siguientes características:

- Espectro $^1\text{H-RMN}$

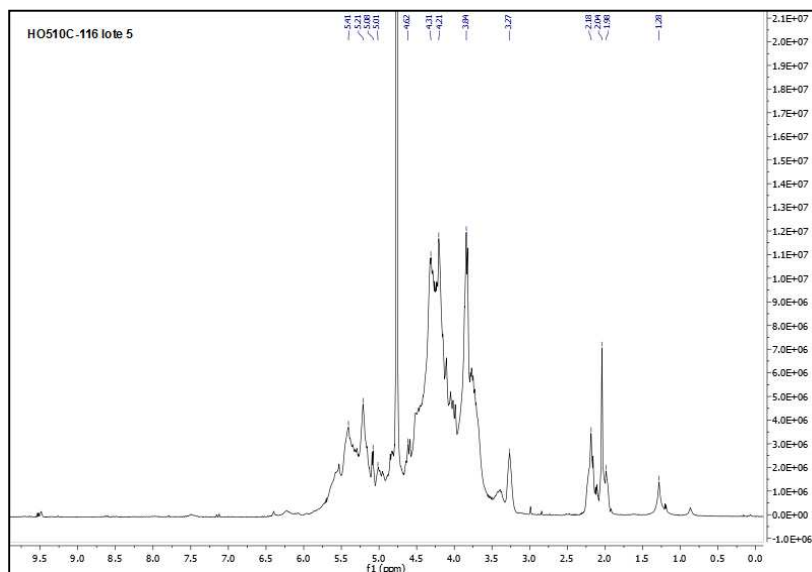


Figura 12. Espectro RMN producto HO5106C-116, lote 5

En el espectro del producto se observa la zona de señales anómericas (5,41 ppm para los restos de glucosamina, 5,21 ppm para los de ácido 2-O-sulfoidurónico), la zona de protones H2 a H6 (con principales señales a 4,31 ppm, 4,21 ppm, 3,84 ppm), y la señal de acetilo de la N-acetilglucosamina (2,04 ppm). A 1,98 ppm se detecta la señal de acetato posiblemente como restos del tratamiento con anhídrido acético.

En comparación se muestra el espectro de ^1H RMN de la heparina de partida.

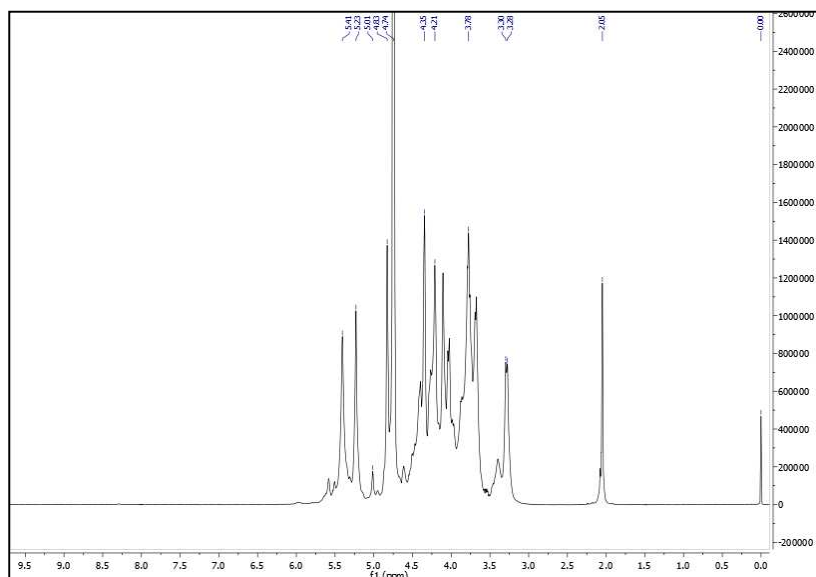


Figura 13. Espectro IR de referencia del producto de partida, heparina

En la siguiente tabla se muestran los desplazamientos químicos de las señales más importantes tanto para el producto nitrado como para el producto de partida.

Tabla 2. Asignaciones de las principales señales en ^1H NMR

Desplazamiento químico (δ) HO5106C-116/5, ppm	Desplazamiento químico (δ) HO5106C, ppm	Asignación
5,41	5,41	H1 ANS6S
5,21	5,23	H1 I2S
5,01	5,01	H1 I
----	4,83	H5 I2S
4,34	4,35	H6 ANS6S
4,21	4,21	H6' ANS6S
3,27	3,29	H2 ANS
2,04	2,05	NAC

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

- Análisis por GPC:
HPLC-TSK2000
Peso molecular medio Mw 4214
Distribución molecular de cadenas
<2000=29,82%;
2000-6000=48,71%;
>6000=21,48%

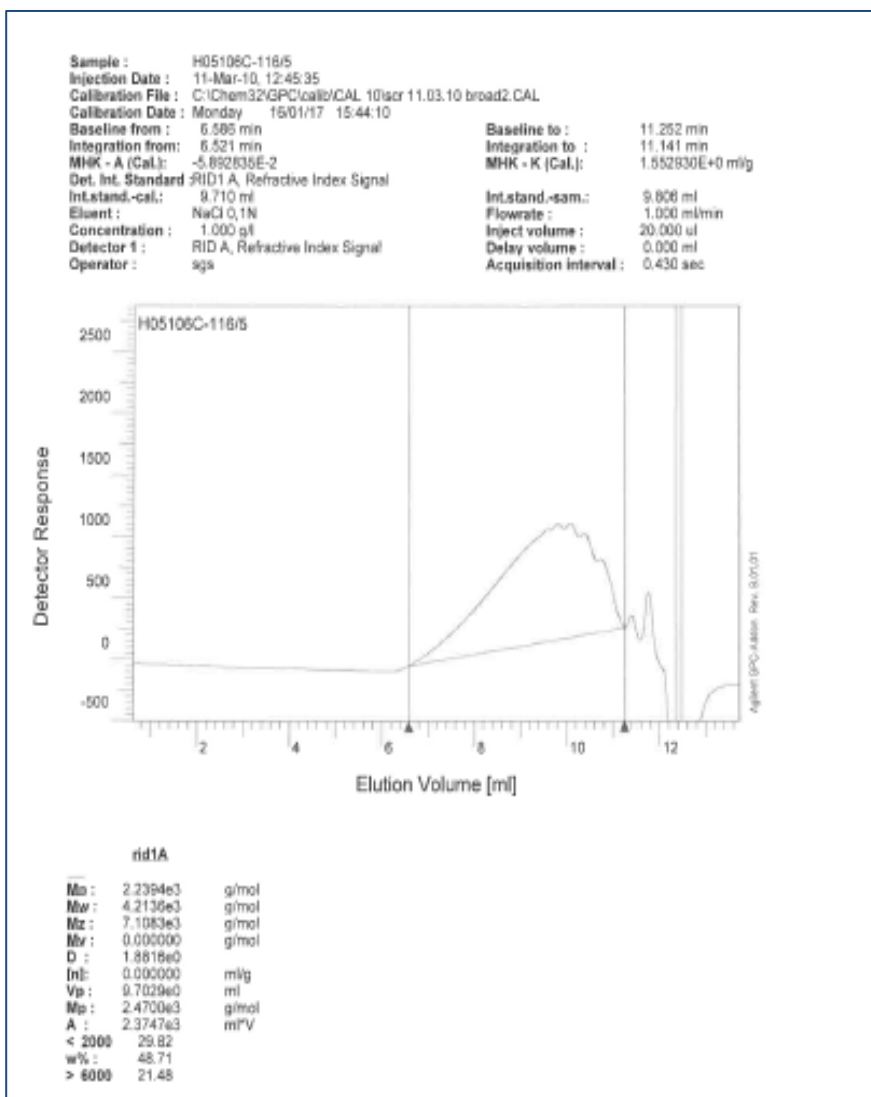


Figura 14. Cromatograma GPC producto HO5106C-116, lote 5

En el cromatograma se observa que el producto se ha despolimerizado, con un Mw de 4214 Da vs el Mw de la heparina que es aproximadamente 15.000 Da.

- Estudio de espectroscópico en el infrarrojo:
FT/IR: $\bar{\nu}_{\text{ONO}_2} = 1274.72 \text{ cm}^{-1}$; $\bar{\nu}_{\text{NO}} = 1628.59 \text{ cm}^{-1}$.

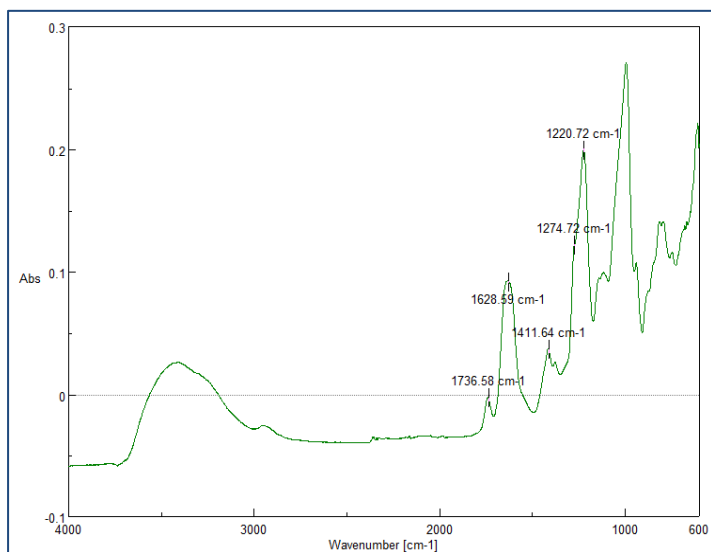


Figura 15. Espectro IR producto HO5106C-116, lote 5

En el espectro IR aparecen las señales a $1274,72 \text{ cm}^{-1}$ y $1628,59 \text{ cm}^{-1}$, que están dentro de la zona del espectro comprendida entre $1270\text{-}1285 \text{ cm}^{-1}$ (ONO_2) y $1625\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$ (NO), por lo que se puede concluir que el producto se ha nitrado.

Preparación del producto HW1214-116/2

En un erlenmeyer de 500 mL se disuelve 40 g de la sal de benzalconio lote HW1214-BZL/1L en 400 mL de cloruro de metileno a 0°C. En un reactor de 1 L con camisa termostática y refrigerado por un criotermostato, se diluye 22,8 mL de Ac₂O en 400 mL de cloruro de metileno a una temperatura < -8 °C, se añade 8,80 mL de HNO₃ y se agita a temperatura < -8 °C durante una hora. Se deja agitando a Tª de 0 °C durante 4,5 horas. Se gotea durante 40 minutos los 40 g de HW1214-BZL/1L a 0 °C. Se deja agitando 17,5 horas a 0 °C. Se añade el crudo sobre 240 mL de AcONa/metanol al 10%. Se deja reposar. Se centrifuga. Se lava con 120 mL de ⁱPrOH. El sólido se disuelve en 200 mL de agua MilliQ. Se mide el pH= 4,05. Se ajusta con NaOH 5N. pH= 7,26. Se disuelve 20 g de NaCl. Se añade exceso de ⁱPrOH. (V aproximado = 1400 mL). Se deja reposar. Se elimina el líquido sobrenadante. Se seca y se obtiene 22,89 g. El producto tiene las siguientes características:

- Estudio espectroscópico en el infrarrojo:
FT/IR: $\bar{\nu}_{\text{ONO}_2} = 1273.75 \text{ cm}^{-1}$, $\bar{\nu}_{\text{NO}} = 1643.05 \text{ cm}^{-1}$.

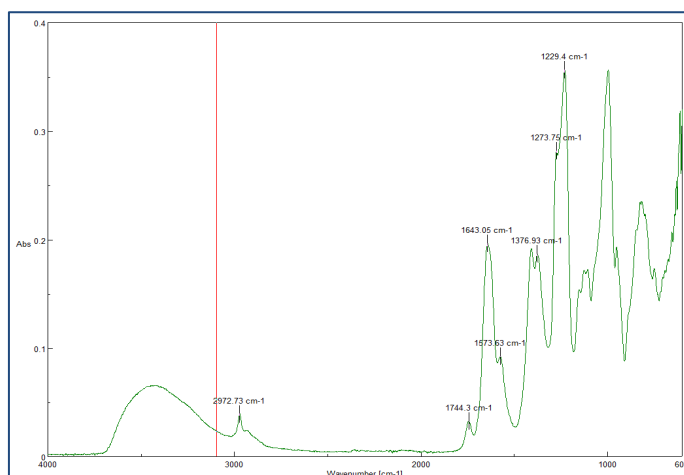


Figura 16. Espectro IR producto HW1214-116/2

En el espectro IR aparecen las señales a $1273,75 \text{ cm}^{-1}$ y $1643,05 \text{ cm}^{-1}$, que están dentro de la zona del espectro comprendida entre $1270\text{-}1285 \text{ cm}^{-1}$ (ONO₂) y $1625\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$ (NO), por lo que se puede concluir que el producto se ha nitrado.

- Análisis de cromatografía GPC:

HPLC-TSK 2000

Peso molecular medio Mw 2.607 Da, que indica que en el proceso se ha despolimerizado.

HO854-116, lote 41

En un erlenmeyer de 25 ml, se diluyen 0,5 ml de ácido nítrico fumante en 10 ml de diclorometano a temperatura ambiente. Se añaden 3 gotas de etilendiamina. Se agita 15 minutos. Se hace IR y se comprueba que no hay etilendiamina. El crudo sigue amarillo. Se añaden 3 gotas de etilendiamina. Se agita 15 minutos. Se hace IR y se comprueba que no hay etilendiamina. El crudo está incoloro. Se extraen 8 ml del crudo, evitando coger el producto grasificado de las paredes. A los 8 ml se añade 1 ml de Ac_2O , se agita 5 minutos. Se añade 1 g de la sal de benzalconio lote HO854-BZL/1L y se deja 1 hora a temperatura ambiente. Se gotea sobre 6 ml de AcONa/MeOH y se centrifuga. Se lava con 10 ml de agua purificada. Se neutraliza y se añade 1 g de NaCl . Se añaden 60 ml de $^i\text{PrOH}$. Se filtra y se seca a vacío. Se obtienen 0,20 g.

- Estudio espectroscópico en el infrarrojo:
FT/IR: $\bar{\nu}_{\text{ONO}_2} = 1269.9 \text{ cm}^{-1}$; $\bar{\nu}_{\text{NO}} = 1643.05 \text{ cm}^{-1}$.

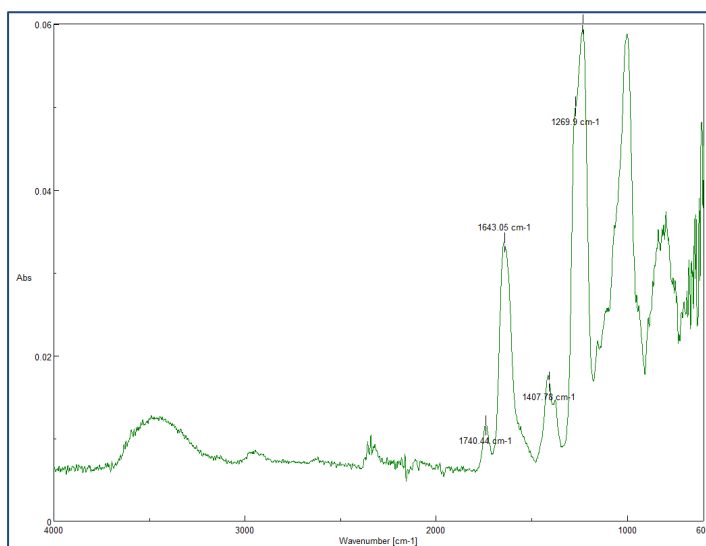


Figura 17. Espectro IR producto HO854-116,lote 41

En el espectro IR aparecen las señales a $1269,9 \text{ cm}^{-1}$ y $1643,05 \text{ cm}^{-1}$, que están dentro de la zona del espectro comprendida entre $1270\text{-}1285 \text{ cm}^{-1}$ (ONO_2) y $1625\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$ (NO), por lo que se puede concluir que el producto se ha nitrado.

- Análisis por GPC:
HPLC- TSK 3000, Peso molecular medio Mw 4.786
- Actividad anti Factor Xa:
2,3 UI/mg

HO854-116 lote 59

En un matraz de 250 mL se diluye 2,28 mL de Ac_2O en 40 mL de cloruro de metileno a $-10\text{ }^\circ\text{C}$. Se añade 0,88 mL de HNO_3 . Se deja 45 minutos a $-10\text{ }^\circ\text{C}$. Se deja 45 minutos a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Se añade 4 g de la sal de benzalconio lote HO854-BZL/1L disuelto en 80 mL de cloruro de metileno a $0\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 minutos. Se deja 16 horas a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Se añade sobre 24 mL de AcONa /metanol al 10%. Se centrifuga. Se lava con 80 mL de $^i\text{PrOH}$. Se centrifuga. Se disuelve el sólido en 40 mL de agua. Se neutraliza. Se añade ClNa y 240 mL de $^i\text{PrOH}$. Se filtra y se seca a vacío. Se obtiene 1,79 g. El producto obtenido tiene las siguientes características:

- Análisis de cromatografía GPC:
Peso molecular medio M_w 2.379 Da
- Estudio espectroscópico en el infrarrojo:
FT/IR: $\bar{\nu}_{\text{ONO}_2} = 1279.54\text{ cm}^{-1}$, $\bar{\nu}_{\text{NO}} = 1646.91\text{ cm}^{-1}$.

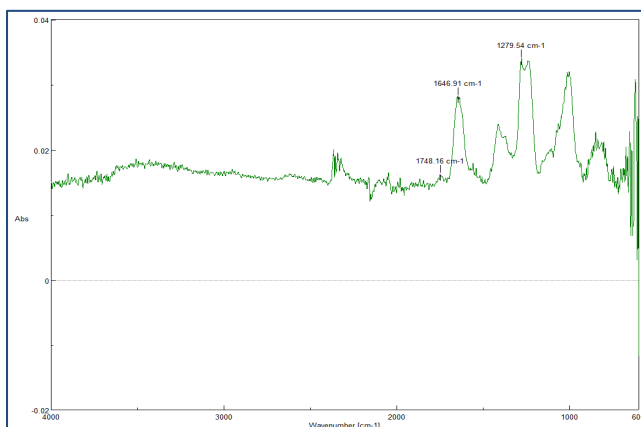


Figura 18. Espectro IR producto HO854-116 lote 59 L

En el espectro IR aparecen las señales a $1279,54\text{ cm}^{-1}$ y $1646,91\text{ cm}^{-1}$, que están dentro de la zona del espectro comprendida entre $1270\text{-}1285\text{ cm}^{-1}$ (ONO_2) y $1625\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ (NO), por lo que se puede concluir que el producto se ha nitrado.

- Actividad anti-FXa:
0,6 UI/mg
- Actividad anti-FIIa:
0 UI/mg

4.2.3. Nitroderivados por Esterificación

BP-116, lote 21

En un erlenmeyer de 25 mL, se disuelven 1,25 g de la sal de benzalconio lote BEMI-BZL/10L en 12,5 mL de cloruro de metileno. Se agita y se calienta a 35 °C. Se añade 0,24 mL de Et₃N. Se adiciona gota a gota una disolución de 0,27 g de 4-cloro-nitroxibutano (sintetizado a partir del 4-cloro-1-butanol) en 2,5 mL de cloruro de metileno. A las 24 horas se añaden 0,24 mL de Et₃N. Se añade 0,27 g de 4-cloro-nitrooxibutano disuelto en 2,5 mL de cloruro de metileno. Se deja agitando a 35 °C. A las 24 horas se añaden 0.24 mL de Et₃N. Se añade 0,27 g adicionales de 4-cloro-nitroxibutano disuelto en 2,5 mL de cloruro de metileno. Se deja agitando a 35 °C. A las 24 horas se da por finalizada la reacción. El sólido blanco se disuelve en 12,5 ml de agua purificada. Se mide el pH= 8,2. Se neutraliza. Se disuelve 1,25 g de NaCl en exceso de metanol. Se deja reposar. Se elimina la mayor parte del líquido sobrenadante. Se añade metanol fresco. Se deja reposar. Se centrifuga y se seca. Se obtienen 0,42 g. El producto obtenido presenta las siguientes características:

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

- Análisis por GPC:

HPLC-TSK2000

Peso molecular medio Mw 2587

Distribución molecular de cadenas:

<2000=31.10%; 2000-6000=68.78%; >6000=0.12%

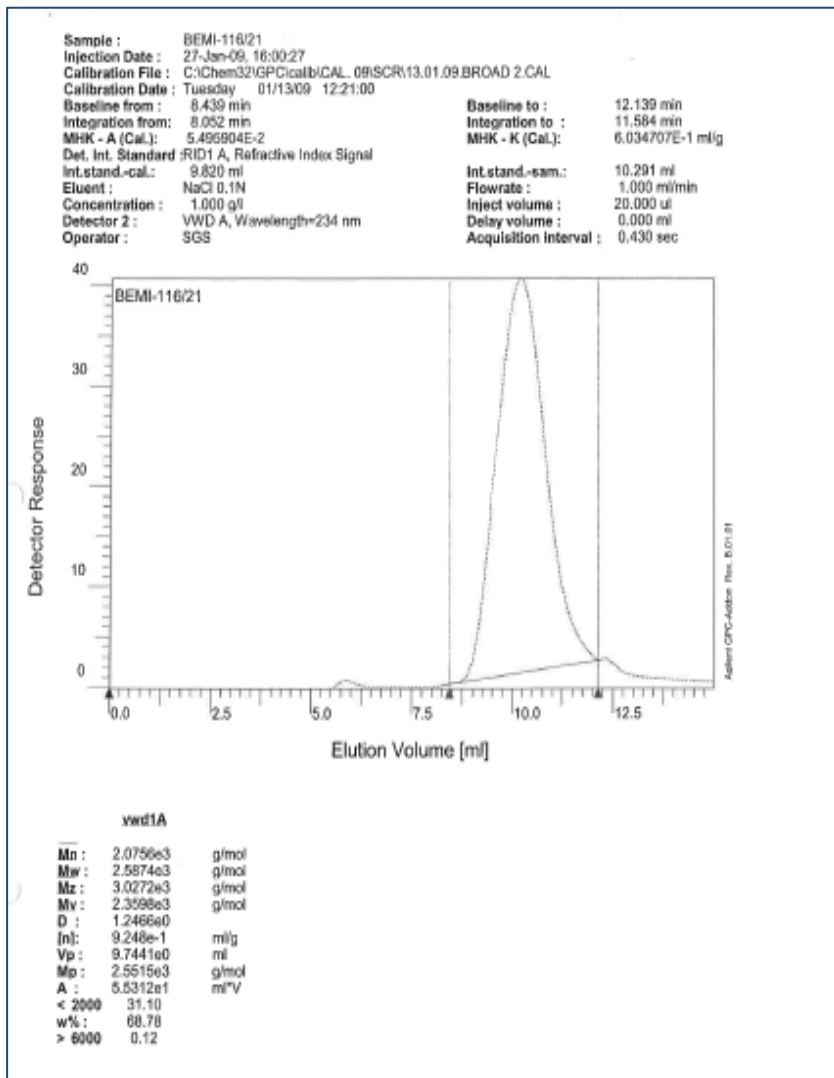


Figura 19. Cromatograma GPC producto BP-116, lote 21

El producto obtenido se ha despolimerizado, lo que se puede comprobar por el valor del peso molecular medio Mw 2587 Da. Consecuentemente a esta bajo valor de peso molecular, el % mayoritario de las cadenas se encuentra por debajo de 6000 Da, indicativo de un valor de actividad anti-FIIa residual.

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

En la zona de los anoméricos, se observan bastantes cambios ya que aparece una señal a 6,33 ppm que parece como si parte de la señal correspondiente al H4- Δ U2S se desplazara. Curiosamente esto mismo se observa para las señales H1- y H2- Δ U2S, donde se pueden ver dos señales cercanas a menor campo.

Si se calculan las integrales de éstas señales se obtiene una relación de aprox. 76 % sin sustituir y aprox. 24 % sustituido.

Asímismo se puede observar un ligero desplazamiento y ensanchamiento en la señal correspondiente a los UroA.

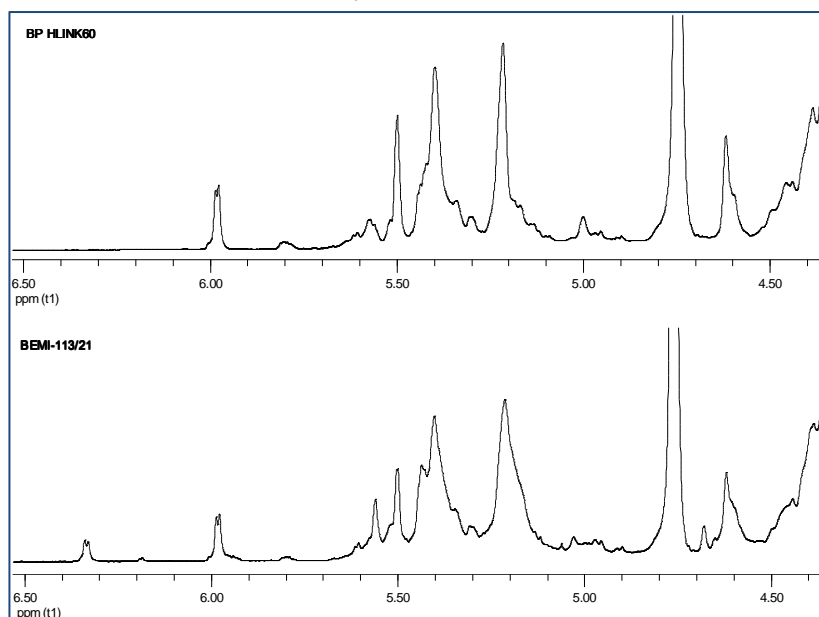


Figura 22. Producto BP-116, lote 21 (abajo) vs BP (arriba)

En el espectro del producto obtenido se observa además la presencia de señales a 3,35, 1,91 y 1,29 ppm, consistentes con la cadena alifática introducida.

En la siguiente tabla se muestran los desplazamientos químicos de las señales más importantes tanto para el producto nitrado como para el producto de partida.

Tabla 3. Asignaciones de las principales señales en ^1H NMR

Desplazamiento químico (δ) BP-116/21, ppm	Desplazamiento químico (δ) BP, ppm	Asignación
6,33	----	H4 Δ U2S??
6,18	----	H4 Δ U??
5,98	5,98	H4 Δ U2S
5,79	5,80	H4 Δ U
5,56	5,56	H1 1,6-AnM
5,50	5,50	H1 Δ U2S
5,40	5,41	H1 ANS6S
5,21	5,21	H1 I2S
5,03	5,00	H1 I
4,76	4,83	H5 I2S
4,62	4,62	H1 G
4,34	4,34	H6 ANS6S
4,21	4,21	H6' ANS6S
3,27	3,28	H2 ANS
2,04	2,04	NAc

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

- Espectro HSQC:

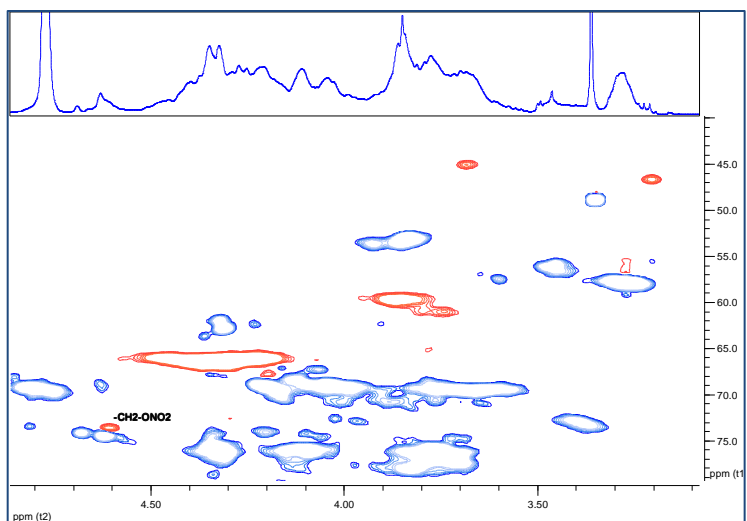


Figura 23. HSQC producto BP-116, lote 21

En HSQC aparece un metileno a 4,606 – 73,516 ppm consistente con un metileno contiguo al grupo $-\text{ONO}_2$ y otra señal a 4,196 – 67,754 ppm, consistente con un metileno de éster $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$.

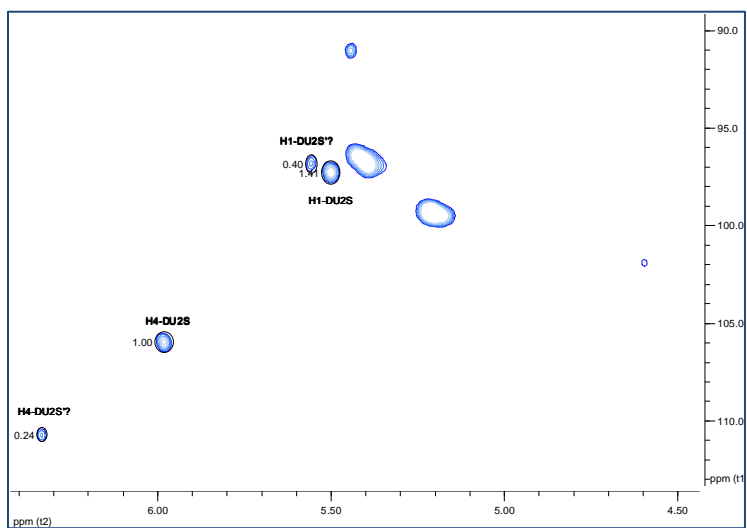


Figura 24. HSQC producto BP-116, lote 21

Así mismo en la zona de protones anoméricos aparece una señal correspondiente a H4-C4 ΔU2S a 6,34 (¹H-RMN) y 113,7 (¹³C-RMN) ppm consistente con una estructura del tipo:

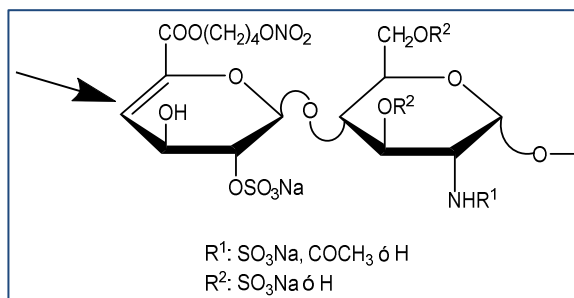


Figura 25. Estructura

4.2.3. Despolimerización en presencia de una base de Fosfaceno

HW1214-110/14

Se pesan 10 g de la sal de benzalconio lote HW1214-BZL/1L y se disuelven en 30 mL de diclorometano. Se añaden 1,72 mL de BEMP y se deja reaccionar 8h a 35 °C. Se añaden 1,72 mL de BEMP y se deja reaccionar 16h a 35 °C. Se añaden 1,72 mL de BEMP y se deja reaccionar 8h a 35 °C. Se añade 1 mL de H₂O₂ y se deja reaccionar 16h a 35 °C. Se obtienen 3,39 g del producto HW1214-110/12. Se pesan 2 g de este producto y se disuelven en 14,5 mL de agua. Sobre esta solución se añade durante 35 minutos 8,79 g de una solución de cloruro de benzalconio al 50% w/v en agua. La solución se mantiene 60 minutos en agitación y se deja reposar. El líquido sobrenadante se retira y el precipitado se lava tres veces con agua, se liofiliza y se obtienen 4,84 g del heparinato de benzalconio lote HW1214-BZL/3L.

En un erlenmeyer de 50 mL se disuelven 4,84 g de HW1214-BZL/3L en 14,5 mL de cloruro de metileno. Se añade 0,83 mL de BEMP. Se agita y se deja 16 horas a 35 °C. A las 16 horas se saca una alícuota de 0,33 mL. Se añade sobre 2 mL de AcONa/metanol. Se centrifuga. Se lava con metanol. El sólido se disuelve con 3 mL de agua. Se neutraliza. Se disuelve una punta de espátula de ClNa. Se deja en reposo. Se filtra y se seca a vacío. HPLC-TSK 2000 3.208 Da. El resto de crudo se añade sobre 30 mL de AcONa/metanol al 10 % y se deja reposar. Se centrifuga. Se hacen dos lavados con metanol. Se centrifuga. El sólido blanco se disuelve en 25 mL de agua. Se mide el pH= 10,57. Se neutraliza. pH= 6,94. Se disuelve 2,5 g de NaCl. Exceso de metanol. Se elimina el líquido sobrenadante. Se añade metanol fresco. Se filtra y seca a vacío. Se obtienen 1,32 g de producto. Se obtiene un producto con las siguientes características:

- Actividad anti Factor Xa:
190 UI/mg
- Actividad anti Factor IIa:
9,3 UI/mg
- Ratio activ. anti Factor Xa/ activ. anti-FIIa:
20,4
- Análisis por GPC:
HPLC-TSK2000
Peso molecular medio Mw 2924 Da
Distribución molecular de cadenas <2000=42.50%;
2000-6000=49.04%; >6000=8.46%

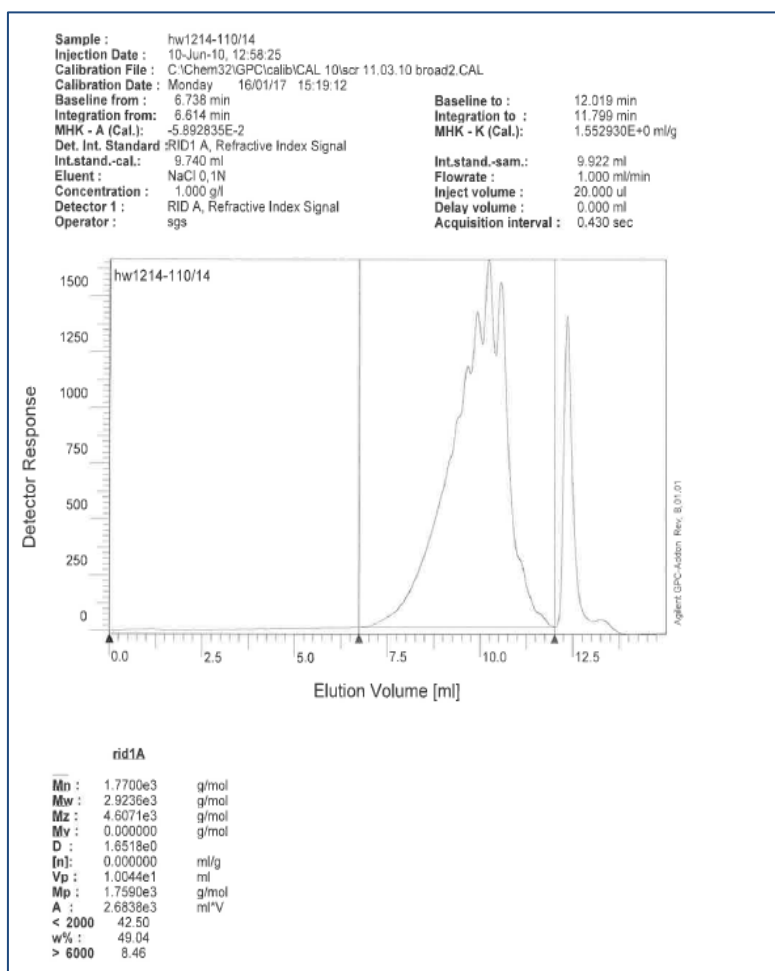


Figura 26. Cromatograma GPC producto HW1214-110/14

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

El producto obtenido se ha despolimerizado, lo que se puede comprobar por el valor del peso molecular medio M_w 2924 Da. El M_w del producto de referencia, heparina, tiene un valor medio de aproximadamente 15000 Da. El % mayoritario de las cadenas se encuentra por debajo de 6000 Da, teniendo un % pequeño (8,46%) de cadenas superiores a 6000 Da, que se correlaciona con el bajo valor de actividad anti-FIIa.

4.2.4. Preparación de formulaciones Tópicas

Preparación del producto RG-001

RG-001= Regranex[®], producto comercial.

Regranex 0,01% gel: cada gramo de gel contiene 100 microgramos de becaplermina (Factor de Crecimiento plaquetario BB humano recombinante (rhPDGF-BB)).

Excipientes: cada gramo contiene 1,56 mg de parahidroxibenzoato de metilo (metilparaben) y 0,17 mg de parahidroxibenzoato de propilo (propilparaben).

Preparación del vehículo A: producto RG-002

Composición % (w/w): metilparaben 0,16; propilparaben 0,02; sodio acetato trihidrato 0,15; sodio cloruro 0,78; m-cresol 0,09; ácido acético glacial 0,01; CMCNa alta viscosidad 2,3; agua 96,49.

Se pesa el sodio acetato trihidrato, sodio cloruro, m-cresol y ácido acético glacial y se añade en parte del agua de la formulación. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se pesa la CMCNa y se espolvorea sobre la disolución anterior. En la porción de agua restante de la formulación, se disuelven el metilparaben y propilparaben mediante agitación magnética. Para conseguir la disolución completa se calienta el agua previamente (70 °C). Una vez enfriada la disolución se añade al resto de la formulación. Se agita en paletas a 300 rpm hasta total disolución de la CMCNa y formación del gel.

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

Preparación del producto RG-003

RG-003= Formulación HO5106C-116 lote 1 + vehículo A

Composición % (w/w): metilparaben 0,16; propilparaben 0,02; sodio acetato trihidrato 0,15; sodio cloruro 0,78; m-cresol 0,09; ácido acético glacial 0,01; CMCNa alta viscosidad 2,3; HO5106C-116/1 1; agua 95,49.

Se pesa el sodio acetato trihidrato, sodio cloruro, m-cresol y ácido acético glacial y se añade en parte del agua de la formulación. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se pesa la cantidad de HO5106C-116 Lote 1 y se añade a la disolución anterior. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se pesa la CMCNa y se espolvorea sobre la disolución anterior. En la porción de agua restante de la formulación, se disuelven el metilparaben y propilparaben mediante agitación magnética. Para conseguir la disolución completa se calienta el agua previamente (70 °C). Una vez enfriada la disolución se añade al resto de la formulación. Se agita en paletas a 300 rpm hasta total disolución de la CMCNa y formación del gel.

Preparación del producto SR-001

SR-001= Formulación HO5106C-116 lote 1 + vehículo B

Composición % (w/w): HO5106C-116/1 0,96; colágeno tipo I 0,23; hialuronato sódico 2,32; agua 96,49.

Se disuelven 250 mg de HO5106C-116 lote 1 en 25 ml de agua destilada. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 60 mg de colágeno tipo I. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 600 mg de hialuronato sódico. Agitar mediante agitación magnética hasta total disolución.

Preparación del producto SRO-002/ROV1101

Formulación HO5106C-116 lote 5 + vehículo B

Composición % (w/w): HO5106C-116 lote 5 0,96; colágeno tipo I 0,23; hialuronato sódico 2,32; agua 96,49.

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

Se disuelven 250 mg de HO5106C-116 lote 5 en 25 ml de agua destilada. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 60 mg de colágeno tipo I. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 600 mg de hialuronato sódico. Agitar mediante agitación magnética hasta total disolución.

Preparación del producto SRO-003/ROV1102

SRO-003/ROV1102= Formulación HO854-116 lote 59 + vehículo B

Composición % (w/w): HO854-116 lote 59 0,96; colágeno tipo I 0,23; hialuronato sódico 2,32; agua 96,49.

Se disuelven 250 mg de HO854-116 lote 59 en 25 ml de agua destilada. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 60 mg de colágeno tipo I. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 600 mg de hialuronato sódico. Agitar mediante agitación magnética hasta total disolución.

Preparación del producto SRO-004/ROV1103

SRO-004/ROV1103= Formulación HW1214-116/2 + vehículo B

Composición % (w/w): HW1214-116/2 0,96; colágeno tipo I 0,23; hialuronato sódico 2,32; agua 96,49.

Se disuelven 250 mg de HW1214-116/2 en 25 ml de agua destilada. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 60 mg de colágeno tipo I. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 600 mg de hialuronato sódico. Agitar mediante agitación magnética hasta total disolución.

SÍNTESIS GENERAL DE COMPUESTOS

Preparación del producto SRO-005/ROV1104

SRO-005/ROV1104 = Formulación Bemiparina lote GRBP01310 + vehículo B

Composición % (w/w): Bemiparina 0,96; colágeno tipo I 0,23; hialuronato sódico 2,32; agua 96,49.

Se disuelven 250 mg de Bemiparina lote GRBP01310 en 25 ml de agua destilada. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 60 mg de colágeno tipo I. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 600 mg de hialuronato sódico. Agitar mediante agitación magnética hasta total disolución.

Preparación del producto ROV1105

ROV1105= Formulación Bemiparina lote GRBP2110D + vehículo B

Composición % (w/w): Bemiparina 0,96; colágeno tipo I 0,23; hialuronato sódico 2,32; agua 96,49.

Se disuelven 250 mg de Bemiparina en 25 ml de agua destilada. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 60 mg de colágeno tipo I. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 600 mg de hialuronato sódico. Agitar mediante agitación magnética hasta total disolución.

Preparación del producto ROV1106

ROV1106= Formulación HW1214-116 lote 2 + vehículo B

Composición % (w/w): HW1214-116 0,96; colágeno tipo I 0,23; hialuronato sódico 2,32; agua 96,49.

Se disuelven 250 mg de HW1214-116 en 25 ml de agua destilada. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 60 mg de colágeno tipo I. Se agita mediante agitación magnética hasta total disolución. Se añaden 600 mg de hialuronato sódico. Agitar mediante agitación magnética hasta total disolución.

Preparación del producto ROV1107

ROV1107= Formulaci3n HW1214-110/14 + veh3culo B

Composici3n % (w/w): HW1214-110/14 0,96; col3geno tipo I 0,23; hialuronato s3dico 2,32; agua 96,49.

Se disuelven 250 mg de HW1214-110/14 en 25 ml de agua destilada. Se agita mediante agitaci3n magn3tica hasta total disoluci3n. Se a3aden 60 mg de col3geno tipo I. Se agita mediante agitaci3n magn3tica hasta total disoluci3n. Se a3aden 600 mg de hialuronato s3dico. Agitar mediante agitaci3n magn3tica hasta total disoluci3n.

ESTUDIOS IN VIVO

5. Estudios *in vivo*

5.1.- Condiciones generales de los estudios

Los ensayos en animales descritos en esta Tesis Doctoral se han realizado en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón, y han sido dirigidos por las doctoras M^a Fernanda Martín Cancho y Ana Nieto.

El objetivo común de todos los estudios *in vivo* realizados fue evaluar la actividad terapéutica de nuevas moléculas desarrolladas en esta tesis doctoral en la curación de úlceras tópicas crónicas, tras la administración de dichos productos por vía subcutánea y por vía tópica.

Los objetivos generales que se persiguen en los estudio que se describen en esta tesis son los de evaluar el comportamiento de dichos productos en la curación de úlceras de distintas etiologías, tales como úlceras diabéticas, úlceras por quemadura y úlceras corneales.

Para el estudio de estos comportamientos se han usado tres modelos animales. En un screening inicial se ha usado el modelo animal ratón diabético, dada la rápida curación de las heridas en este modelo. En una segunda fase se han estudiado los modelos animales cerdo minipig y conejo.

5.1.1- Bienestar Animal

Los procedimientos de los estudios descritos se han llevado a cabo de acuerdo con la Directiva 86/609/CEE del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, Ley 32/2007 de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, y Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los procedimientos de los estudios han sido revisados y aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón (CCMIJU) de Cáceres, y la documentación generada está guardada en los archivos del citado comité.

ESTUDIOS IN VIVO

En los estudios se ha usado el menor número de animales de acuerdo con la normativa vigente y la integridad científica, y se ha tenido en cuenta el bienestar de los animales en lo referente al número y grado de procedimientos a realizar.

5.1.2- Legislación BPL

Los procedimientos de los estudios descritos se han llevado a cabo de acuerdo con el REAL DECRETO 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos (B.O.E. 128 de 29 de mayo de 1993) ; REAL DECRETO 1369/2000, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos (B.O.E. 173 de 20 de julio de 2000) ; REAL DECRETO 2043/1994, de 14 de octubre, sobre inspección y verificación de buenas prácticas de laboratorio (B.O.E. 281 de 24 de noviembre de 1994); y ORDEN de 14 de abril de 2000 por la que se adaptan al progreso técnico los anexos del Real Decreto 2043/1994, de 14 de Octubre, sobre inspección y verificación de buenas prácticas de laboratorio (B.O.E. 103 de 29 de abril de 2000).

CCMIJU ha conservado en sus archivos los protocolos, los datos originales, especímenes, muestras de tejido húmedo y los informes finales de los estudios realizados, durante el período de tiempo que establece la legislación vigente.

5.1.3- Materiales y Equipos

5.1.3.1. Equipos e instalaciones

Para llevar a cabo los estudios fue necesaria la utilización de diferentes equipos que se detallan a continuación:

- Quirófano experimental equipado con equipo de anestesia: Máquina “Harvard Basic single 02”, con vaporizador de isoflurano y caja de inducción anestésica para roedores.
- Máquina de Anestesia de alta gama con monitorización ventilatoria y hemodinámica completa para minipigs.
- Máquina cortapelo para roedores “Wahl trimmer”.
- Instrumental quirúrgico de cirugía general para la creación de las úlceras.

- Balanza de precisión “Adam equipment”.
- Material de microcirugía: Porta agujas, pinzas y tijera Wescott, punch de biopsia cutánea de 6 mm.

Para los estudios con conejos, las técnicas quirúrgicas necesarias y el seguimiento de las úlceras corneales se han realizado en el quirófano, equipado con el siguiente material especializado:

- Microscopio Zeiss® Opmi Movena® con doble puesto (para ayudante) equipado con una cámara de video 3CCD SONY EXWAVE HAD y otra cámara digital de fotografía CANON PC 1049, que emiten la imagen a 8 pantallas de plasma SONY (6 de 40 pulgadas y 2 de 50 pulgadas) situadas en el techo.
- Topógrafo corneal Eye Top 2005 V.1.0 (CSO). Útil como método de exploración del segmento anterior del ojo, fundamentalmente de la forma y curvatura de la córnea, para evaluar la superficie anterior o posterior. Equipo de diagnóstico para alteraciones morfológicas como las ectasias, estudio preciso de la cirugía refractiva, evaluación de astigmatismos irregulares, cambios de graduación espontáneos, evaluación y seguimiento de úlceras corneales, etc. Con la topografía se obtienen mapas a color de las diferentes zonas de la córnea con su respectiva curvatura, valorando posibles irregularidades de la superficie anterior o posterior.
- Lámpara de hendidura SL-D4 TopCon®. Diagnóstico y detección de enfermedades oculares tales como: cataratas, lesión corneal, síndrome del ojo seco, degeneración macular, desprendimiento de retina, oclusión de los vasos retinianos, retinitis pigmentaria, uveítis, etc.
- Tonómetro I-Care® TonoVet. Determinación de la presión intraocular. Útil para detectar enfermedades como el glaucoma o la iritis o realizar evaluación de presión intraocular en tratamientos tópicos.
- Paquímetro DGH-555c (Topcon) para medida del grosor corneal.
- Máquina de Anestesia de alta gama con monitorización ventilatoria y hemodinámica completa (Ohmeda, Excell 210).
- Microqueratomo (SBK® Moria).



Figura 27. Quirófano del estudio

Se ha empleado también el Servicio de Farmacia del centro para la conservación de los productos de ensayo y para la elaboración de las formulaciones de estreptozotocina, así como el Laboratorio de Análisis Clínicos para la determinación bioquímica de los parámetros que se detallan en los estudios, así como para la preparación y conservación de las muestras de plasma y de las muestras histológicas.

5.1.3.2. Fármacos y Material Fungible

Para la anestesia, cirugía y cuidados postoperatorios de los animales de los estudios, fue empleado el siguiente material.

- Agua oxigenada
- Alcohol
- Aloxano monohidrato
- Amoxicilina clavulánico
- Apósitos.
- Atipamezol
- Atropina colirio
- Betadine
- Buprenorfina
- Calfostonic
- Carprofeno
- Ceftiofur
- Cianoacrilato.
- Dexmedetomidina
- Fentanilo Parches transdérmicos
- Flunixin meglumine
- Fluoresceína
- Insulina de acción retardada
- Isoflorano.
- Meloxicam
- Metoclopramida
- Paracetamol (Apiretal).
- Povidona yodada
- Propofol
- Remifentanilo IV
- Sevoflurano
- Silicona termoresistente.
- Streptozotocina
- Sucralfato
- Suero glucosado al 5%.
- Suero salino fisiológico.
- Sutura de nylon Monosoft 6/0.

ESTUDIOS IN VIVO

El material fungible utilizado se detalla a continuación:

- Abbocatt 22 G
- Agujas de 21G
- Gasas, compresas....
- Jeringas
- Material quirúrgico de cirugía general
- Material quirúrgico de microcirugía y de oftalmología
- Tiras oftálmicas de Schrimmer.
- Tubos de sangre
- Tubos endotraqueales, nº 3
- Tubos endotraqueales, nº 5-7
- Tubos Eppendorf

5.1.4- Animales en estudio

Los modelos animales que han sido utilizados para los estudios in vivo han sido ratón, cerdo enano minipig y conejo.

Los estudios realizados en el modelo ratón diabético se han llevado a cabo con ratones genéticamente diabéticos seleccionados de la cepa BKS.Cg-m+/+ Lepr db/j, ratones machos de once semanas y con un peso medio de alrededor de 50 gramos.

Para el modelo experimental porcino se han utilizado cerdos enanos ("minipigs") de la raza Göttingen. Estos animales han sido criados en sus instalaciones barrera, y ofrecen además de una excelente homogeneidad genética y fenotípica, un estatus de salud único, ya que son testados para un amplio abanico de patógenos, y poseen unas condiciones microbiológicas muy definidas.

Para el estudio en modelo experimental de conejo diabético, se han empleado conejos albinos de raza neozelandesa, con un peso medio de alrededor de 4,50 Kg.

5.1.5- Condiciones de alojamiento

Los animales utilizados fueron estabulados en el Animalario del Centro de Cirugía de Mínima Invasión.

Para los estudios realizados en ratones, las condiciones ambientales fueron las siguientes:

- Temperatura 20-24 °C y Humedad relativa 55 ± 10%.
- Ciclos de 12h de luz/oscuridad con control de la intensidad.
- Quince renovaciones de aire por hora.
- Jaulas individuales con cubeta de polisulfono, con una superficie de 800 cm² y 18 cm de altura. Acorde con la recomendación europea ETS123.
- Lecho de viruta Lignocel 3-4 (Harlan Laboratories Models, S.L.).
- Dieta de mantenimiento estándar peletizada Harlan Teklad 2014 (Harlan Laboratories Models, S.L.).
- Agua de bebida osmotizada, administrada mediante un dispensador automático con posibilidad de ser reemplazado por biberón.



Figura 28. Estabulario

Para los estudios realizados con minipigs, tras su recepción e inspección inicial, los animales fueron albergados en cubículos individuales en condiciones ambientales estrictamente controladas durante el transcurso de los estudios. Fueron estabulados en el animalario del centro, en salas exhaustivamente desinfectadas y habilitadas para acoger exclusivamente a los animales de estos estudios. Se han llevado a cabo todas las actividades clínicas y de mantenimiento siguiendo un protocolo de seguridad biológica para mantener el homogéneo estatus microbiológico y sanitario de los grupos de estudio.

Para los estudios que se han realizado en conejos, los animales fueron estabulados en jaulas individuales con cubeta de polisulfono, con una superficie de 3m² y 40 cm de altura en el Animalario del Centro de Cirugía de Mínima Invasión, en las condiciones ambientales de Temperatura 15-21 °C y Humedad relativa 55 ± 10%. Los ciclos fueron de 12 h de luz/oscuridad con control de la intensidad, con quince renovaciones de aire por hora.

5.1.6- Evaluación de los resultados

Los resultados obtenidos fueron comparados y analizados utilizando el programa estadístico SPSS 15.0 statistical package for Windows, SPSS Inc, Chicago, Illinois, empleando un test de ANOVA para medidas repetidas seguido de un test de Tukey. Se seleccionó el método de Tukey porque permite observar la existencia de diferencias significativas en comparaciones de múltiples grupos simultáneamente. Al ser un test basado en la diferencia de medias, el método es válido cuando se asume la homogeneidad del tamaño muestral entre los grupos que se comparan. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se llevó a cabo la comparación de todos los tratamientos entre ellos y a los diferentes tiempos de medida.

Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Nikon D90, con objetivo de 105mm F/2.8. Se utilizó un sistema de flashes compuesto por cuatro satélites colocados en un ángulo de 45° enfrentados dos a dos para evitar la aparición de sombras. La apertura del diafragma fue de $f 32$ y la velocidad de obturación de $1/100$.

La cámara fotográfica se fijó en el soporte horizontal del trípode, el cual a su vez, estaba colocado con las patas en máxima extensión (130.1 cm del suelo) y colocado en contacto con la mesa. La posición del trípode con respecto a la mesa fue siempre la misma. Todo el montaje de cámara, mesa y trípode dispuso la cámara en una posición fija.

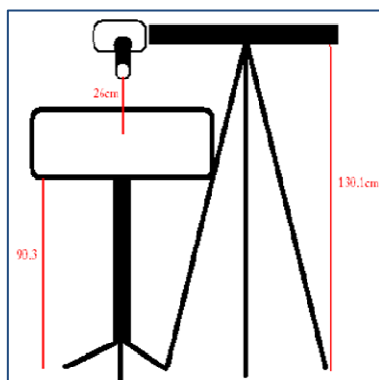


Figura 29. Cámara y montaje

La nomenclatura que la cámara asignó a las fotografías fue el código de cada uno de los estudios, seguido de la numeración automática que asigna la cámara. La numeración de cada fotografía se apuntó al momento en la ficha del animal fotografiado.

Las imágenes se volcaron al ordenador después de cada jornada de control fotográfico, para mantener una copia de seguridad en todo momento. Las imágenes se mantuvieron en dos formatos: JPG y NEF.

Se usó el software ImageJ, versión 1.42, para calcular la medida de área expresada en cm^2 .

Se calculó el porcentaje de reducción de la herida según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción} = \frac{A_{\text{basal}} - A_{\text{tiempo}}}{A_{\text{basal}}} 100$$

Para los estudios con minipigs, se ha realizado un test de normalidad de las variables (Test Kolmogorov-Smirnov) comprobando que no seguían ninguna de ellas una distribución normal. Ya que en este estudio, el número de observaciones de cada grupo no es similar, (Sokal RS, Rohlf FJ. *Biometry. The principles and practice of statistic in biological research*. New York: Freeman, 1995 y Peña D. Análisis de la varianza. En *Estadística Modelos y Métodos*. Tomo 2, 25-71. Alianza Editorial, Madrid, 1987), se ha empleado un test no paramétrico de Kruskal Wallis seguido de un test de Mann-Whitney para determinar las diferencias entre los distintos tratamientos a los diferentes tiempos de medida. Los valores de $p < 0.05$ se han considerado estadísticamente significativos.

En los estudios en minipigs, también se midió el área externa (A_n) que marca la contracción de la úlcera (área delimitada por piel normal), con el fin de calcular el porcentaje de contracción de la úlcera según la siguiente fórmula. Esta área se midió a partir del día 10 tras la creación quirúrgica de la úlcera, ya que en tiempos anteriores no se observó contracción.

$$\% \text{ contracción} = \frac{A_{\text{basal}} - A_n \text{ en cada tiempo}}{A_{\text{basal}}} 100$$

5.1.7- Valoración histológica de las heridas

Los resultados generales obtenidos en los estudios en animales, se basaron en la puntuación establecida por el método de Greenhalgh et al. (1990). A cada bloque se le asignó una puntuación histológica del 1 al 15, donde 1 significa herida sin curar y 15 herida completamente epitelizada. La puntuación se basa en el grado de invasión celular, la formación tejido de granulación, vascularización y epitelización:

ESTUDIOS IN VIVO

Grado I: Puntuación de 1–3

Acumulación celular de ninguna a mínima, ausencia de tejido de granulación o desarrollo epitelial.

Grado II: Puntuación de 4–6

Tejido de granulación fino e inmaduro dominado por células inflamatorias pero con pocos fibroblastos, capilares o deposición de colágeno; migración epitelial mínima.

Grado III: Puntuación de 7–9

Tejido de granulación moderadamente grueso. Puede variar de estar dominado por células inflamatorias a mayor presencia de fibroblastos y deposición de colágenos, neovascularización extensiva, migración epitelial mínima a moderada.

Grado IV: Puntuación de 10–12.

Tejido de granulación grueso y vascular dominado por fibroblastos y deposición extensiva de colágeno, el epitelio cubre la herida parcial o totalmente.

Grado V: Puntuación de 13-15.

Área correspondiente a la herida totalmente epitelizada, sin presentar, más o menos, rastros de la herida. Se ha cuantificado el número de animales pertenecientes a cada grado así como se han promediado las puntuaciones obtenidas de los animales de cada grupo.

En ratones, la porción posterior de la zona que contiene la herida se utilizó para la valoración histológica. Se valoró el infiltrado inflamatorio, el tejido de granulación (formado sobre todo por fibroblastos y matriz extracelular), la proliferación vascular y la reepitelización. Para ello, se asignó un valor de 1 a 4 siendo 1: escasa; 2: moderada; 3: severa y 4: muy severa. Así, de cada muestra, se tuvo una idea de qué componente es el predominante y el estadio de recuperación en el que se encuentra.

Para los estudios en minipigs las muestras de biopsia obtenidas una vez finalizado el seguimiento, se fijaron en formol para su envío al laboratorio anatomopatológico donde se evaluaron la calidad de la cicatrización utilizando la tinción de hematoxilina-eosina. En la epidermis, se valoró la presencia o no de úlceras, presencia de pústulas bajo el estrato córneo o de células inflamatorias entre las capas de la epidermis, la hiperplasia del epitelio y la hiperqueratosis, señalando también la presencia de paraqueratosis (presencia de núcleos en el estrato córneo) (P). En el tejido subcutáneo se analizaron la existencia de

hemorragias, infiltrado de células inflamatorias, tejido de granulación o grado de fibrosis y neovascularización.

La evaluación histológica en los estudios en conejo ha determinado la calidad del tejido formado así como la determinación de la disposición de las fibras de colágeno. Las muestras se remitieron en formol, se incluyeron en parafina y se realizaron tres cortes consecutivos de 5 μ . Sobre cada corte se realizaron las tinciones de hematoxilina-eosina (HE), Rojo Sirio y tricrómico de Masson (TCM). En los cortes teñidos con HE, se estudió el grado de epitelización en la zona de ulceración, el número absoluto de queratinocitos del epitelio, la profundidad de la úlcera o el grado de fibrosis, infiltrado inflamatorio, apoptosis, presencia de vasos, presencia de fibras nerviosas y estado de la Membrana de Descemet. La profundidad de la úlcera y el grado de fibrosis bajo el epitelio se estudiaron juntos ya que ambos se relacionan con el espesor del tejido conjuntivo en la zona lesionada. Con la tinción de Rojo Sirio, se valoró la pérdida del colágeno en el estroma como una disminución en la coloración y por último, con el TCM, la existencia de sustancia hialina en esta misma capa, que se tiñó de rojo.

5.2.- Compuestos utilizados en los estudios

A continuación se resumen todos los compuestos obtenidos, así como la codificación y los estudios *in vivo* en que han sido utilizados.

Tabla 4.- Tabla general de compuestos.

ESTUDIO	CODIGO COMPUESTO EN EL ESTUDIO	CÓDIGO COMPUESTO EN LA SÍNTESIS	PRODUCTO PARTIDA
SIF 109-1	PRODUCTO 1	HO5106C	Heparina
SIF 109-1	PRODUCTO 2	BP-116/21	Bemiparina
SIF 109-1	PRODUCTO 3	HO5106C-116/2	Heparina
SIF 109-1	PRODUCTO 4	BP08308B	Bemiparina
SIF 109-6	PRODUCTO 1	HO5106C-116/1	Heparina
SIF 109-6	PRODUCTO 2	HO5106C-116/2	Heparina
SIF 109-6	PRODUCTO 3	HO5106C-116/5	Heparina
SIF 109-6	PRODUCTO 4	HO854-116/41	Heparina
SIF 109-7	RG-001	Regranex®	--
SIF 109-7	RG-002	Vehículo A	--
SIF 109-7	RG-003	HO5106C-116/1	Heparina
SIF 109-7	SR-001	HO5106C-116/1	Heparina
SIF 210-1 Grupos I, II y III	ROV1105	GRBP2110D	Bemiparina
SIF 210-1 Grupos I, II y III	ROV1106	H1214-116/2	Heparina
SIF 210-1 Grupos I, II y III	ROV1107	H1214-110/14	Heparina
SIF 210-1 Grupos VI y VII	ROV1105	GRBP2110D	Bemiparina
SIF 210-1 Grupos VI y VII	ROV1106	H1214-116/2	Heparina
SIF 110-1	SRO-002/ROV1101	HO5106C-116/5	Heparina
SIF 110-1	SRO-003/ROV1102	HO854-116/59	Heparina
SIF 110-1	SRO-004/ROV1103	H1214-116/2	Heparina
SIF 110-1	SRO-005/ROV1104	GRPB01310	Bemiparina

5.3.- Estudios sobre úlceras diabéticas

El objetivo de estos estudios fue evaluar la actividad terapéutica de tratamientos farmacológicos en la curación de úlceras tópicas en animales genéticamente diabéticos, en base a resultados de reducción de úlceras y estudio histológico.

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico crónico caracterizado por hiperglucemia, debido a la falta o resistencia a la insulina. Los pacientes con DM suelen padecer una enfermedad vascular isquémica o un defecto de cicatrización de la herida. Es bien sabido que la DM de tipo 2 provoca la amplificación del proceso aterosclerótico, la disfunción de las células endoteliales, la glicosilación de proteínas de la matriz extracelular y la denervación vascular, complicaciones que conducen en última instancia al deterioro de la neovascularización y la cicatrización de heridas diabéticas [46].

La DM se asocia a un incremento del riesgo de complicaciones e infecciones durante el proceso de cicatrización de las heridas, por una prolongación del tiempo de curación. Se conoce que la hiperglucemia crónica se asocia con un aumento de la formación de productos avanzados de la glicosilación (PAGES) y una hiperactividad del complejo aldosa reductasa-proteína quinasa C, lo cual provoca, por mecanismos complejos, un incremento del estrés oxidativo, fenómeno que está íntimamente ligado a la aparición de disfunción endotelial (DE) [47].

Existe una relación entre la disfunción endotelial y el riesgo de úlcera. La alteración de la vasorregulación en pacientes diabéticos conduce al desarrollo y perpetuación de la ulceración crónica a través del fallo de la respuesta hiperémica normal a la lesión. Un defecto fundamental que se ha demostrado en sujetos diabéticos es la disfunción de la vasodilatación dependiente del endotelio. La cicatrización de la herida ocurre como una respuesta celular a la lesión e implica la activación de queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. Estos tipos de células coordinan y mantienen la curación a través de la liberación de muchos factores de crecimiento y citoquinas. Las respuestas defectuosas de las células inmunitarias o el reclutamiento deteriorado dentro del sitio de la herida dan como resultado una curación defectuosa en la diabetes [46].

Una serie de mecanismos múltiples, incluyendo disminución de la respuesta celular y del factor de crecimiento, conducen a una disminución del flujo sanguíneo periférico y a una disminución de la proliferación de células endoteliales. Esto da lugar a la falta de cicatrización de heridas en la diabetes y la consecuente aparición de úlceras.

Modelo animal ratón diabético

Se trata de un modelo para el desarrollo de estrategias para el tratamiento de heridas en enfermos diabéticos, ya que el ratón genéticamente diabético desarrolla resistencia a la insulina e hiperglucemia similares a las observadas en la diabetes del adulto.

Dentro de los modelos animales estudiados, el modelo de ratón diabético es válido para un screening inicial debido a la rápida curación de las úlceras en ratones. En una segunda fase se ha estudiado la capacidad antiulcerosa de los compuestos en otros modelos como minipig y conejo.

En lo referente al diseño de los estudios, el primer día del ensayo se anestesiaron los animales con anestesia inhalatoria con isoflurano al 2% en oxígeno al 100% con un flujo de gas fresco de 2 L/min. Se rasuró el lomo del animal, se limpió la zona con desinfectante y se marcó la situación de la herida, mediante plantilla para igualar su posición en todos los animales. La herida se realizó mediante una incisión circular de 0,6 cm de diámetro mediante un punch de biopsia cutánea, extirpándose la piel de la zona media dorsal. Posteriormente se colocó una lámina de silicona de 1,2 mm de grosor con una apertura central circular de 12 mm de diámetro interno la cual se adherió a la piel con cianoacrilato y se fijó con 4 puntos de nylon 6/0 para minimizar y evitar la retracción de la piel. La zona de la herida se tapó con un apósito semipermeable.

Se administró por vía i.p. 0,5 ml/animal de suero fisiológico después de la intervención.

Durante los 7 días posteriores a la intervención se administró a los animales analgesia (Paracetamol, 1 mg/ml) en el agua de bebida.



Figura 30. Ratón diabético en estudio

5.3.1- Estudio código SIF 109-1

Título:

Estudios in vivo en ratón diabético, para evaluación de la actividad de principios activos para el tratamiento de úlceras tópicas

Objetivo:

Evaluar la actividad terapéutica de 4 tratamientos farmacológicos (nuevas moléculas desarrolladas por Laboratorios ROVI) en la curación de úlceras tópicas en ratones genéticamente diabéticos, en base a resultados de reducción de úlceras y estudio histológico.

Animales del estudio.

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron 70? animales, todos ellos ratones diabéticos de la cepa *BKS.Cg-m+/+Lepr db/j*. Todos los animales seleccionados fueron machos de once semanas, con un peso a su llegada de 47,97±3,09 gramos

Los animales fueron identificados mediante un sistema de código de colores, y mediante este sistema se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos.

Grupo I: Control diabético sin tratamiento (n=15) Negro

Grupo II: Producto de ensayo 1 (n=15): Heparina, Lote HO5106C Verde, heparina.

Grupo III: Producto de ensayo 2 (n=15): BP-116, Lote 21 Rojo, nitroderivado.

Grupo IV: Producto de ensayo 3 (n=15): HO5106C-116, Lote 2 Amarillo, nitroderivado.

Grupo V: Producto de ensayo 4 (n=10): Bemiparin, Lote BP08308B Naranja, heparina de bajo peso molecular.

Productos de ensayo.**Tabla 5.-** Productos de ensayo

	PRODUCTO 1	PRODUCTO 2	PRODUCTO 3	PRODUCTO 4
Nombre.	Heparina	BP-116	HO5106C-116	Bemiparin
Identificación.	Verde	Rojo	Amarillo	Naranja
Lote.	HO5106C	Lote 21	Lote 2	BP08308B
Dosis	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg
Vehículo.	Suero salino	Suero salino	Suero salino	Suero salino
Vía administración.	Subcutánea	Subcutánea	Subcutánea	Subcutánea
Vol. administración.	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Diseño del estudio y descripción de las intervenciones

Transcurrido el primer día del ensayo, y al día siguiente y durante un total de 18 días, los animales se medicaron con los tratamientos asignados a la dosis de 10 mg/Kg siendo el volumen de administración 0,5 ml/ratón por vía subcutánea en el lomo del animal, evitando la zona de la herida. En función de los valores de áreas obtenidos se valoró la continuación o el cese del tratamiento, considerándose apropiado eutanasiar a los animales a los 18 días del estudio.

Se realizó el seguimiento de los animales durante un período de 18 días valorándose macroscópicamente la evolución de las heridas 2 veces por semana. La valoración se realizó mediante fotografía digital de la herida y análisis posterior de la imagen. Se utilizó como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención.

Tras la última medida se eutanasiaron los animales. La zona de la piel dónde se produce la herida se conservó hasta su procesamiento: una mitad en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina) y la otra mitad se congeló en nitrógeno líquido para la determinación de citoquinas, conservando las muestras posteriormente en congelador (-80 ± 5 °C). Este procedimiento se realizó también con 3 animales de cada grupo el tercer día después de la realización de la herida.

Todas las muestras conservadas en formol se envían para su posterior análisis histológico.

Resultados

En el siguiente apartado se describen todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio. Esto es, la evolución de la curación/cierre de las heridas y la evaluación histológica de las mismas realizado el último día del estudio.

Área de las heridas.

A continuación se muestran los valores globales de la evolución del área de las heridas a lo largo del estudio, así como del porcentaje de reducción o curación de las mismas.

La reducción de las heridas y por tanto la disminución del área de las mismas y el aumento del porcentaje de reducción es significativo ($p < 0,05$) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera en los grupos 1-4, mientras que en el grupo 5 lo es a partir del día 3.

Se observa que los grupos 1-4 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 90% a partir del día 18 mientras que el grupo 5 alcanzó el día 18 el 89%.

El grupo 3 (Producto de ensayo 2: BP-116, Lote 21) muestra significativamente ($p < 0,05$) una mayor reducción del área de la herida y un menor tiempo necesario para ello respecto al resto de los grupos.

Tabla 6. Evolución del área durante el estudio

ÁREA (cm ²)					
Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	0.32 ± 0.04	0.32 ± 0.03	0.31±0.04	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.01
1	0.32 ± 0.05	0.33 ± 0.04	0.30±0.04	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.01
3	0.31 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.29±0.04	0.24 ± 0.03†	0.24 ± 0.02†
8	0.21 ± 0.03*	0.22 ± 0.04*	0.21±0.04*	0.21 ± 0.03*	0.17 ± 0.01*†
10	0.18 ± 0.04*	0.18 ± 0.05*	0.14±0.04*†	0.15 ± 0.03*	0.14 ± 0.02*†
14	0.12 ± 0.04*	0.11 ± 0.07*	0.08±0.05*†	0.08 ± 0.04*	0.11 ± 0.01*
17	0.04 ± 0.02*	0.05 ± 0.04*	0.01±0.01*†	0.02 ± 0.02*	0.05±0.01*
18	0.01±0.01*	0.02 ± 0.02*	0.01 ± 0.01*	0.01 ± 0.02*	0.03 ± 0.01*

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

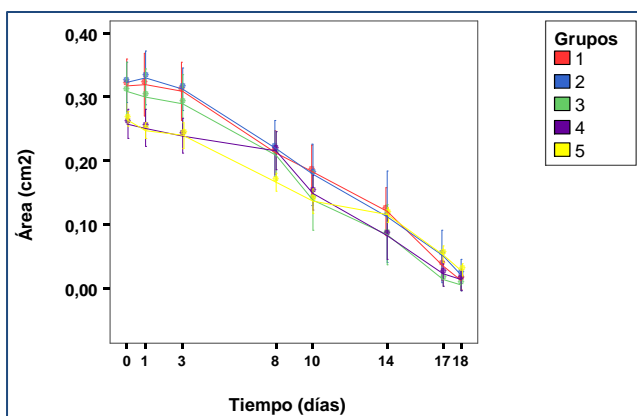


Figura 31. Evolución del área durante el estudio

Tabla 7. Evolución de la reducción de las úlceras

% DE REDUCCIÓN DE LA ÚLCERA					
Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	-0.63 ± 7.63	-2.22 ± 9.63	4.14 ± 9.95	2.65 ± 6.38	6.78 ± 0.74
3	3.01 ± 6.87	2.96 ± 9.53	7.60 ± 9.17†	7.47 ± 6.45†	9.78 ± 4.42† *
8	32.80 ± 7.26*	32.20 ± 10.57*	33.62 ± 11.02*	16.56 ± 8.21*†	36.94 ± 2.81*
10	42.16 ± 10.72*	44.59 ± 13.97*	56.81 ± 10.77*	41.74 ± 9.83*	48.57 ± 6.42*
14	61.46 ± 12.62*	63.17 ± 21.38*	73.74 ± 13.77*†	67.65 ± 14.74*	56.35 ± 4.95*
17	88.56 ± 6.34*	83.96 ± 12.95*	95.22 ± 3.41*†	90.82 ± 7.96*	79.70 ± 4.84*
18	95.95 ± 4.02*	93.22 ± 7.76*	97.88 ± 3.06*†	94.23 ± 6.78*	88.90 ± 3.72*†

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

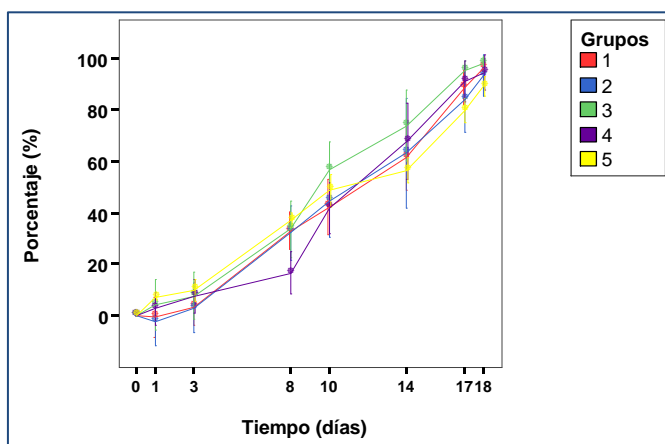


Figura 32. Evolución de la reducción de las úlceras

Evaluación histopatológica.

En la piel de los animales de este experimento, se ha valorado la presencia de células inflamatorias, el tejido de granulación, constituido principalmente por fibroblastos y matriz extracelular, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la re-epitelización de la úlcera creada. Además, a cada muestra se le ha asignado un valor del 1 al 15 correspondiente a la valoración realizada por Greenhalgh y col. en función del grosor del tejido de granulación, angiogénesis, el infiltrado celular y la re-epitelización.

En todos los grupos se han encontrado animales con los distintos grados de lesión, aunque su número y porcentaje queda reflejado en la tabla 8. Tres de los animales de cada grupo se sacrifican a día 3 y por tanto no se han tenido en cuenta en los porcentajes del grado obtenido dentro del grupo ya que no aportan información sobre el tratamiento. En todos los grupos estos animales presentan un grado I de lesión sin presencia apenas de reacción por parte del tejido adyacente a la úlcera.

Tabla 8. Porcentajes del grado obtenido dentro de cada Grupo

GRUPO	GRADO	Nº DE ANIMALES	PORCENTAJE (%)
1	I	0	0
	II	7	58
	III	3	25
	IV	2	17
	V	0	0
2	I	0	0
	II	5	42
	III	4	33
	IV	3	25
	V	0	0

3	I	3	33
	II	2	22
	III	2	22
	IV	2	22
	V	0	0
4	I	1	9
	II	1	9
	III	1	9
	IV	8	73
	V	0	0
5	I	1	25
	II	1	25
	III	0	0
	IV	2	50
	V	0	0

En ninguna de las muestras analizadas se ha observado una recuperación completa del epitelio y una maduración del tejido fibroso con retracción cicatricial por lo que no se ha alcanzado el grado V.

La mayoría de los animales del **grupo 1** presentan un grado II de lesión, con un tejido de granulación fino e inmaduro. En tres casos, la lesión alcanzó el grado III y en 2 el grado IV.

En el **grupo 2**, las muestras se situaron entre un grado de lesión II y III. El número de animales con un grado de recuperación mayor (grado IV) fue el mismo de 3, superior al grupo 1.

ESTUDIOS IN VIVO

El **grupo 3** fue el que presentó el mayor número de animales con un grado I de recuperación, ya que además de los 3 sacrificados antes, también lo presentaron otros 3. El resto de las muestras se distribuyeron igual en los grados II, III y IV, con dos animales en cada grupo.

Por el contrario, el **grupo 4** fue el que presentó el mayor número de animales con el grado de recuperación más elevado, el grado IV. El grado I estuvo constituido por los animales sacrificados más tempranamente más otro animal (animal 46 que se retira del estudio estadístico de los resultados). Sólo dos muestras fueron de grado II y otra de grado III.

Por último, el **grupo 5** presentó una distribución más regular de las muestras en los 3 grados. Sólo un animal más, además de los 3 sacrificados antes, presentó una menor recuperación de la lesión con un grado I. Dos muestras presentaron un grado de recuperación mayor (grado IV) y una un grado III.

GRADO I

La descripción histológica para el mismo grado es similar independientemente del grupo estudiado. Así, en aquellos animales que presentaron un grado I de lesión, el infiltrado inflamatorio o no existió o fue leve, excepto en dos muestras del grupo III en las que fue moderado. Este infiltrado estuvo constituido principalmente por neutrófilos que, en muchas ocasiones, daban lugar a la formación de pústulas bajo el estrato córneo de la epidermis. En otras, infiltraban las capas de ésta formando pequeños abscesos intraepiteliales.

La presencia de tejido de granulación fue también muy escasa, de manera que sólo en los animales con un mayor valor (3) dentro de este grado, se observó un aumento leve en el número de fibroblastos y matriz.

En cuanto al aumento en el número de vasos, fue el hallazgo más frecuente en las muestras del grado I aunque siempre se presentó de manera leve, sólo ligeramente por encima de lo esperado en una piel normal.

La mayoría de las muestras no mostraron recuperación del epitelio de la epidermis o esta fue muy ligera (4 muestras, dos de ellas del grupo 3).

GRADO II

El grado II se caracterizó por un infiltrado celular ligero, situado debajo de la epidermis y con una composición de tipo mixto, constituido tanto por células inflamatorias como fibroblastos. Las proporciones de éstas variaron, aunque siempre de manera leve-moderada. Así, algunas muestras presentaron una mayor proporción de células inflamatorias, que en este caso, además de por neutrófilos, también estuvo formada por macrófagos. En otras, la población mayoritaria fueron los fibroblastos y en algunas ocasiones, fue una mezcla muy similar de ambos componentes.

El aumento de la vascularización y la re-epitelización de la úlcera fueron también hallazgos prácticamente constantes en las muestras con un grado de lesión II. Los capilares presentaron tamaños variados, pero en general, fueron de pequeño calibre y con células sanguíneas en su interior. En cuanto al nuevo epitelio, se observó una ligera hiperplasia del mismo, con aumento en el número de las capas, espongiosis de las células (presencia de vacuolas de origen hídrico en su interior) e hiperqueratosis (aumento del estrato córneo). Estas son características normales de un tejido en regeneración, aunque no de la piel normal. También en este grupo se observaron pústulas bajo este estrato córneo.

GRADO III

En este grado, también se observó una mezcla de células inflamatorias y de granulación, con un espesor moderadamente grueso. En cuanto al infiltrado inflamatorio, estuvo constituido por una mezcla de neutrófilos, sobre todo en las zonas de mayor ulceración, linfocitos y células plasmáticas. El valor se situó entre moderado y severo en la mayoría de los casos.

La presencia de mayor cantidad de fibroblastos junto con los macrófagos y el aumento de la matriz extracelular, muestran un grado de evolución de la lesión superior que en el grado anterior. También la re-epitelización fue mayor, de manera que en muchas muestras, se observó un claro aumento del epitelio de la epidermis, mostrado por la extensión de la zona de hiperplasia. La presencia de un aumento en el número de vasos fue similar a la del grupo anterior, siendo entre leve y moderada.

GRADO IV

El grado IV se caracterizó por la presencia de gran cantidad de fibroblastos jóvenes, con grandes núcleos y citoplasmas alargados, aunque también aparecieron algunos más maduros, con núcleos más pequeños y citoplasmas eosinófilos de mayor tamaño. Entre ellos, se observó la matriz extracelular que contribuyó a aumentar el grosor del tejido de granulación situado bajo la epidermis.

ESTUDIOS IN VIVO

La presencia de células inflamatorias se mantuvo en todas las muestras, aunque su valor estuvo entre leve y moderado y el infiltrado estuvo constituido sobre todo por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Los neutrófilos aparecieron de nuevo en las pústulas.

La recuperación del epitelio de la epidermis se observó en todas las muestras de este grado. Así, en 7 casos (2 del grupo 1, 1 del grupo 2, 3 del grupo 4 y 1 del grupo 5) esta recuperación fue casi completa. En la mayoría de los casos restantes fue muy evidente.

La presencia de neovasos en estas muestras fue leve o moderada, ya que la mayor parte del tejido de granulación estuvo constituido por los fibroblastos y la matriz.

La presencia de mayor cantidad de tejido fibroso que de componente inflamatorio significa un proceso de cronificación, con una reparación de la lesión que se evidencia en la re-epitelización del epitelio. El número de vasos también se reduce a medida que evoluciona el proceso de fibrosis de la herida.

La maduración de los fibroblastos, la desaparición de las células inflamatorias y la reducción de los vasos junto con la reparación completa de la epidermis sería el paso final de la recuperación, pero esta situación no se ha observado en ninguna de las muestras.

Tabla 9. Puntuación de la valoración histológica de los animales que se eutanasiaron a los tres días tras la creación de la úlcera.

ANIMALES GRUPO 1	R1	R2	R3
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	1	1	0
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	0	0	0
<i>Neovascularización</i>	0	0	0
<i>Re-epitelización</i>	0	0	0
<i>Puntuación Greenhalgh</i>	1	2	1

Tabla 9. Continuación

ANIMALES GRUPO 2	R17	R21	R26
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	1	0	1
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	0	0	0
<i>Neovascularización</i>	1	0	1
<i>Re-epitelización</i>	0	0	1
Puntuación Greenhalgh	1	1	2
ANIMALES GRUPO 3	R31	R33	R42
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	2	1	2
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	0	0	0
<i>Neovascularización</i>	0	0	1
<i>Re-epitelización</i>	0	0	0
Puntuación Greenhalgh	2	1	2
ANIMALES GRUPO 4	R50	R52	R53
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	0	0	0
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	0	0	0
<i>Neovascularización</i>	1	1	0
<i>Re-epitelización</i>	0	0	1
Puntuación Greenhalgh	1	1	1
ANIMALES GRUPO 5	R61	R63	R66
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	1	0	1
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	0	0	0
<i>Neovascularización</i>	1	0	1
<i>Re-epitelización</i>	0	0	0
Puntuación Greenhalgh	1	1	1

Tabla 10. Puntuación de la valoración histológica de los animales tras el tratamiento completo de 18 días.

ANIMALES GRUPO 1	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15
-------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

ESTUDIOS IN VIVO

Presencia de células inflamatorias	3	1	1	2	1	1	2	1	2	3	2	1
Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)	3	2	2	2	3	4	1	4	1	1	1	2
Neovascularización	2	1	2	1	2	2	2	2	1	1	3	1
Re-epitelización	3	2	3	2	3	4	2	4	2	3	1	2
Puntuación Greenhalgh	9	6	7	6	8	12	5	12	5	6	4	5
ANIMALES GRUPO 2	R18	R19	R20	R22	R23	R24	R25	R27	R28	R29	R30	
Presencia de células inflamatorias	2	2	1	1	2	2	1	3	1	3	1	
Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)	1	3	1	2	1	1	2	2	1	2	3	
Neovascularización	2	2	0	2	3	2	1	1	0	1	0	
Re-epitelización	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	4	
Puntuación Greenhalgh	4	10	4	6	5	7	7	7	5	9	12	
ANIMALES GRUPO 3	R34	R35	R36	R37	R38	R41	R43	R44	R45			
Presencia de células inflamatorias	1	0	1	3	1	2	2	3	2			
Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)	1	1	2	3	1	3	2	1	1			
Neovascularización	0	0	1	2	0	1	1	1	1			
Re-epitelización	1	1	1	2	0	3	1	2	1			
Puntuación Greenhalgh	3	3	4	10	3	10	6	9	8			
ANIMALES GRUPO 4	R47	R48	R49	R51	R54	R55	R56	R57	R58	R59	R60	
Presencia de células inflamatorias	1	1	1	2	0	1	2	2	2	2	2	
Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)	3	2	3	3	2	3	3	3	3	1	3	
Neovascularización	2	1	1	1	0	2	1	2	1	1	2	
Re-epitelización	4	0	3	2	3	4	2	2	2	1	4	
Puntuación Greenhalgh	12	3	12	10	9	12	10	11	12	5	12	
ANIMALES GRUPO 5	R64	R67	R68	R70								

Presencia de células inflamatorias	1	1	1	1
Tejido de granulación (<i>fibroblastos/depósitos de matriz extracelular</i>)	4	3	2	1
Neovascularización	3	3	1	1
Re-epitelización	4	3	2	1
Puntuación Greenhalgh	12	10	4	2

Valoración: 1 leve, 2 moderada, 3 severa y 4 muy severa.

Grado I, Grado II, Grado III, Grado IV y Grado V

Tabla 11. Resultados del estudio histológico MEDIAS DE LOS GRUPOS

	CÉLULAS INFLAMATORIAS	TEJIDO GRANULACIÓN	COCIENTE TG/CI	NEOVASCULARIZACIÓN	RE-EPITELIZACIÓN	PUNTUACIÓN GREENHALGH
GRUPO 1	1,66±0,78	2,16±1,11	1,30	1,67±0,65	2,58±0,90	7,08±2,68
GRUPO 2	1,73±0,79	1,72±0,79	1,00	1,27±1,01	2,00±0,78	6,90±2,54
GRUPO 3	1,67±1,00	1,67±0,87	1,00	0,77±0,67 [†]	1,33±0,87 [†]	6,22±3,07
GRUPO 4	1,45±0,69	2,64±0,67	1,82 [†]	1,27±0,65	2,45±1,29	9,82±3,09[†]
GRUPO 5	1,00±0,00	2,50±1,29	2,50 [†]	2,00±1,15	2,50±1,29	7,00±4,76

[†] Diferencias significativas con respecto a los grupos.

Las medias encontradas en los grupos tratados, muestran que el infiltrado inflamatorio fue leve-moderado en todos ellos, de manera que los valores se situaron entre 1 del grupo 5 y 1,72 del grupo 2. En este último grupo, la inflamación fue ligeramente superior a la del resto de los grupos, en los que fue similar. En cuando al tejido de granulación, las medias de los grupos 4 y 5 fueron superiores a los demás, sobre todo a las del grupo 3.

ESTUDIOS IN VIVO

El significado de estos hallazgos es un estadio más avanzado de recuperación en los grupos 4 y 5, ya que el infiltrado inflamatorio está siendo sustituido por fibroblastos cada vez más maduros y matriz extracelular elaborada por estos, que van a formar parte de la cicatriz. Al contrario, los grupos 2 y 3 presentaron una cantidad de células inflamatorias mayor y similar a la de fibroblastos, que aquí son más inmaduros y con menor cantidad de matriz extracelular (el cociente tejido de granulación/células inflamatorias es 1 frente al 2,5 del grupo 5 o a 1,82 del grupo 4).

La neovascularización alcanzó los valores más elevados en el grupo 5, donde la media fue de 2 (moderada). También la vascularización es un fenómeno temprano en el proceso inflamatorio, aunque perdura más en el tiempo que la presencia de células inflamatorias y contribuye al proceso cicatricial. Por último, la recuperación del epitelio fue entre moderada y severa en todos los grupos como lo demuestra que los valores medios se sitúen entre 2 y 2,5. La excepción la constituyó el grupo 3 donde se observó un mayor retraso en el cierre de la úlcera, con una recuperación entre leve y moderada (media 1,33).

La puntuación de Greenhalgh, tiene en cuenta sobre todo el tamaño de la reacción celular y la composición de ésta. Mayores grados significan una mayor maduración de la lesión hasta la recuperación completa. En el grupo 4 se ha observado una re-epitelización muy avanzada en varias muestras y la formación de un tejido conjuntivo grueso y maduro debajo de este epitelio neoformado, sobre todo en los animales con grado 4.

En conclusión, el grupo 4 es el que presenta el mayor estadio de recuperación, con un valor medio de 9,82 según la gradación de Greenhalgh, seguido de los grupos 1, 5 y 2. Sin embargo, es el grupo 3 el que presenta mayor número de muestras con un infiltrado celular poco grueso o constituido mayoritariamente por células inflamatorias y menor recuperación del epitelio

Referencias bibliográficas

Ver capítulo 7.- de bibliografía [48,49,50,51,52]

5.3.2- Estudio código SIF 109-6

Título:

Estudios in vivo en ratón diabético de evaluación de la actividad de principios activos para el tratamiento de úlceras tópicas.

Objetivo:

Evaluar la actividad terapéutica de 4 tratamientos farmacológicos (nuevas moléculas desarrolladas por Laboratorios ROVI) en la curación de úlceras tópicas en ratones genéticamente diabéticos, en base a los resultados de reducción de úlceras y estudio histológico.

Animales del estudio.

Para llevar a cabo el estudio se utilizaron 50 animales, todos ellos ratones diabéticos de la cepa *BKS.Cg-m+/+Lepr db/j*. Todos los animales fueron machos de once semanas, con un peso a su llegada de $46,67 \pm 2,76$ gramos.

Tras su recepción en el centro se identificaron mediante un sistema de código de colores. Mediante este sistema se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos.

Grupo I: Control diabético sin tratamiento (n=10)	- Negro
Grupo II: Producto de ensayo 1 (n=10): HO5106C-116 Lote 1	- Verde
Grupo III: Producto de ensayo 2 (n=10): - HO5106C-116 Lote 2	- Rojo
Grupo IV: Producto de ensayo 3 (n=10): HO5106C-116 Lote 5	- Azul
Grupo V: Producto de ensayo 4 (n=10): HO854-116 Lote 41	- Amarillo

Productos de ensayo:

Los productos utilizados en este estudio son nitroderivados con distinto grado de contenido en grupos NO.

Tabla 12. Productos de ensayo

	Producto 1	Producto 2	Producto 3	Producto 4
Nombre.	HO5106C-116	HO5106C-116	HO5106C-116	HO854-116
Identificación.	Verde	Rojo	Amarillo	Naranja
Lote.	Lote 1	Lote 2	Lote 5	Lote 41
Dosis	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg
Vehículo.	Suero salino	Suero salino	Suero salino	Suero salino
Vía administración.	Subcutánea	Subcutánea	Subcutánea	Subcutánea
Vol. administración.	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml

Diseño del estudio y descripción de las intervenciones

El primer día del ensayo se realizó la herida en el lomo del animal. A partir del segundo día del ensayo y durante un total de 38 días, los animales se medican con los tratamientos asignados a la dosis de 10 mg/Kg siendo el volumen de administración 0,5 ml/ratón por vía subcutánea en el lomo del animal, evitando la zona de la herida. En función de los valores de áreas obtenidos se valora la continuación o el cese del tratamiento.

Se realiza el seguimiento de los animales durante un período de 38 días valorándose macroscópicamente la evolución de las heridas 2 veces por semana. La valoración se realiza mediante fotografía digital de la herida y análisis posterior de la imagen.

Se utiliza como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención.

Tras la última medida se eutanasian los animales. La zona de la piel dónde se produjo la herida se conserva hasta su procesamiento: una mitad en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina) y la otra mitad se congela en nitrógeno líquido para la determinación de citoquinas conservando las muestras posteriormente en congelador (-80 ± 5 °C). Todas las muestras conservadas en formol se envían para su posterior análisis histológico.

Resultados

En el siguiente apartado se describen todos los resultados obtenidos a lo

largo del estudio. Esto es, la evolución de la curación/cierre de las heridas y la evaluación histológica de las mismas realizado el último día del estudio.

Área de las heridas.

En las Tablas 13 y 14 y Figuras 36 y 37 se muestran los valores globales de la evolución del área de las heridas a lo largo del estudio, así como del porcentaje de reducción o curación de las mismas.

La reducción de las heridas y por tanto la disminución del área de las mismas y el aumento del porcentaje de reducción es significativo ($p < 0,05$) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera para el grupo 3; a partir del día 10 tras la creación de la úlcera para los grupos 1, 4 y 5; a partir del día 14 para el grupo 2.

Se observa que los grupos 3 y 5 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 60% a partir del día 21, mientras que esta reducción no se observa a este tiempo en el resto de los grupos. El grupo 5 alcanza el día 28 el 91% de reducción de la úlcera.

El grupo 3 (Producto de ensayo 2: HO5106C-116 Lote 2) y el grupo 5 (Producto de ensayo 4: HO854-116 Lote 41) muestran significativamente ($p < 0,05$) un menor tiempo necesario para la reducción de la úlcera respecto al resto de los grupos.

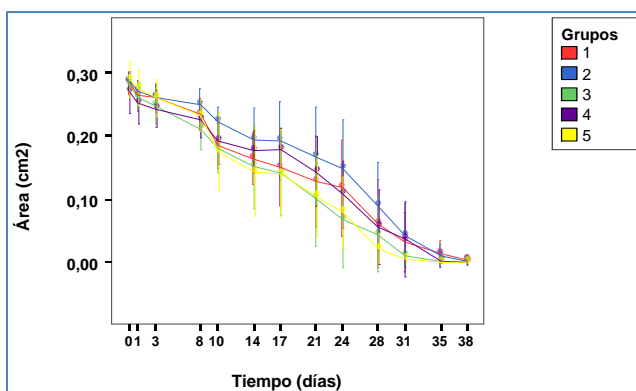


Figura 33. Evolución del área durante el estudio

Tabla 13. Evolución del área durante el estudio

Área (cm ²)					
Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	0,28±0,02	0,29±0,01	0,28±0,01	0,27±0,03	0,29±0,03
1	0,26±0,02	0,27±0,01	0,26±0,02	0,25±0,03	0,28±0,03
3	0,26±0,02	0,26±0,02	0,25±0,03	0,24±0,03	0,26±0,03
8	0,23±0,02	0,25±0,02	0,21±0,03	0,22±0,03	0,23±0,02
10	0,18±0,04*	0,22±0,02*	0,18±0,04*	0,19±0,04*	0,17±0,06*
14	0,16±0,04*	0,19±0,05*	0,15±0,06*	0,18±0,03*	0,14±0,07*
17	0,15±0,06*	0,19±0,06*	0,14±0,07*	0,18±0,03*	0,14±0,07*
21	0,13±0,07*	0,17±0,08*	0,10±0,07*†	0,14±0,05*	0,10±0,06*†
24	0,12±0,08*	0,15±0,08*	0,07±0,08*†	0,11±0,05*	0,08±0,06*†
28	0,06±0,07*	0,09±0,07*	0,04±0,06*†	0,05±0,06*	0,02±0,02*†
31	0,03±0,05*	0,04±0,05*	0,01±0,01*†	0,04±0,06*	0,00±0,01*†
35	0,01±0,02*	0,01±0,02*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
38	0,00±0,01*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales muertos y el animal 31.

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

Tabla 14. Evolución de la reducción de las úlceras

% Reducción de la úlcera					
Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1	7,16±4,27	5,70±3,32	6,78±3,26	6,42±3,93	4,45±5,28
3	8,35±4,05	9,36±4,31	11,70±6,75	9,53±3,34	9,87±6,91
8	17,59±7,55	13,18±6,20	24,75±10,07*†	15,87±5,95	19,10±8,86
10	34,50±12,94*	22,73±7,06	35,69±12,76*	28,38±11,96*	39,20±22,03*
14	42,00±15,16*	32,62±17,81*	46,23±22,75*	33,84±12,27*	49,27±25,96*
17	46,53±21,95*	32,87±21,81*	49,42±23,66*	33,59±11,35*	50,43±25,45*
21	53,82±26,75*	41,88±27,59*	64,59±25,74*†	45,92±20,80*	62,66±24,01*†
24	57,62±28,24*	48,26±27,89*	76,12±26,11*†	59,55±20,03*	71,61±21,72*†
28	78,12±24,26*	68,61±25,01*	84,74±20,30*†	78,52±22,46*	91,77±8,76*†
31	88,49±16,18*	85,08±18,18*	96,58±5,46*†	86,11±22,09*	98,45±2,08*†
35	95,03±7,09*	96,28±6,36*	99,13±1,54*	99,45±0,97*	99,91±0,28*
38	97,91±6,09*	99,51±1,47*	100,00±0,00*	100,00±0,00*	100,00±0,00*

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales muertos y el animal 31.

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

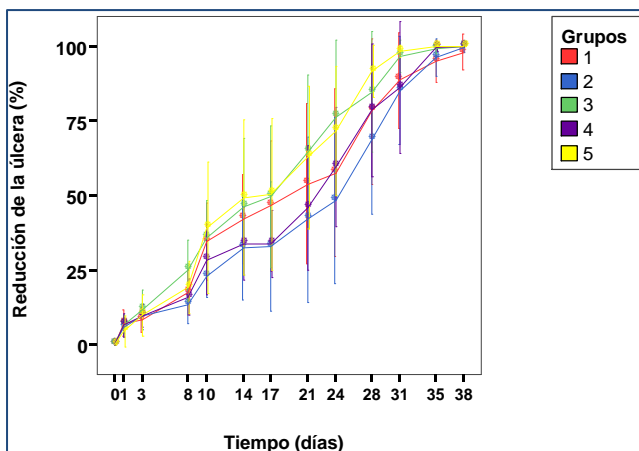


Figura 34. Evolución de la reducción de las úlceras

Evaluación histopatológica.

En la piel de los animales de este experimento, se valora la presencia de células inflamatorias, el tejido de granulación, constituido principalmente por fibroblastos y matriz extracelular, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la re-epitelización de la úlcera creada. Además, a cada muestra se le ha asignado un valor del 1 al 15 correspondiente a la valoración realizada por Greenhalgh y col. en función del grosor del tejido de granulación, angiogénesis, infiltrado celular y la re-epitelización.

En los grupos se encuentran animales con distintos grados de lesión; su número y porcentaje queda reflejado en las tablas 15, 16 y 17.

Tabla 15. Porcentajes del grado obtenido dentro de cada Grupo

Grupo	Grado	Nº de animales	Porcentaje (%)
1	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
	IV	1	10

	V	9	90
	I	0	0
	II	0	0
2	III	0	0
	IV	2	22
	V	7	78
	I	0	0
	II	0	0
3	III	0	0
	IV	4	44
	V	5	56
	I	0	0
	II	0	0
4	III	0	0
	IV	4	44
	V	5	56
	I	0	0
	II	0	0
5	III	1	10
	IV	3	30
	V	6	60

GRADO I

Según este criterio, un grado I de lesión corresponde con la ausencia de respuesta inflamatoria o de tejido de granulación sin recuperación del epitelio de la epidermis. En ninguno de los grupos estudiados se observa este grado.

GRADO II

Tampoco se han encontrado muestras con un grado II, que sería aquel en el que el tejido de granulación es fino e inmaduro y dominado por células inflamatorias con pocos fibroblastos y matriz extracelular y con escasa recuperación del epitelio de la epidermis.

GRADO III

En cambio, sí aparece un animal con un grado III en el grupo V (muestra 41R). El tejido de granulación es moderadamente grueso y con un componente elevado de células inflamatorias, sobre todo en la dermis, en forma de pequeños granulomas formados principalmente por neutrófilos con presencia de macrófagos y células gigantes multinucleadas. También se observan fibroblastos y matriz extracelular, pero en menor cantidad. Aparece una recuperación moderada de la úlcera, con re-epitelización de ésta y formación de pústulas con neutrófilos sobre la epidermis. La presencia de un aumento en el número de vasos es moderada.

GRADO IV

En grado IV se observa en 14 animales pertenecientes a los 5 grupos del estudio, aunque sobre todo en los grupos 3 y 4.

Este grado se caracteriza por un tejido de granulación grueso y vascular y está formado predominantemente por gran cantidad de fibroblastos tanto jóvenes, con grandes núcleos y citoplasmas alargados, como más maduros con núcleos pequeños y citoplasmas más amplios. Así mismo, aparecen extensos depósitos de matriz extracelular. En estas muestras, en la dermis no se observan anexos cutáneos como folículos pilosos o glándulas sebáceas dado este proceso de fibrosis.

La presencia de células inflamatorias se mantiene en todas las muestras, aunque su valor es entre leve y moderado y aparece en forma de pústulas constituidas por neutrófilos. En un caso del grupo 1 es más severo dado el mayor tamaño de las pústulas. El infiltrado de la dermis lo componen sobre todo macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.

La presencia de neovasos en las muestras de este grado es mayoritariamente leve, siendo moderada en dos casos (grupos 1 y 4) y no se observa en otros 3 de los grupos 3, 4 y 5, ya que la mayor parte del tejido de granulación está constituido por los fibroblastos y la matriz extracelular.

El epitelio en este grado se recupera de forma parcial o casi totalmente, quedando sólo algunos restos de la ulceración en 1 animal del grupo 1, 1 del grupo 3 y 2 del grupo 4.

En estas muestras, la inflamación se sitúa sobre todo en las capas córneas de la epidermis en forma de pústulas, mientras que en la dermis, la presencia de mayor cantidad de tejido fibroso que de componente inflamatorio significa un proceso de cronificación, con una reparación de la lesión que se evidencia en la re-epitelización de la úlcera. El número de vasos también se reduce a medida que evoluciona el proceso de fibrosis de la herida.

GRADO V

La mayoría de las muestras de este estudio se incluyen en el grado V. En este grado, el área de la herida está totalmente epitelizada excepto en el animal R7 del grupo 1 y tan sólo en algunos casos se observa la presencia de escasas células inflamatorias, un ligero aumento del tejido conjuntivo de la dermis (moderado en dos casos del grupo 1 y 1 del grupo 3) o una hiperplasia de la epidermis. En muchas ocasiones se recuperan también los anexos cutáneos.

El aumento en el número de vasos, o no se observa o es mínimo en todos los animales de este grado.

La maduración de los fibroblastos, la desaparición de las células inflamatorias y la reducción de los vasos junto con la reparación completa de la epidermis sería el paso final de la recuperación.

Descripción por grupos:

En casi todos los animales de todos los grupos, el epitelio se encuentra totalmente recuperado y las lesiones que se observan son de grado leve o moderado, siendo fundamentalmente, un aumento del tejido fibroso situado debajo de la epidermis con una presencia más o menos numerosa de células inflamatorias. La epidermis está aumentada de grosor y existe una disminución en el número de anexos cutáneos, tanto folículos pilosos como glándulas sebáceas asociadas a ellos.

El **grupo 1** es el que presenta una mayor recuperación de la ulceración ya que 9 de los 10 animales se encuentran en el grupo V de la clasificación de Greenhalgh. En todas las muestras excepto en la R3, el epitelio está completo, la presencia de células inflamatorias es escasa y tan sólo se observa un aumento del grosor del tejido conjuntivo y también un ligero aumento del número de vasos en la dermis. Sólo la muestra R3 se aleja un poco de esta imagen, con una mayor presencia de células inflamatorias que dan lugar a la formación de pústulas sobre la capa cornea de la epidermis y una pérdida del epitelio que no recubre totalmente la úlcera.

En el **grupo 2** todos los animales presentan una recuperación completa del epitelio en la zona de la lesión. Sin embargo, la presencia de las células inflamatorias es mayor que en el grupo anterior, así como el tejido conjuntivo y la matriz extracelular. La neovascularización es ligera y está sólo presente en algunas de las muestras estudiadas.

En el **grupo 3** también el epitelio está recuperado en la mayoría de los animales, pero es donde se observa una mayor presencia de células inflamatorias en las muestras y también mayor cantidad de tejido de granulación en la dermis. La neovascularización sigue siendo leve. El número de animales incluidos en el grupo IV y V de la clasificación de Greenhalgh es similar (4/5).

Del mismo modo, en el **grupo 4**, las muestras observadas presentan un grado de lesión similar a las del grupo 3, con 4 animales incluidos en el grupo IV y 5 en el grupo V de la clasificación de Greenhalgh. También hay presencia entre leve y moderada de células inflamatorias y siempre leve de tejido de granulación maduro.

En el **grupo 5**, excepto en la muestra R41 en la que se observa una severa inflamación en la dermis en forma de pequeños granulomas, en el resto, la recuperación es muy evidente, de manera que en 6 de las muestras, la piel está prácticamente normal.

En el animal R41, la inflamación parece estar más asociada a una infección secundaria que a la presencia de células de recuperación de la ulceración por la disposición de éstas y la presencia de células gigantes multinucleadas.

En conclusión, el grupo más recuperado es el 1, junto con el 2 y el 5 (si excluimos el animal 41) y el que presenta la menor recuperación es el grupo 3, aunque en todos ellos, es muy evidente la reducción de la lesión y la reepitelización de la úlcera.

Tabla 16. Puntuación de la valoración histológica de los animales tras el tratamiento completo de 38 días

ANIMALES GRUPO 1	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	1	1	3	1	1	0	1	1	0	0
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1
<i>Neovascularización</i>	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0
<i>Re-epitelización</i>	4	4	3	4	4	4	3	4	4	4
Puntuación Greenhalgh	13	15	12	14	15	15	14	15	15	15

ANIMALES GRUPO 2	R11	R12	R13	R14	R15	R17	R18	R19	R20
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	0	0	2	1	0	2	1	1	1
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	1	0	2	1	1	2	1	0	1
<i>Neovascularización</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	1
<i>Re-epitelización</i>	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Puntuación Greenhalgh	15	15	11	13	15	11	15	13	13

ANIMALES GRUPO 3	R21	R22	R23	R24	R25	R27	R28	R29	R30
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	1	1	1	1	2	0	1	1	2
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	0	1*	0	0	0	1	2	2	2
<i>Neovascularización</i>	0	1	0	0	1	0	0	0	1
<i>Re-epitelización</i>	4	4	4	4	3	4	4	4	4
Puntuación Greenhalgh	14	11	15	14	12	15	13	12	11

* Zona de calcificación

ESTUDIOS IN VIVO

ANIMALES GRUPO 4	R32	R33	R34	R35	R36	R37	R38	R39	R40
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	2	0	1	0	0	2	1	2	1
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	1
<i>Neovascularización</i>	0	0	1	0	0	2	0	0	1
<i>Re-epitelización</i>	3	4	4	4	4	3	4	4	4
<i>Puntuación Greenhalgh</i>	12	13	12	15	15	10	15	11	13

ANIMALES GRUPO 5	R41	R42	R43	R44	R45	R46	R47	R48	R49	R50
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	3	0	2	1	0	0	0	1	0	0
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	1	1	2	1	1	0	1	1	1	1
<i>Neovascularización</i>	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>Re-epitelización</i>	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<i>Puntuación Greenhalgh</i>	7	14	10	12	14	15	15	12	15	15

Valoración: 1 leve, 2 moderada, 3 severa y 4 muy severa.

Grado I, Grado II, Grado III, Grado IV y Grado V

Tabla 17. Resultado del estudio histológico

	Células inflamatorias	Tejido granulación	Cociente TG/CI	Neovascularización	Re-epitelización	Puntuación Greenhalgh
GRUPO 1	0,90±0,87	1,30±0,48	1,44	1,00±0,47	3,80±0,42	14,30±1,06
GRUPO 2	0,89±0,78	1,00±0,71	1,12	0,55±0,53	4,00±0,00	13,44±1,67
GRUPO 3	1,11±0,60	0,89±0,93	0,80†	0,33±0,50	3,89±0,33	13,00±1,58
GRUPO 4	1,00±0,87	0,89±0,33	0,89†	0,44±0,73	3,78±0,44	12,89±1,83
GRUPO 5	0,70±1,06†	1,00±0,47	1,43	0,50±0,71	3,80±0,63	12,90±2,68

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales muertos y el animal 31.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

Las medias encontradas en los grupos tratados, muestran que el infiltrado inflamatorio es leve en todos ellos, de manera que los valores se sitúan entre 0,70 del grupo 1 y 1,11 del grupo 3. El significado de estos hallazgos es un estadio muy avanzado de recuperación en todos los grupos aunque menor en los grupos 3 y 4 que presentan un cociente tejido de granulación/células inflamatorias de 0,80-0,89 frente al 1,43 del grupo 5.

La neovascularización es leve en todos los grupos ya que la vascularización es un fenómeno temprano en el proceso inflamatorio que contribuye al proceso cicatricial. Por último, la recuperación del epitelio es entre severa y muy severa en todos los grupos como lo demuestra que los valores medios se sitúen entre 3,8 y 4,0. Se observa por tanto un cierre elevado de la úlcera.

La puntuación de Greenhalgh, tiene en cuenta sobre todo el tamaño de la reacción celular y la composición de ésta. Mayores grados significan una mayor maduración de la lesión hasta la recuperación completa.

En los grupos I, II y V predomina el tejido de granulación sobre el componente inflamatorio y son los grupos que presentan el mayor valor en la puntuación de Greenhalgh. La re-epitelización es similar en los tres grupos aunque en el II todas las muestras presentan la recuperación completa del epitelio.

En todos los grupos se ha observado una re-epitelización muy avanzada y la formación de un tejido conjuntivo grueso y maduro debajo de este epitelio neoformado.

En conclusión, los grupos más recuperados son el 1, 2 y el 5 (si se excluye el animal 41) y el que presenta la menor recuperación es el grupo 3, aunque en todos ellos, es muy evidente la reducción de la lesión y la reepitelización de la úlcera.

En los dos estudios realizados en ratón diabético se puede concluir que los productos ensayados, administrados por vía subcutánea, muestran en general una positiva evolución de la herida, tanto en la reducción del área de la lesión como en la recuperación histológica.

Referencias bibliográficas

Ver capítulo 7 de bibliografía [48,49,50,51,52]

5.3.3- Estudio código SIF 109-7

Título:

Estudios in vivo en modelo ratón diabético. Evaluación de la actividad de principios activos por vía tópica para el tratamiento de úlceras tópicas

Objetivo

Evaluar la actividad terapéutica de 4 tratamientos farmacológicos (nuevas moléculas desarrolladas por Laboratorios ROVI) por vía tópica en la curación de úlceras cutáneas en ratones genéticamente diabéticos, basándonos en resultados de reducción de úlceras y estudio histológico.

Como se ha mencionado en estudios anteriores, el ratón genéticamente diabético desarrolla resistencia a la insulina e hiperglucemia similares a las observadas en la diabetes del adulto.

Se trata de un modelo para el desarrollo de estrategias para el tratamiento de heridas en enfermos diabéticos.

Animales del estudio.

Para llevar a cabo el estudio han sido utilizados 40 animales, todos ellos ratones diabéticos de la cepa **BKS.Cg-m⁺/+Lepr db/j**.

Tras su recepción en el centro fueron sometidos a una exhaustiva exploración clínica. Transcurridos diez días de aclimatación fueron identificados mediante un sistema de código de colores. Mediante este sistema se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos.

- | | |
|--|-----------------|
| Grupo I: Producto de ensayo 1 (n=8): RG-001 | Verde |
| Grupo II: Producto de ensayo 2 (n=8): RG-002 | Rojo |
| Grupo III: Producto de ensayo 3 (n=8): RG-003 | Amarillo |
| Grupo IV: Producto de ensayo 4 (n=8): SR-001 | Naranja |
| Grupo V (n=8): Control no tratado | Azul |

Productos de ensayo

Tabla 18. Productos de ensayo

	PRODUCTO 1	PRODUCTO 2	PRODUCTO 3	PRODUCTO 4
Nombre.	RG-001	RG-002	RG-003	SR-001
Identificación.	Verde	Rojo	Amarillo	Naranja
Dosis	15 mg	15 mg	15 mg	15 mg
Vía administración.	TÓPICA	TÓPICA	TÓPICA	TÓPICA
Vol. administración.	0.5 ml/animal	0.5 ml/animal	0.5 ml/animal	0.5 ml/animal

Sujetos de estudio

La investigación se ha llevado a cabo con 40 ratones machos. Todos los animales fueron sometidos a una exhaustiva evaluación clínica previa para excluir los animales con algún tipo de signo patológico como descarga nasal, diarreas, etc. Dicha evaluación incluyó la auscultación de frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, calidad del pulso, color de las mucosas, tiempo de relleno capilar y temperatura rectal.

Transcurridos diez días de aclimatación, en el animalario del centro, fueron identificados mediante un sistema de código de colores y así fueron distribuidos aleatoriamente en los cinco grupos de estudio detallados con anterioridad.

Diseño del estudio y descripción de las intervenciones

El primer día del ensayo se anestesiaron los animales con anestesia inhalatoria con isoflurano al 2% en oxígeno al 100% con un Flujo de gas fresco de 2 L/min. Se rasuró el lomo del animal, se limpió la zona con desinfectante y se marcó la situación de la herida, mediante plantilla para igualar su posición en todos los animales. La herida se realizó mediante una incisión circular de 0,6 cm de diámetro mediante un punch de biopsia cutánea, extirpándose la piel de la zona media dorsal. Posteriormente se colocó una lámina de silicona de 1,2 mm de grosor con una apertura central circular de 12 mm de diámetro interno la cual se adhirió a la piel con cianoacrilato y se fijó con 4 puntos de nylon 6/0 para minimizar y evitar la retracción de la piel. Se administró por vía i.p. 0,5 ml/animal de suero fisiológico después de la intervención.

ESTUDIOS IN VIVO

Durante los 7 días posteriores a la intervención se administró analgesia (Paracetamol, 1 mg/ml) en el agua de bebida.

Al día siguiente y durante un total de 18 días, los animales se medicaron con los tratamientos asignados a la dosis de aproximadamente 15 mg por vía tópica en la zona central de la herida. La zona de la herida se tapó con un apósito de gasa humedecido con solución salina que mantenía el entorno de la herida limpio y húmedo y con un apósito semipermeable (Tegaderm film) que evitaba que la gasa se secase y se moviese de la zona ulcerada. En función de los valores de áreas obtenidos se valoró la continuación o el cese del tratamiento, considerando apropiado eutanasiar a los animales a los 18 días del estudio.

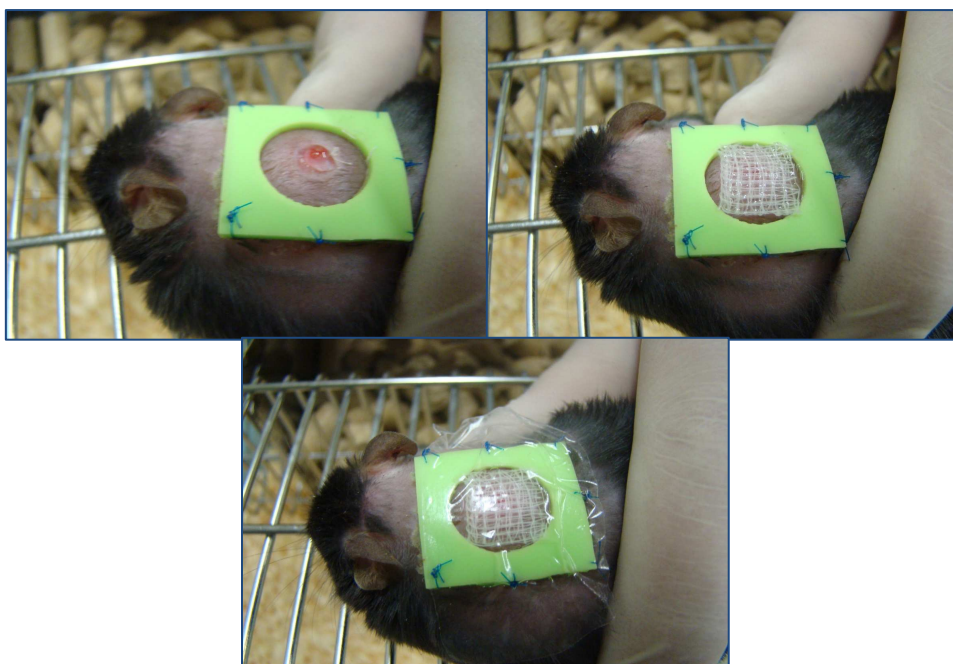


Figura 35. Creación de la herida

Se realizó el seguimiento de los animales durante un período de 18 días valorándose macroscópicamente la evolución de las heridas 2 veces por semana. La valoración se realizó mediante fotografía digital de la herida y análisis posterior de la imagen. Se registró también el peso corporal de los animales dos veces por semana.

Se utilizó como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención.

Tras la última medida se eutanasiaron los animales. La zona de la piel dónde se produjo la herida se conservó hasta su procesamiento: una mitad en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina) y la otra mitad se congeló en nitrógeno líquido para la determinación de citoquinas conservando las muestras posteriormente en congelador (-80 ± 5 °C). Todas las muestras conservadas en formol fueron enviadas para su posterior análisis histológico al laboratorio de análisis anatomopatológico.

Resultados

En el siguiente apartado se describen todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio. Esto es, la evolución de la curación/cierre de las heridas y la evaluación histológica de las mismas realizado el último día del estudio.

No se ha producido ninguna muerte de los animales que han formado parte del estudio. Sin embargo los animales del grupo III (tratamiento 3: RG-003) presentaron durante los primeros 10 días tras la creación de la úlcera sangre abundante en la zona de la úlcera como se puede ver en la fotografía que se adjunta.



Figura 36. Evolución de la herida

Los animales 15 (grupo 2) y 18 (grupo 3) se eliminan del estudio estadístico ya que sus resultados se desvían del resto de los animales del estudio.

Área de las heridas.

En las Tablas 19 y 20 y Figuras 41 y 42 se muestran los valores globales de la evolución del área de las heridas a lo largo del estudio, así como del porcentaje de reducción o curación de las mismas.

La reducción de las heridas y por tanto la disminución del área de las mismas y el aumento del porcentaje de reducción es significativo ($p < 0,05$) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera para todos los grupos.

Se observa que los grupos 1, 2, 4 y 5 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 60% a partir del día 8 mientras que esta reducción no se observa a este tiempo en el grupo 3.

El grupo 3 (Producto de ensayo 3: RG-003) muestra significativamente ($p < 0,05$) valores menores de reducción de úlcera a los días 8 y 10 del estudio.

Tabla 19. Evolución del área durante el estudio

Tiempo (días)	ÁREA (cm ²)				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	0,28±0,02	0,29±0,02	0,28±0,02	0,29±0,01	0,28±0,01
1	0,28±0,02	0,28±0,02	0,27±0,02	0,28±0,01	0,27±0,01
3	0,27±0,02	0,25±0,03	0,26±0,02	0,26±0,01	0,25±0,02
8	0,10±0,03*	0,09±0,04*	0,14±0,03*†	0,09±0,05*	0,09±0,02*
10	0,04±0,03*	0,04±0,03*	0,08±0,03*†	0,04±0,03*	0,04±0,02*
14	0,00±0,01*	0,01±0,01*	0,01±0,01*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
17	0,01±0,02*	0,00±0,00*	0,01±0,02*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
18	0,00±0,01*	0,00±0,00*	0,00±0,01*	0,00±0,00*	0,00±0,00*

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales 15 y 18.

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

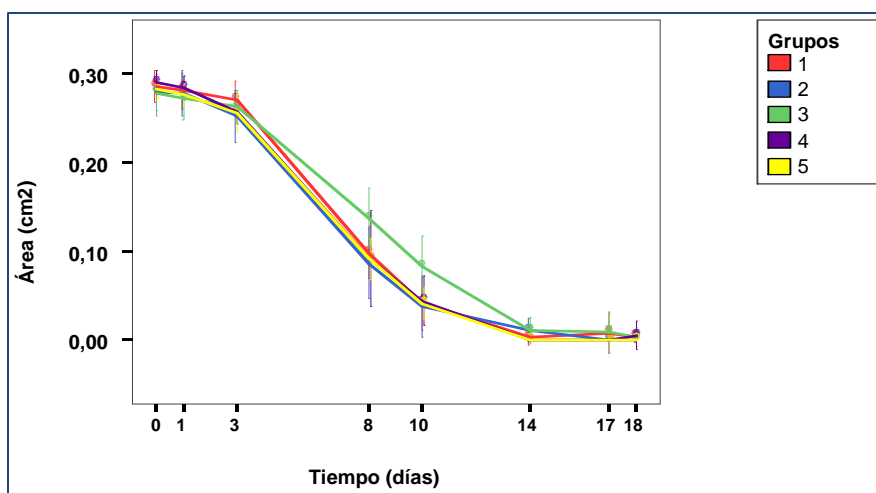


Figura 37. Evolución del área durante el estudio

Tabla 20. Evolución de la reducción de las úlceras

% DE REDUCCIÓN DE LA ÚLCERA					
Tiempos (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1	1,69±1,70	0,45±3,11	1,98±1,68	2,14±1,84	1,94±1,30
3	5,04±1,85	9,71±7,58	5,14±3,49	11,25±4,93	9,44±5,64
8	65,11±10,75*	69,39±12,57*	50,18±13,96*†	68,24±19,00*	67,52±8,72*
10	85,23±10,74*	87,02±11,08*	69,69±14,05*†	84,58±9,94*	85,21±6,96*
14	98,57±3,50*	96,07±5,04*	95,67±5,87*	100,00±0,00*	100,00±0,00*
17	97,14±8,08*	100,00±0,00*	96,59±9,01*	100,00±0,00*	100,00±0,00*
18	98,83±2,20*	100,00±0,00*	98,52±3,92*	100,00±0,00*	100,00±0,00*

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales 15 y 18.

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.ojo, el pie

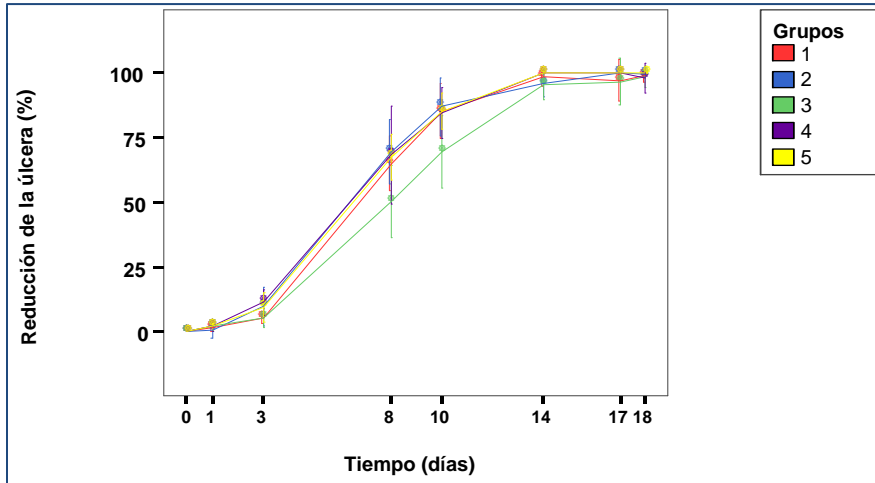


Figura 38. Evolución de la reducción de las úlceras.

Evaluación histopatológica

En la piel de los animales de este experimento, se ha valorado la presencia de células inflamatorias, el tejido de granulación, constituido principalmente por fibroblastos y matriz extracelular, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la re-epitelización de la úlcera creada. Además, a cada muestra se le ha asignado un valor del 1 al 15 correspondiente a la valoración realizada por Greenhalgh y col. en función del grosor del tejido de granulación, angiogénesis, el infiltrado celular y la re-epitelización.

En todos los grupos se han encontrado animales con los distintos grados de lesión, aunque su número ha sido diferente.

El resumen es el siguiente:

Tabla 21. Porcentajes del grado obtenido dentro de cada Grupo.

GRUPO	GRADO	Nº DE ANIMALES	PORCENTAJE (%)
1	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
	IV	4	50
	V	4	50
2	I	0	0
	II	0	0
	III	3	43
	IV	1	14
	V	3	43
3	I	0	0
	II	2	28
	III	2	28
	IV	1	14
	V	2	28
4	I	0	0
	II	2	25
	III	2	25
	IV	3	37
	V	1	13
5	I	0	0
	II	3	37
	III	1	13
	IV	0	0
	V	4	50

GRADO I

Un grado I de lesión corresponde con la ausencia de respuesta inflamatoria o de tejido de granulación sin recuperación del epitelio de la epidermis. En ninguno de los grupos estudiados se ha observado este grado.

GRADO II

Muestras con un grado II se han encontrado en los grupos 3 (n=2), 4 (n=2) y 5 (n=3). En este grado el tejido de granulación es fino e inmaduro y dominado por células inflamatorias, que es el componente mayoritario. El infiltrado es severo en casi todos los animales de este grado excepto en el R29 perteneciente al grupo 4 en el que es moderado. Las células son sobre todo neutrófilos y macrófagos, propios de una inflamación de tipo más agudo. La presencia de fibroblastos es menor aunque varía de leve en 4 casos, moderada en 2 y severa en 1. Tampoco la presencia de neovasos es muy evidente.

Se observa una escasa recuperación del epitelio de la epidermis cuya pérdida es completa en un animal del grupo 3 y en dos del grupo 5.

GRADO III

En ocho muestras correspondientes a los grupos 2, 3, 4 y 5 aparecen animales con un grado III ya que el tejido de granulación es moderadamente grueso y con un componente más o menos similar de células inflamatorias y fibroblastos aunque en los casos en los que predomina uno, este es el componente inflamatorio. El grado de maduración de los fibroblastos es moderado, de manera que predominan los fibroblastos jóvenes sobre los maduros y la presencia de éstos sobre la matriz extracelular. Las células inflamatorias son de tipo mixto con neutrófilos, macrófagos y células plasmáticas.

En este caso ya se observa una recuperación moderada o incluso completa de la úlcera, con reepitelización de ésta, pero los animales se mantienen en este grado dado el grosor del tejido de granulación, la elevada presencia de células inflamatorias y la formación de pústulas con neutrófilos sobre la epidermis.

GRADO IV

En grado IV es observado en 9 animales pertenecientes a los grupos 1 (n=4), 2 (n=1), 3 (n=1) y 4 (n=3) del estudio. En este grado el tejido de granulación es grueso y vascular y está formado predominantemente por fibroblastos y depósitos de matriz extracelular desde moderado a muy severo. Su proporción es mayor que la de la presencia de células inflamatorias, que en casi todas las muestras es leve o moderada. La presencia de neovasos es moderada en casi todas las muestras de este grado.

El epitelio se ha recuperado de forma parcial o casi totalmente, quedando sólo algunos restos de la ulceración en los animales del grupo 1 y presencia de pústulas pero de pequeño tamaño. En estas muestras, en la dermis no se observan anexos cutáneos como folículos pilosos o glándulas sebáceas dado este proceso de fibrosis.

GRADO V

En este grado, presente en todos los grupos pero sobre todo en el 1, el área de la herida estaba totalmente re-epitelizada presentando una hiperplasia de la epidermis y tan sólo en algunos casos se observa la presencia de escasas células inflamatorias, un ligero aumento del tejido conjuntivo de la dermis constituido fundamentalmente por fibroblastos maduros y matriz extracelular y una escasa presencia también de neovasos. En muchas ocasiones se han recuperado los anexos cutáneos.

Resultados histológicos por grupos

Los grupos en los que el infiltrado inflamatorio es menor son el grupo I y el grupo II, aunque en el grupo I, el tamaño del tejido de granulación es superior y el mayor de todos los grupos con lo que el cociente entre el tejido de granulación y la presencia de células inflamatorias es también mayor. Sin embargo, los grupos III y V son los que presentan mayor cantidad de células inflamatorias en la zona de reparación de la lesión y una menor cantidad de tejido de granulación, con lo que el cociente es menor.

Por tanto, la recuperación se encuentra en un estadio más avanzado en los grupo I y II, ya que el infiltrado inflamatorio está siendo sustituido por fibroblastos cada vez más maduros y matriz extracelular elaborada por estos, que van a formar parte de la cicatriz. Al contrario, el grupo V presenta una cantidad de células inflamatorias casi el doble de severo que el tejido de granulación ya que el cociente es próximo a 0,5. En los grupos III y IV la proporción de células inflamatorias es similar a la de fibroblastos (el cociente tejido de granulación/células inflamatorias es 1 en el grupo III y 0,93 en el grupo IV).

La neovascularización alcanzó los valores más elevados en el grupo III, donde la media fue de 1,57. Por último, la recuperación del epitelio es muy evidente como demuestra que los valores medios se sitúen entre el 2,62 del grupo V y el 3,75 del grupo I.

La puntuación de Greenhalgh, tiene en cuenta sobre todo el tamaño de la reacción celular y la composición de ésta. Mayores grados significan una mayor maduración de la lesión hasta la recuperación completa.

ESTUDIOS IN VIVO

GRUPO 1: La mitad de los animales de este grupo pertenecen al grado IV y la otra mitad al V de Greenhalgh. Se observa una presencia de células inflamatorias constituida sobre todo por neutrófilos y macrófagos entre leve y moderada. La presencia de tejido de granulación con fibroblastos y matriz extracelular es desde delgado a muy grueso. Sin embargo, la re-epitelización estuvo presente en la mayoría de los animales y sólo en dos aparecieron pequeñas úlceras en la epidermis.

GRUPO 2: En este grupo hay tres animales con un grado III de Greenhalgh, uno de ellos con una pérdida extensa de la epidermis. En el resto, este epitelio está prácticamente recuperado. Se mantiene la presencia de células inflamatorias con un grado de severidad similar a la presencia de tejido de granulación (entre leve y moderada) excepto en el animal R14 en la que es muy severa. También la presencia de neovasos es mayoritaria en el grupo aunque con carácter leve.

GRUPO 3: En el grupo 3, aunque hay 4 muestras donde el epitelio aparece completamente recuperado, hay otras tres en donde la ulceración se mantiene o incluso es extensa. El infiltrado inflamatorio está presente en todos los animales del grupo siendo leve en 2 casos, moderado en otros 2 y severo en 3. Se localiza en la dermis, entre el tejido de granulación o sobre el epitelio dando lugar a formación de pústulas más o menos numerosas. El tejido de granulación está menos maduro, con menor cantidad de matriz extracelular que en grupos anteriores y la formación de neovasos es sólo severa en una muestra (R24).

GRUPO 4: Como en el grupo anterior, hay 4 animales con una recuperación completa del epitelio, mientras que en otros 2 esta recuperación es moderada o incluso pequeña en los 2 restantes. Por ello, hay 3 animales incluidos el grado IV y uno en el V, 2 en el grado III y 2 en el grado II. La inflamación es sobre todo moderada o severa predominando sobre la formación de tejido de granulación, que es menor al tratarse de una recuperación más tardía.

GRUPO 5

En este grupo, 3 muestras pertenecen al grado II de Greenhalgh ya que el epitelio de la epidermis no está recuperado con presencia de zonas de ulceración. El resto de las muestras se distribuyen entre los grados III (n=1) y V (n=4) porque aunque en el epitelio está recuperado, aparece más infiltrado inflamatorio (grado III) o un tejido de granulación más maduro (grupo V). La presencia de neovasos también aparece con diferente intensidad en la mayoría de las muestras. Se trata por tanto del grupo más heterogéneo del experimento.

Tabla 22. Puntuación de la valoración histológica de los animales tras el tratamiento completo de 18 días.

ANIMALES GRUPO 1	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	1	1	2	1	1	2	1	1
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	2	1	3	1	2	4	4	3
<i>Neovascularización</i>	1	0	2	0	1	0	0	0
<i>Re-epitelización</i>	4	4	3	4	4	4	4	3
Puntuación Greenhalgh	13	13	10	14	14	12	12	11
ANIMALES GRUPO 2	R9		R10	R11	R12	R13	R14	R16
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	1		1	2	1	1	4	2
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	1		2	2	2	3	1	2
<i>Neovascularización</i>	0		2	1	1	1	1	1
<i>Re-epitelización</i>	4		4	4	4	4	0	3
Puntuación Greenhalgh	14		12	9	13	13	7	8
ANIMALES GRUPO 3	R17		R19	R20	R21	R22	R23	R24
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	3		3	1	3	2	2	1
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	2		2	4	1	2	2	2
<i>Neovascularización</i>	1		1	1	1	2	2	3
<i>Re-epitelización</i>	0		4	4	1	4	2	4
Puntuación Greenhalgh	6		9	14	5	12	8	13
ANIMALES GRUPO 4	R25	R26	R27	R28	R29	R30	R31	R32
<i>Presencia de células inflamatorias</i>	2	2	1	3	2	1	2	1
<i>Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)</i>	1	2	3	1	1	1	1	3

ESTUDIOS IN VIVO

Neovascularización	1	2	2	0	0	0	2	2
Re-epitelización	3	4	4	1	1	4	3	4
Puntuación Greenhalgh	9	10	12	5	5	14	9	12
ANIMALES GRUPO 5	R33	R34	R35	R36	R37	R38	R39	R40
Presencia de células inflamatorias	1	2	3	1	3	3	3	1
Tejido de granulación (fibroblastos/depósitos de matriz extracelular)	1	1	1	0	2	3	1	1
Neovascularización	0	1	3	0	1	2	3	1
Re-epitelización	4	4	0	4	0	1	4	4
Puntuación Greenhalgh	15	14	4	15	4	5	7	14

Valoración: 1 leve, 2 moderada, 3 severa y 4 muy severa.

Tabla 23. Resultados del estudio histológico. MEDIAS DE LOS GRUPOS.

	CÉLULAS INFLAMATORIAS	TEJIDO GRANULACIÓN	COCIENTE TG/CI	NEOVASCULARIZACIÓN	RE-EPITELIZACIÓN	PUNTUACIÓN GREENHALGH
GRUPO 1	1,25±0,46	2,50±1,19	2	0,50±0,75	3,75±0,46	12,37±1,41[†]
GRUPO 2	1,71±1,11	1,86±0,69	1,09	1,00±0,58	3,28±1,50	10,86±2,79
GRUPO 3	2,14±0,90	2,14±0,90	1	1,57±0,79	2,71±1,70	9,57±3,50
GRUPO 4	1,75±0,71	1,62±0,91	0,92	1,12±0,99	3,00±1,31	9,50±3,25
GRUPO 5	2,12±0,99	1,25±0,89	0,58	1,37±1,19	2,62±1,92	9,75±5,17

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales 15 y 18:

[†] Diferencias significativas con respecto a los grupos.

En conclusión, los grupos en los que aparecen más muestras con un grado V de recuperación son el 1 y el 2 mientras que 3, 4 y 5 presentan grados similares.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, tanto de la evolución de la herida por medición de su área como del estado histológico de la piel el último día del estudio, muestran que la reducción de las heridas es significativo ($p < 0,05$) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera en todos los grupos 1-5.

Se observa que los grupos 1, 2, 4, y 5 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 60% a partir del día 8 mientras que esta reducción no se observa a este tiempo en el grupo 3.

El grupo 3 (Producto de ensayo 3: RG-003) muestra significativamente ($p < 0,05$) valores menores de reducción de úlcera a los días 8 y 10 del estudio. Los animales de este grupo mostraron sangre abundante durante los primeros 10 días tras la creación de la úlcera.

El estudio histológico revela que la recuperación se encuentra en un estadio más avanzado en los grupos 1 y 2, ya que el infiltrado inflamatorio está siendo sustituido por fibroblastos cada vez más maduros y matriz extracelular elaborada por estos.

Por tanto el grupo 1: tratamiento tópico con producto de ensayo RG-001, es el que muestra mejores resultados de reducción de la herida y de recuperación histológica del epitelio, con la mayor puntuación de Greenhalgh.

Referencias bibliográficas

Ver capítulo 7.- de bibliografía [48,49,50,51,52]

5.3.4. Estudio código SIF 210-1, Grupos de estudio I, II y III

Estudios in vivo de evaluación de la actividad de principios activos desarrollados por laboratorios Rovi para el tratamiento de úlceras tópicas en modelo experimental porcino: úlceras diabéticas

Animales de estudio:

La investigación se realizó con 20 cerdos enanos (“minipigs”) de la raza Göttingen.

Tras su recepción e inspección inicial, fueron estabulados en el animalario del centro. Los 20 animales fueron alojados en salas exhaustivamente desinfectadas y habilitadas para acoger exclusivamente a los animales de este estudio.

Los animales se identificaron mediante crotales con el código de identificación del animalario del centro, y una vez identificados se dividieron en los grupos de estudio.

Tabla 24. Grupos de estudio y número de animales y úlceras programadas

	Número de úlceras	Número de animales	Producto de ensayo	Modelo
Grupo I	6	3	ROV1105	Úlceras diabéticas
	6	3	Control no tratado	
Grupo II	12	6	ROV1106	
Grupo III	12	6	ROV1107	

Los animales se alimentaron con dieta de mantenimiento estándar peletizada. Los animales de estos grupos I, II y III, una vez establecido el estatus diabético, fueron alimentados con la misma dieta pero suplementada con grasas saturadas hasta conseguir un 15% en la ración. El agua de bebida fue administrada mediante sistema de bebida automática en los cubículos de alojamiento.

Productos de ensayo:

Se evalúan 3 nuevos productos de ensayo con la caracterización que se resume en la siguiente tabla

Tabla 25. Productos de ensayo

GRUPOS	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
Nombre del producto de ensayo	ROV1105	ROV1106	ROV1107
Lote	ROV1105	ROV1106	ROV1107
Composición	ROV1105 1%, colágeno e hialuronato sódico	ROV1106 1%, colágeno e hialuronato sódico	ROV1107 1%, colágeno e hialuronato sódico
Estabilidad	Estable 3 meses a 4 °C	Estable 3 meses a 4 °C	Estable 3 meses a 4 °C

Los productos de ensayo se presentan en jeringas pre cargadas con 1 ml de producto y el tratamiento diario consistió en la aplicación de 0,5 ml por cada úlcera y día. El tratamiento se aplicó uniformemente con la ayuda de un depresor lingual de plástico estéril para cada úlcera.

Creación del modelo de diabetes en el Cerdo

Se comenzó el estudio tomando los valores de glucemia de referencia para cada animal, mediante dos medidas, una tras 12h de ayuno y otra postprandial. Una vez obtenidos estos valores, se comenzó la inducción de un estado diabético mediante la administración intravenosa de Streptozotocina (STZ) siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

Administración IV de STZ a una dosis de 150mg/kg, diluida en buffer citrato 0.9 NaCl con pH entre 4,5-5. Tras dicha administración se administró 2 mg/kg de Flunixin meglumine y 10 mg de metoclopramida vía IV.

Se realizaron durante los tres primeros días un control de glucemia para estimar el nivel de daño pancreático provocado, y a la vez poder controlar una eventual hipoglucemia provocada por la liberación masiva de insulina a consecuencia de la muerte de las células β . Los controles posteriores de glucemia se realizaron semanalmente.

ESTUDIOS IN VIVO

Durante los tres días siguientes a la administración de la STZ, se administró a los animales una dosis analgésica de Buprenorfina en parche de liberación controlada (35µg/hora) cada 72h y Flunixin meglumine (2 mg/kg) cada 12 horas durante 3 días. Tras observar signos clínicos de hipoglucemia severa 24 horas tras la administración de la Streptozotocina en los animales 3, 8 y 16, se les administró de urgencia suero salino glucosado al 5% vía iv para conseguir su estabilización y recuperación clínica.

En los animales 1,2,3,4,7,8,10,11,12,13,14,17y18, debido a síntomas clínicos de anorexia y falta de apetito a los 7 días tras la inducción del estado diabético, se retomó el tratamiento analgésico con parche de buprenorfina y flunixin meglumine cada 12 horas a las mismas dosis descritas previamente.

Una vez inducido el estado diabético, se llevaron a cabo controles semanales en los que se registró el peso y se realizaron determinaciones de glucemia, para asegurar que se mantenían los niveles diabéticos pero compatibles con la vida, es decir, valores entre 200-400mg/dl. Cinco días tras la inducción del estado diabético se comenzó a administrar un suplemento dietético de grasas saturadas, que pasaron a ser un 15% de la ración diaria, con el objetivo de establecer una hiperlipidemia que acelere la instauración de los cambios vasculares que provocan la aterosclerosis. Este contenido calórico de la dieta se mantuvo durante todo el estudio. Se realizaron semanalmente determinaciones bioquímicas complementarias de colesterol total, triglicéridos, HDL colesterol y LDL colesterol.

Creación de las úlceras tópicas diabéticas

Transcurridas quince semanas tras la inducción del estado diabético se procedió, a la creación de dos úlceras cutáneas de grado II de la escala de Wagner (una en cada pata del animal) siguiendo los pasos que se detallan a continuación. Una de las úlceras realizadas en uno de los grupos servirá como control al tratamiento y al resto de los productos de ensayo a testar:

Tras 12h de ayuno sólido y 6h de líquido, se anestesiaron los animales mediante anestesia general inhalatoria mantenida con sevoflurano al 3% en oxígeno y analgesia mediante infusión continua de remifentanilo. En condiciones de rigurosa esterilidad se procedió al marcado con un molde de un área circular de 16 cm², para igualar el posicionamiento y tamaño en todos los individuos de la zona de la úlcera. Las úlceras se crearon en la cara medial de la tibia en ambas extremidades posteriores del animal. Se extirpó quirúrgicamente todo el espesor de la dermis, eliminación piel, tejido subcutáneo y pared muscular hasta acceder a hueso dejando este visible eliminando el periostio.

Tras la cirugía, se procedió a cubrir ambas úlceras con gasas parafinadas y compresas estériles, fijadas a la piel con esparadrapo, para evitar que se contaminaran. Se instauró un tratamiento antibiótico con amoxicilina clavulánico (20 mg/kg) durante 7 días tras la creación de la úlcera, y un tratamiento analgésico con buprenorfina en parches cada 72h durante la primera semana tras la creación de las úlceras. El tratamiento se complementó con meloxicam (0,4 mg/kg IM), ceftiofur (3 mg/kg IM) y fentanilo (parche de liberación sostenida 25 µg/kg).

Se administraron diariamente los tratamientos asignados a cada grupo objeto de estudio hasta el cierre total de las úlceras o hasta 70 días de tratamiento como tiempo máximo estipulado por el promotor del estudio. Previo a la administración de los tratamientos se realizó una limpieza exhaustiva de las úlceras con betadine diluido con suero salino fisiológico y cambio del vendaje.

Estudio de absorción sistémica de los productos de ensayo mediante las medidas de la actividad antifactor Xa y antifactor IIa en plasma.

En dos animales de cada grupo con tratamiento, se realizó una extracción de sangre para la valoración de la actividad antifactor Xa y antifactor IIa en plasma.

Las muestras de sangre se obtuvieron antes de la administración del producto de ensayo y a las 1, 2, 4, 8, 12, 24, 26, 28, 32 y 48 horas, día 3 y día 7 después de la administración del primer día de tratamiento.

Las tomas de muestra correspondientes a las 24h, 48h día 3 y día 7 se realizaron antes de la administración correspondiente a ese día.

Se extrajo, aproximadamente, 1 mL de sangre (con citrato sódico al 3.8%, en proporción 1:9 como anticoagulante). La sangre se centrifugó a 3000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Se obtuvieron dos alícuotas de plasma que se congelaron a -20 ± 5 °C hasta su envío al laboratorio externo Harlan para la determinación en dicho laboratorio de la actividad antifactor Xa y antifactor IIa. Se enviaron una de las alícuotas de las muestras obtenidas correspondientes a los tratamientos ROV1105 y ROV1106, conservándose en el CCMIJU bajo condiciones BPL el resto de muestras obtenidas de dichos tratamientos y del tratamiento ROV1107.

Recogida y registro de datos.

La recogida de datos se llevó a cabo dos veces por semana. Se descubrieron las úlceras, para limpiar la zona y cambiar el vendaje, en este momento se realizaron fotografías digitales, de forma protocolizada, de la zona ulcerada para seguir la evolución e ir midiendo la reducción del área de las úlceras. De esta forma se determinó la velocidad de epitelización de cada animal.

Una vez concluida la fase de seguimiento, según la cinética de cicatrización, se procedió a coger muestras de biopsia para análisis histológico, y evaluar mediante estas técnicas la calidad de la cicatrización de cada animal.

Valoración histológica de las heridas

Las muestras de biopsia obtenidas una vez finalizado el seguimiento, se fijaron en formol para su envío al laboratorio anatomopatológico donde se evaluaron la calidad de la cicatrización utilizando la tinción de hematoxilina-eosina.

Los resultados se basan en la puntuación dada por el método de Greenhalgh et al. (1990).

En el tejido subcutáneo se analizaron la existencia de hemorragias, infiltrado de células inflamatorias, tejido de granulación o grado de fibrosis y neovascularización. El valor asignado aparece recogido en las tablas 26 y 27.

Tabla 26. Valores asignados para cada parámetro analizado en la epidermis

PUNTUACIÓN				
Parámetros de la epidermis	0	1 (leve)	2 (moderado)	3 (severo)
Ulceración epidermis	Ausencia	<30%	30-60%	>60%
Presencia pústulas/inflamación	Ausencia	1-2 pústulas x40 Ligero infiltrado de células inflamatorias* a nivel focal.	2-3 pústulas x40 Moderado infiltrado de células inflamatorias* extendido.	<3 pústulas x40 Severo infiltrado de células inflamatorias* a lo largo de toda la muestra.
Hiperplasia	Ausencia	Ligero aumento en el número de capas del epitelio.	Aumento moderado en el número de capas con pequeñas papilas.	Epidermis muy engrosada con numerosas capas y grandes papilas en el t. subcutáneo.
Hiperqueratosis	Ausencia	Pequeño aumento de la queratina sobre la epidermis.	Numerosas capas de queratina sobre la epidermis.	Gruesa capa de queratina sobre la epidermis.

*Infiltrado mixto de polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.

Tabla 27. Valores asignados para cada parámetro analizado en el tejido subcutáneo

PUNTUACIÓN				
Parámetros de tejido Subcutáneo	0	1	2	3
Hemorragia	Ausencia	Pequeños focos de hemorragia.	Áreas de hemorragia más o menos extensas	Grandes áreas de hemorragia ente las células del t. subcutáneo.
Inflamación	Ausencia	Poca cantidad de células inflamatorias* localizadas alrededor de los vasos.	Moderada cantidad de células inflamatorias* que infiltran el t. conjuntivo	Gran cantidad de células inflamatorias* que ocupan toda la muestra.
Tejido de granulación/fibrosis	Ausencia	Pequeña banda de tejido conjuntivo fibroso bajo la epidermis con pocos fibroblastos.	Banda más ancha de tejido conjuntivo fibroso con bajo la epidermis con mayor cantidad de fibroblastos	Banda ancha de tejido conjuntivo fibroso con una elevada densidad celular que profundiza en la dermis.
Congestión/neovascularización	Ausencia	Proliferación mínima y focal de vasos.	Proliferación moderada y extendida en la muestra. Algunos vasos congestivos.	Gran cantidad de neovasos en la muestra mayoritariamente congestivos.

*Infiltrado mixto de polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos.

Envío de muestras/ análisis histopatológico

Una vez concluida la fase de seguimiento, se tomaron muestras de biopsia de 6mm de diámetro de cada una de las úlceras, incluyendo el espesor total de la piel de la zona tratada. Dichas muestras fueron depositadas de forma individual en tubos de ensayo con formaldehído al 3.7-4% y remitidas al laboratorio para su análisis histopatológico.

Resultados relativos a la creación del modelo diabético en el modelo experimental cerdo diabético

Tras la administración de la estreptozotocina (150 mg/kg) todos los animales presentaron vómitos a pesar de la administración preventiva de metoclopramida. Se observó una hipoglucemia severa en los animales 3, 8 y 16 que fue tratada con la administración IV de suero glucosado hasta retornar a valores fisiológicos normales.

Tras la inducción de la diabetes con estreptozotocina (150 mg/kg) en los cerdos y tras el seguimiento de los niveles de glucemia durante la primera semana se observó que todos los animales tuvieron valores de glucosa superiores a 200 mg/ml. En función de estos resultados se consideró que todos tenían inducido el estado diabético

Para ampliar el número de animales que formaban parte del estudio se incorporaron al estudio, para la creación de las úlceras 2 hembras diabetizadas con la misma dosis de estreptozotocina y con el mismo tratamiento y seguimientos que el resto de los animales del estudio. De este modo el número final de animales que integraron la segunda fase del proyecto fue de 17 animales.

En la tabla 28 se muestra la distribución final de animales a los grupos de estudio:

Tabla 28. Distribución final de animales a los grupos de estudio

ANIMAL	IDENTIFICACIÓN	GRUPO	TRATAMIENTO
1	P11-025	I	ROV1105
2	P11-044	I	ROV1105
3	P10-1007	I	ROV1105
4	P11-043	I	CONTROL
5	P11-026	I	CONTROL
6	P11-046	I	CONTROL
7	P11-015	II	ROV1106
8	P11-029	II	ROV1106
9	P10-1008	II	ROV1106
10	P11-023	II	ROV1106
11	P11-041	II	ROV1106
12	P11-048	III	ROV1007
13	P11-039	III	ROV1107
14	P11-033	III	ROV1107
15	P11-014	III	ROV1107
16	P11-012	III	ROV1107
17	P11-042	III	ROV1107

En la tabla 29 y Figura 43 se muestran los valores medios de glucosa mantenidos durante el desarrollo del estudio, excluyendo los datos de los animales fallecidos (animales P11-0037, P11-0024 y P11-0032), e incluyendo los valores de glucosa de los dos cerdos incorporados en el estudio (P10-1007 y P10-1008). Los valores de glucemia se mantuvieron por encima de 250 mg/dl en todos los animales durante el desarrollo del ensayo.

La inducción del estado diabético produjo una disminución significativa del peso corporal de los animales (tabla 29) que se recuperó a partir de la semana 14 postinducción.

Tabla 29. Valores medios de peso y glucosa mantenidos en los cerdos incluidos en el estudio experimental

TIEMPOS	GLUCOSA (mg/ml)	PESO (g)
Basal ayunas	86,12±14,62	17,82±1,90
Basal postpandrial	112,33±19,65	-----
24 horas post inducción estreptozotina	83,23±64,12	-----
48 horas post inducción estreptozotina	384,29±69,45*	-----
72 horas post inducción estreptozotina	411,29±82,63*	-----
Semana 1 post inducción estreptozotina	365,70±30,30*	-----
Semana 2 post inducción estreptozotina	379,76±91,29*	15,89±2,64*
Semana 3 post inducción estreptozotina	484,06±116,25*	14,10±2,12*
Semana 4 post inducción estreptozotina	456,44±86,88*	14,56±2,70*
Semana 5 post inducción estreptozotina	513,44±55,70*	14,25±2,74*
Semana 6 post inducción estreptozotina	423,18±45,57*	13,71±2,37*
Semana 7 post inducción estreptozotina	495,29±63,44*	14,27±2,79*
Semana 8 post inducción estreptozotina	521,18±48,32*	14,45±2,62*
Semana 9 post inducción estreptozotina	464,18±75,10*	14,27±2,79*
Semana 10 post inducción estreptozotina	377,71±58,51*	15,21±3,30*
Semana 11 post inducción estreptozotina	387,23±42,24*	15,81±3,14*
Semana 12 post inducción estreptozotina	369,53±28,29*	15,17±3,30*
Semana 13 post inducción estreptozotina	368,47±25,00*	15,78±3,31*

ESTUDIOS IN VIVO

Semana 14 post inducción estreptozotina	368,12±23,98*	16,52±3,65
Semana 15 post inducción estreptozotina	366,76±23,55*	17,20±3,33
Semana 16 post inducción estreptozotina	366,59±62,01*	17,90±4,18
Semana 17 post inducción estreptozotina	358,00±20,69*	17,77±3,20
Semana 18 post inducción estreptozotina	375,18±55,61*	18,31±3,42
Semana 19 post inducción estreptozotina	350,06±25,28*	18,02±3,42
Semana 20 post inducción estreptozotina	359,82±47,95*	19,07±3,70
Semana 21 post inducción estreptozotina	349,29±27,14*	19,46±3,80
Semana 22 post inducción estreptozotina	357,23±19,52*	19,42±4,16
Semana 23 post inducción estreptozotina	362,00±36,81*	20,29±4,02
Semana 24 post inducción estreptozotina	344,41±28,61*	20,53±4,30
Semana 25 post inducción estreptozotina	343,29±40,88*	20,74±4,45
Semana 26 post inducción estreptozotina (sólo datos de los animales incluidos P10-1007; P10-1008)	303,00±0,00*	16,00±0,00
Semana 27 post inducción estreptozotina (sólo datos de los animales incluidos P10-1007; P10-1008)	360,00±4,24*	17,50±1,56
Semana 28 post inducción estreptozotina (sólo datos de los animales incluidos P10-1007; P10-1008)	354,00±38,18*	18,00±1,13

* Diferencias estadísticamente significativas respecto al valor basal. $p < 0,05$.

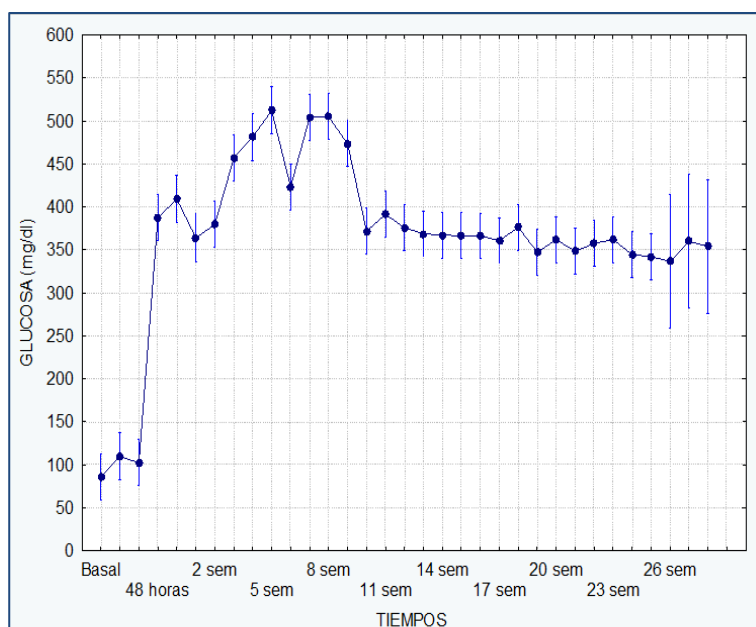


Figura 39. Valores medios de glucosa mantenidos en los cerdos incluidos en el estudio experimental

Resultados relativos a la creación de hiperlipidemia con dieta suplementada en el modelo porcino diabetizado.

Con el fin de conseguir un estado hiperlipidémico en los animales de experimentación, cinco días tras la inducción del estado diabético, se comenzó a administrar un suplemento dietético de grasas saturadas (15% de la ración diaria), con el objetivo de establecer una hiperlipidemia que acelerara la instauración de los cambios vasculares que provocan la aterosclerosis. Este contenido calórico de la dieta se mantuvo durante todo el estudio. Se realizaron semanalmente determinaciones bioquímicas complementarias de colesterol total, triglicéridos, HDL colesterol y LDL colesterol.

Los animales toleraron de manera correcta la dieta suplementada con grasa de origen animal. Los resultados analíticos obtenidos con este aporte nutricional se reflejan en la tabla 30, observándose un aumento significativo de los triglicéridos y el colesterol total durante las semanas del estudio.

ESTUDIOS IN VIVO

Tabla 30. Valores medios de triglicéridos y colesterol mantenidos en los cerdos incluidos en el estudio experimental

TIEMPOS	TRIGLICÉRIDOS (mg/ml)	COLESTEROL (mg/ml)
Basal ayunas	21,2±9,5	48,3±21,8
Basal postpandrial	25,3±13,1	51,9±9,2
24 horas post inducción estreptozotocina	23,4±7,5	45,1±16,6
48 horas post inducción estreptozotocina	46,3±19,7	45,4±11,0
72 horas post inducción estreptozotocina	120,6±91,4	53,5±12,3
Semana 1 post inducción estreptozotocina	403,3±385,3*	56,6±13,8
Semana 2 post inducción estreptozotocina	997,2±569,0*	82,1±24,7*
Semana 3 post inducción estreptozotocina	245,7±170,6*	49,7±6,9
Semana 4 post inducción estreptozotocina	427,6±293,6*	51,7±13,1
Semana 5 post inducción estreptozotocina	496,4±356,3*	60,7±15,2*
Semana 6 post inducción estreptozotocina	673,1±446,7*	71,9±15,6*
Semana 7 post inducción estreptozotocina	363,5±381,3*	72,1±21,2*
Semana 8 post inducción estreptozotocina	574,3±374,1*	76,3±18,2*
Semana 9 post inducción estreptozotocina	362,2±383,0*	74,0±20,1*
Semana 10 post inducción estreptozotocina	247,6±208,3*	70,9±19,0*
Semana 11 post inducción estreptozotocina	233,0±195,4*	58,5±8,6
Semana 12 post inducción estreptozotocina	356,5±420,0*	63,4±19,3*

Semana 13 post inducción estreptozotina	118,2±100,6	80,0±17,2*
Semana 14 post inducción estreptozotina	183,3±191,6	76,6±19,3*
Semana 15 post inducción estreptozotina	160,5±138,5	71,5±15,4*
Semana 16 post inducción estreptozotina	160,3±113,5	60,8±26,7*
Semana 17 post inducción estreptozotina	145,4±81,1	59,3±19,7*
Semana 18 post inducción estreptozotina	147,2±154,4	60,6±16,2*
Semana 19 post inducción estreptozotina	111,9±69,1	64,9±18,0*
Semana 20 post inducción estreptozotina	135,4±90,5	69,9±18,8*
Semana 21 post inducción estreptozotina	166,4±124,0	73,1±20,1*
Semana 22 post inducción estreptozotina	163,9±101,6	65,5±20,7*
Semana 23 post inducción estreptozotina	122,7±79,4	67,5±19,5*
Semana 24 post inducción estreptozotina	140,7±116,9	69,2±32,2*
Semana 25 post inducción estreptozotina	156,8±150,3	70,8±27,1*
Semana 26 post inducción estreptozotina (datos de los animales incluidos posteriormente: P10-1007; P10-1008)	197,0±0,0	130,0±0,0*
Semana 27 post inducción estreptozotina (datos de los animales incluidos posteriormente: P10-1007; P10-1008)	74,5±16,1	118,0±77,8*
Semana 28 post inducción estreptozotina (datos de los animales incluidos posteriormente: P10-1007; P10-1008)	42,5±6,4	68,5±0,7*

* Diferencias estadísticamente significativas respecto al valor basal. $p < 0,05$.

Resultados relativos a la creación del modelo de úlcera diabética tipo II de la escala de Wagner en modelo porcino diabetizado.

A las 15 semanas tras la inducción con buenos resultados del estado diabético y a las 18 semanas para el caso de los animales introducidos posteriormente en el estudio (P10-1007; P10-1008), todos ellos fueron intervenidos quirúrgicamente para la creación de la úlcera diabética tipo II de la escala de Wagner en la cara medial de la tibia en ambas extremidades posteriores. Para ello, se extirpó quirúrgicamente todo el espesor de la dermis, eliminación piel, tejido subcutáneo y pared muscular hasta acceder a hueso dejando este visible eliminando el periostio. Tras la cirugía, se procedió a cubrir ambas úlceras con gasas parafinadas y compresas estériles, fijadas a la piel con esparadrapo, para evitar que se contaminaran.

No hubo ningún hallazgo intraoperatorio que impidiera o dificultara la creación de la úlcera. Los resultados de la intervención fueron favorables, no produciéndose ninguna muerte debida a la creación de la úlcera.

Resultados relativos a la absorción de los productos de ensayo.

La absorción sistémica no fue significativa como lo indican los resultados de las determinaciones de la actividad de antifactor Xa y antifactor IIa. Ambos estuvieron por debajo de los límites mínimos de detección.

Resultados relativos a la actividad farmacológica de los productos de ensayo en el tratamiento de las úlceras diabéticas.

En el siguiente apartado se describen todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio de tratamiento de las úlceras. Esto es, la evolución del peso corporal tras la creación de las úlceras, la evolución de la curación/cierre de las úlceras y la evaluación histológica de las mismas realizado tras la toma de muestras mediante punch de biopsia de 6mm.

No se ha producido ninguna muerte ni ningún signo negativo debido a los tratamientos administrados (productos de ensayo) durante el desarrollo del estudio.

Tras la cirugía se observó una elevada formación de fibrina para recubrir el espacio de la úlcera en todos los animales del estudio (figura 43) y posteriormente se formó tejido de granulación (figura 44).



Figura 40. Apariencia de la úlcera del animal tres días tras su creación quirúrgica con formación de fibrina



Figura 41. Apariencia de la úlcera del animal siete días tras su creación quirúrgica con formación de tejido de granulación

Se observaron signos clínicos negativos durante la evolución de las úlceras destacando la aparición de signos locales de infección (pus, inflamación, calor y dolor) que dieron como resultado la aparición de abscesos que contenían líquido seroso blanquecino: pus, tal y como se expone en la tabla 31.

Tabla 31. Signos clínicos negativos observados durante el estudio

TRATAMIENTO	N	Nº ÚLCERAS QUE PRESENTAN ABSCESOS	ANIMALES	Nº ÚLCERAS QUE PRESENTAN FRAG. ÓSEOS	ANIMALES
CONTROL	3	6	4(ambas úlceras) 5(ambas úlceras) 6(ambas úlceras)	2	4 (úlceras izquierda) 5 (úlceras izquierda)
ROV-1105	3	4	2 (ambas úlceras) 3 (ambas úlceras)	3	2 (úlceras derecha) 3 (ambas úlceras)
ROV-1106	5	10	7 (ambas úlceras) 8 (ambas úlceras) 9 (ambas úlceras) 10 (ambas úlceras) 11 (ambas úlceras)	4	8 (ambas úlceras) 9 (ambas úlceras) 10 (úlceras derecha)
ROV-1107	6	9	13 (ambas úlceras) 14 (úlceras derecha) 15 (ambas úlceras) 16 (ambas úlceras) 17 (ambas úlceras)	8	13 (ambas úlceras) 14 (úlceras derecha) 15(ambas úlceras) 16(úlceras derecha) 17 (ambas úlceras)

ESTUDIOS IN VIVO

Los abscesos fueron tratados mediante la limpieza con betadine diluido con solución salina estéril y agua oxigenada diluida con solución salina estéril. Si el absceso estaba cerrado, se abrió para permitir introducir un hisopo profundamente dentro de la lesión y limpiar el interior del absceso. Se instauró tratamiento antibiótico sistémico para el tratamiento de dichos abscesos en todos los animales del estudio tras su aprobación.

La aparición de infecciones en el tejido con la alta recurrencia de infecciones en las úlceras diabéticas (probablemente empeoradas por el hecho de que los animales no ayudan en evitar que ocurra) probablemente esté relacionada con la relativamente gran superficie ulcerada, que busca aumentar los tiempos de curación y acercarlos a la situación clínica real en humanos.

El hecho de disponer de una “n” variable relacionada con la aparición de estos eventos es la que ha motivado que las comparaciones estadísticas cambien sobre lo estudiado en ratones.

Tabla 32. Resultados del diagnóstico infeccioso de los tratamiento administrativos

MUESTRA	PRIMER RESULTADO 10/06/2011	SEGUNDO RESULTADO 15/06/2011
Naranja/ROV1105	Pseudomonas Luteola <i>Sensible a cefepima, ciprofloxacino, levofloxacino, Trimetoprim sulfametoxazol</i>	Burkholderia gladioli <i>Sensible a ciprofloxacino, levofloxacino, Trimetoprim sulfametoxazol</i>
Verde/ROV1106	ESTERIL	ESTERIL
Azul/ROV1107	CDC grupo EF-4a <i>Resistente a todos los antibióticos testados</i>	CDC grupo EF-4a <i>Resistente a todos los antibióticos testados</i>

Por otro lado, se observaron que las siguientes úlceras expulsaron pequeños fragmentos de la capa cortical ósea, posiblemente por fenómenos de osteomielitis (Inflamación ósea) derivados de la prolongada exposición del hueso. Estos fragmentos hacían reacción de cuerpo extraño y generaban un exudado purulento hasta su expulsión o extracción. Tras la expulsión/extracción de dichos fragmentos, y un buen lavado, las heridas han evolucionado sin complicaciones.

Los animales que han expulsado fragmentos son 12 y las úlceras que han expulsado fragmentos son un total de 17, distribuidos del siguiente modo: 3 úlceras perteneciente al grupo control, 3 úlceras al tratamiento ROV1105, 4 úlceras del ROV1106 y 7 úlceras del ROV1107.

Tabla 33. Presentación de fragmentos óseos y fecha de extracción

ANIMAL	TRATAMIENTO	ULCERA	FECHA DE EXTRACCIÓN
4	CONTROL	EXTREMIDAD IZQUIERDA	12/07/2011
5	CONTROL	EXTREMIDAD IZQUIERDA	4/07/2011
		EXTREMIDAD DERECHA	5/07/2011
3	ROV1105	EXTREMIDAD IZQUIERDA	19/07/2011
		EXTREMIDAD DERECHA	6/07/2011
2	ROV1105	EXTREMIDAD DERECHA	14/07/2011 21/07/2011
8	ROV1106	EXTREMIDAD IZQUIERDA	18/07/2011
9	ROV1106	EXTREMIDAD IZQUIERDA	5/07/2011
		EXTREMIDAD DERECHA	27/06/2011
10	ROV1106	EXTREMIDAD DERECHA	10/07/2011
13	ROV1107	EXTREMIDAD IZQUIERDA	18/07/2011
		EXTREMIDAD DERECHA	20/07/2011
14	ROV1107	EXTREMIDAD DERECHA	12/07/2011
15	ROV1107	EXTREMIDAD IZQUIERDA	12/07/2011
		EXTREMIDAD DERECHA	18/07/2011
16	ROV1107	EXTREMIDAD DERECHA	22/06/2011
17	ROV1107	EXTREMIDAD IZQUIERDA	09/07/2011
		EXTREMIDAD DERECHA	04/07/2011

Peso corporal.

En la Tabla 34 y Figura 45 se muestran los valores globales de la evolución del peso corporal a partir de la creación de las úlceras y durante la administración de los tratamientos a lo largo del estudio. No se observaron cambios significativos de peso en ningún grupo durante esta etapa del estudio ni diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 34. Evolución del peso durante el estudio tras la creación de las úlceras

TIEMPO SEGUIMIENTO (Días)	PESO (Kg)			
	CONTROL	ROV1105	ROV 1106	ROV 1107
0	16,90±2,83	18,55±3,41	17,91±4,03	16,87±2,72
3	17,35±2,02	18,17±3,32	18,47±4,72	16,40±2,63
7	17,62±3,34	18,53±3,47	19,12±5,55	16,97±4,14
10	17,13±2,64	18,45±2,69	18,56±5,32	16,52±2,91
14	18,15±2,01	18,93±3,71	17,83±4,48	16,78±2,35
17	19,12±2,53	19,30±3,37	18,50±4,90	17,64±2,51
21	18,43±2,15	19,23±3,66	18,37±4,76	17,87±3,23
24	18,68±2,63	18,97±3,86	18,63±4,75	17,92±2,71
28	18,03±2,82	18,70±3,92	18,43±4,60	17,45±3,11
31	19,23±2,55	19,77±4,07	18,61±4,97	17,82±2,94
35	19,88±3,01	20,02±3,97	19,50±5,19	17,92±3,00
38	20,17±2,70	19,30±3,18	19,30±5,02	17,92±3,32
42	20,35±3,40	20,32±3,97	19,91±4,93	18,47±3,44
45	20,42±2,84	20,05±4,01	19,64±4,88	18,20±3,17
49	21,07±3,07	20,47±4,38	19,86±5,83	17,94±3,08

ESTUDIOS IN VIVO

52	21,07±2,66	21,12±4,37	20,65±5,61	18,55±3,67
56	21,52±2,55	21,05±4,43	20,88±5,58	18,97±3,38
59	21,72±2,92	21,07±4,51	21,01±5,60	19,02±3,40
63	21,92±3,14	21,42±4,79	21,26±6,02	19,19±3,15
66	-----	21,52±4,32	21,14±6,10	19,14±3,32
70	-----	21,87±4,46	21,68±5,93	19,18±3,70

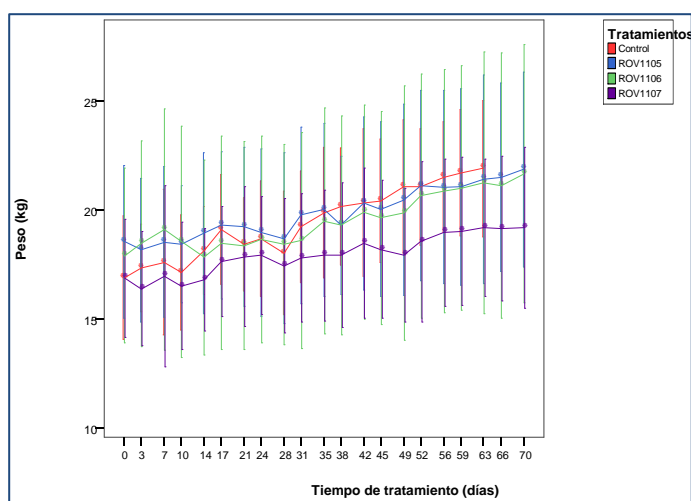


Figura 42. Evolución del peso durante el estudio tras la creación de la úlcera.

La ganancia de peso indica que en todo caso el proceso de ulceración no alteró la pauta alimenticia de los animales

Evolución del área de las úlceras. Estudio de reducción de las úlceras.

En la tabla 35 se muestran los valores globales de la evolución del área de las úlceras a lo largo del estudio, mientras que en la tabla 28 se refleja el porcentaje de reducción o curación de las mismas. En el tiempo 10, a los 10 días de tratamiento, se observaron diferencias significativas del tratamiento ROV1106 frente al resto de los grupos con menor reducción del área de las úlceras.

En los grupos de tratamiento ROV1105 y ROV1107 el área de las úlceras disminuyó significativamente a partir del día 10 mientras que en el grupo control y en el ROV1106 esta disminución fue significativa a partir del día 14.

Tabla 35. Evolución del área de las úlceras durante el estudio

TIEMPO SEGUIMIENTO	ÁREA (cm ²)			
	(Días)	CONTROL	ROV1105	ROV 1106
0	16,49±1,79	16,55±1,97	15,89±2,98	17,21±2,60
3	21,29±3,71*	22,17±1,62*	19,62±2,19*	19,26±1,89*
7	21,42±2,11*	21,70±1,33*	22,60±2,71*	19,76±2,29*
10	15,36±1,39	14,18±0,99*	17,31±2,62†	14,93±2,13*
14	8,21±1,01*	7,41±0,67*	7,98±1,35*	7,69±1,48*
17	4,87±1,06*	4,44±1,06*	4,77±1,09*	5,08±1,60*
21	1,91±0,79*	2,29±0,84*	1,93±0,77*	2,49±1,23*
24	0,93±0,44*	1,26±0,73*	1,25±0,93*	1,36±0,96*
28	0,19±0,11*	0,44±0,32*	0,66±0,57*	0,49±0,43*
31	0,03±0,03*	0,39±0,30*	0,26±0,24*	0,27±0,31*
35	0,07±0,12*	0,22±0,18*	0,11±0,11*	0,16±0,30*
38	0,02±0,04*	0,61±1,14*	0,05±0,12*	0,18±0,37*
42	0,02±0,02*	0,19±0,34*	0,15±0,23*	0,06±0,14*
45	0,00±0,00*	0,08±0,18*	0,05±0,07*	0,02±0,05*
49	0,04±0,06*	0,05±0,07*	0,05±0,12*	0,08±0,16*
52	0,01±0,02*	0,05±0,10*	0,07±0,20*	0,05±0,07*
56	0,01±0,01*	0,04±0,09*	0,03±0,05*	0,04±0,09*
59	0,00±0,00*	0,02±0,05*	0,01±0,01*	0,04±0,07*
63	0,00±0,00*	0,01±0,02*	0,01±0,02*	0,01±0,02*
66	-----	0,02±0,03*	0,00±0,00*	0,03±0,07*
70	-----	0,00±0,00*	0,00±0,01*	0,03±0,05*

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto al resto de los grupos.

Tabla 36. Evolución del porcentaje de reducción de las úlceras

TIEMPO SEGUIMIENTO	PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE LA ÚLCERA (%)				
	(Días)	CONTROL	ROV1105	ROV 1106	ROV 1107
0		0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
3		-30,09±24,64*	-35,23±16,33*	-25,49±14,21*	-14,01±18,56*
7		-31,04±18,24*	-32,15±12,92*	-45,23±24,88*	-17,40±22,36*
10		5,97±12,97	13,22±13,07*	-10,44±16,26†	12,04±14,24*
14		49,70±8,44*	54,61±7,54*	48,72±11,04*	55,30±6,02*
17		70,06±7,78*	72,55±8,78*	69,73±5,68*	70,73±7,73*
21		88,12±5,56*	85,81±6,37*	88,11±3,84*	85,97±6,04*
24		94,21±2,96*	92,06±5,15*	91,99±6,28*	92,43±4,87*
28		98,80±0,75*	97,25±2,27*	96,08±3,19*	97,29±2,27*
31		99,79±0,21*	97,65±1,89*	98,43±1,27*	98,54±1,63*
35		99,51±0,87*	98,67±1,11*	99,37±0,60*	99,17±1,51*
38		99,86±0,27*	96,12±7,39*	99,68±0,81*	98,92±2,28*
42		99,85±0,14*	98,85±2,23*	99,06±1,44*	99,65±0,74*
45		99,99±0,02*	99,43±1,15*	99,69±0,40*	99,90±0,26*
49		99,76±0,36*	99,72±0,42*	99,63±0,82*	99,54±0,95*
52		99,92±0,14*	99,70±0,61*	99,48±1,48*	99,73±0,45*
56		99,95±0,11*	99,70±0,56*	99,79±0,36*	99,73±0,58*
59		99,99±0,03*	99,83±0,33*	99,95±0,09*	99,72±0,50*
63		100,00±0,00*	99,94±0,11*	99,95±0,14*	99,91±0,14*
66		-----	99,89±0,20*	99,99±0,01*	99,81±0,44*
70		-----	100,00±0,00*	99,98±0,07*	99,81±0,32*

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto al resto de los grupos.

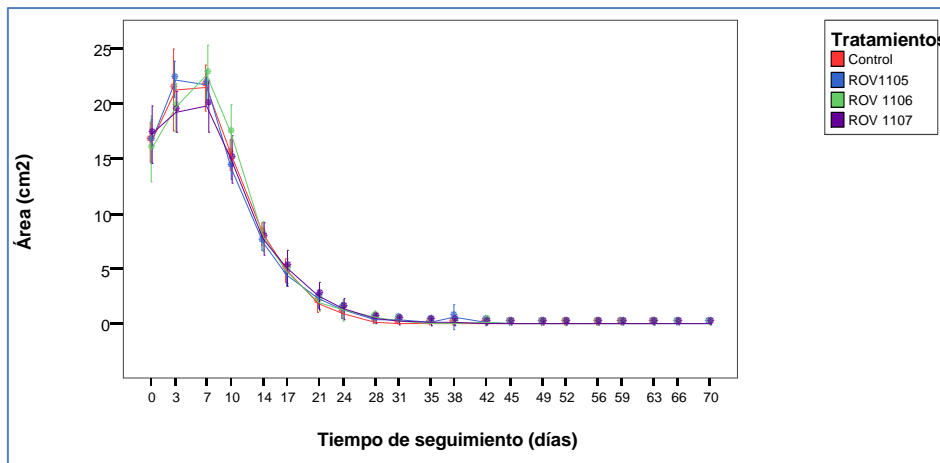


Figura 43. Evolución del área de la úlcera durante el estudio.

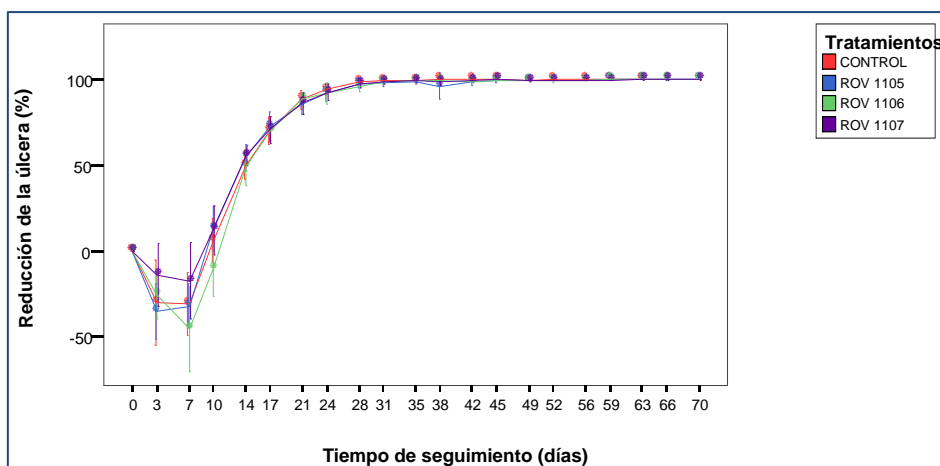


Figura 44. Evolución del porcentaje de reducción de la úlcera durante el estudio.

Evolución del área externa de las úlceras. Estudio de contracción de las úlceras

En la tabla 37 se muestran los valores globales de la evolución del área externa de las úlceras a lo largo del estudio y en la tabla 38 se refleja el porcentaje de contracción de las mismas. El área externa fue significativamente mayor a los 10, 35 y 42 días para el grupo de tratamiento ROV1106 y fue significativamente menor en los tiempos 35, 63, 66 y 70 días para el grupo de tratamiento ROV1107. El porcentaje de contracción de las úlceras fue significativamente mayor en el grupo de tratamiento ROV1107 en los siguientes tiempos: días 35, 63, 66 y 70.

Tabla 37. Evolución del área externa de las úlceras durante el estudio.

TIEMPO SEGUIMIENTO (Días)	ÁREA EXTERNA (cm ²)			
	CONTROL	ROV1105	ROV 1106	ROV 1107
0	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	-----	-----
10	18,95±1,26	18,06±1,84	20,69±2,31†	18,56±2,73
14	12,16±1,90*	11,92±1,66*	13,08±2,08*	12,53±1,57*
17	9,30±1,76*	10,80±2,62*	10,99±1,37*	11,63±1,85*
21	7,10±1,76*	7,84±1,71*	8,32±1,30*	9,07±2,42*
24	6,24±1,36*	7,56±2,23*	7,65±1,59*	7,83±1,97*
28	5,67±0,93*	6,87±0,81*	5,89±0,81*	5,70±1,29*
31	5,08±0,96*	5,42±1,33*	4,92±0,74*	4,69±1,29*
35	5,31±1,29*	5,37±1,27*	6,36±0,95*†	4,85±0,82*†
38	5,80±0,82*	6,29±2,23*	6,58±1,51*	6,02±0,71*
42	6,27±1,20*	6,97±0,75*	7,64±0,90*†	6,72±1,17*
45	7,17±1,40*	7,54±1,03*	7,85±0,88*	7,05±1,24*
49	6,82±0,88*	6,78±0,77*	6,76±1,27*	5,44±1,21*
52	6,47±1,20*	6,51±0,75*	5,65±0,71*	5,27±1,12*
56	6,71±0,90*	6,27±1,04*	6,56±1,27*	5,83±1,02*
59	6,25±0,55*	5,96±0,67*	6,58±1,26*	5,68±0,94*
63	4,93±0,86*	5,15±0,59*	4,80±0,82*	3,73±0,49*†
66	-----	4,27±0,75*	4,65±1,12*	3,14±0,83*†
70	-----	3,46±0,54*	3,58±0,55*	2,61±0,62*†

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto al resto de los grupos.

Tabla 38. Evolución del porcentaje de contracción de las úlceras durante el estudio.

TIEMPO SEGUIMIENTO (Días)	PORCENTAJE DE CONTRACCIÓN (%)			
	CONTROL	ROV1105	ROV 1106	ROV 1107
0	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	-----	-----
10	-15,84±12,66	-10,83±20,24	-33,17±23,28	-9,46±18,62
14	25,51±14,90*	27,17±13,24*	14,98±21,24*	26,23±10,70*
17	42,95±13,23*	33,16±21,51*	29,30±11,93*	31,32±13,23*
21	56,27±13,11*	51,56±14,08*	46,16±12,52	46,83±14,12*
24	61,30±11,49*	53,19±16,88*	50,54±12,53*	53,91±12,10*
28	65,34±6,26*	58,06±6,77*	61,51±10,03*	65,72±10,73*
31	69,22±5,33*	67,08±8,05*	67,89±9,14*	72,40±7,90*
35	67,68±7,85*	67,62±6,56*	58,19±12,81*†	71,07±7,35*†
38	64,78±3,90*	61,13±15,98*	57,37±12,36*	63,88±8,67*
42	62,15±4,64*	57,49±6,18*	50,80±9,01*	60,23±8,37*
45	56,77±5,17*	54,35±8,54*	49,33±8,83*	58,37±8,58*
49	58,23±6,97*	58,79±7,56*	55,67±14,39*	67,60±9,08*
52	60,62±6,63*	60,51±7,53*	63,66±6,33*	68,79±7,86*
56	59,24±3,54*	62,08±7,70*	58,20±7,45*	65,16±8,90*
59	61,76±4,57*	64,12±4,45*	58,16±6,37*	66,02±8,49*
63	70,00±4,89*	68,73±5,92*	69,22±6,26*	77,83±4,57*†
66	-----	74,45±3,46*	69,57±10,14*	80,96±7,04*†
70	-----	79,16±3,60*	76,46±7,29*	84,26±5,19*†

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto al resto de los grupos.

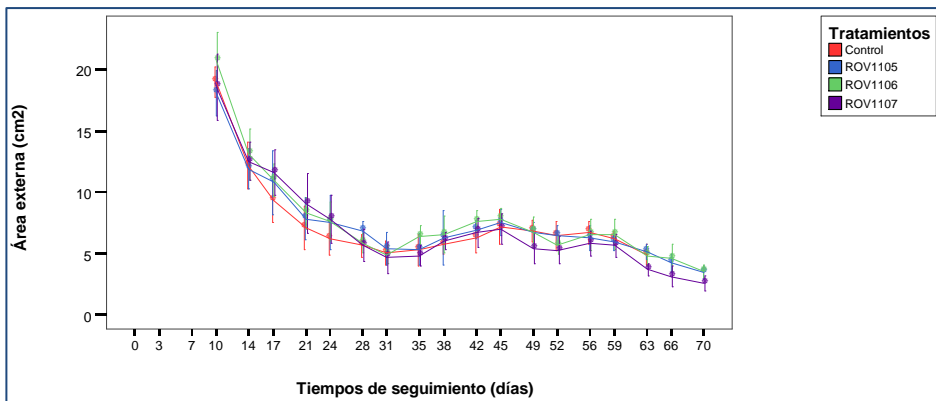


Figura 45. Evolución del área externa de la úlcera durante el estudio.

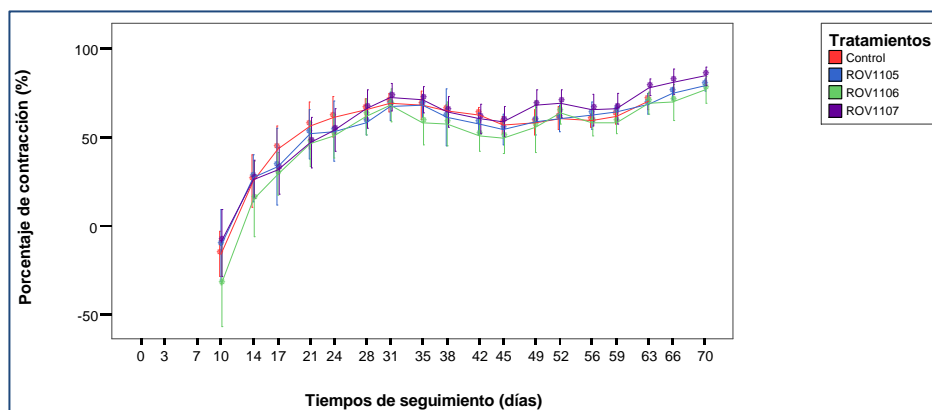


Figura 46. Evolución de la contracción de la úlcera durante el estudio.

Evaluación histopatológica por grupos.

En la mayoría de los casos y en todos los grupos, los procesos de tipo crónico predominan sobre los de tipo agudo y en ningún caso se observa ulceración de la epidermis. La presencia de fibroblastos, matriz extracelular y neovasos es mayor que el infiltrado inflamatorio que se localiza sobre todo alrededor de los vasos. Estas lesiones se encuentran principalmente en el tejido conjuntivo subcutáneo.

Por otro lado y también en todos los grupos, la hiperplasia de la epidermis y la hiperqueratosis son escasas debido igualmente a la evolución de la lesión. No se observa presencia de inflamación en la epidermis en ningún grupo.

Grupo I. Control.

En este grupo, las lesiones más importantes encontradas han sido la inflamación, la fibrosis y la neovascularización que, como ya se ha comentado anteriormente, han aparecido sobre todo en el tejido conjuntivo subcutáneo.

El infiltrado inflamatorio es mayoritariamente leve, ligeramente superior a las células que aparecen en una dermis normal y tan sólo en la extremidad izquierda del animal 6 podría ser considerado moderado (Figura 47: A y B). Las células inflamatorias son principalmente linfocitos y células plasmáticas localizadas alrededor de los vasos, aunque en el animal 5 (Figura 47: C y D) en la extremidad izquierda se han observado también numerosos eosinófilos.

La fibrosis, con aumento en el número de fibroblastos y matriz extracelular es moderada en 3 de las muestras y leve en otras tres (Figura 50: E y F). El aumento en el número de vasos en este caso tanto en la dermis como en el tejido conjuntivo subcutáneo es la lesión más evidente, siendo principalmente moderada.

Con esto, en los animales del grupo control las lesiones son sobre todo de carácter leve observándose un leve-moderado aumento del tejido conjuntivo en el tejido conjuntivo subcutáneo y la presencia de un mayor número de vasos. En todo caso, se trata de procesos de tipo crónico y con recuperación de la epidermis, donde no se observa ulceración.

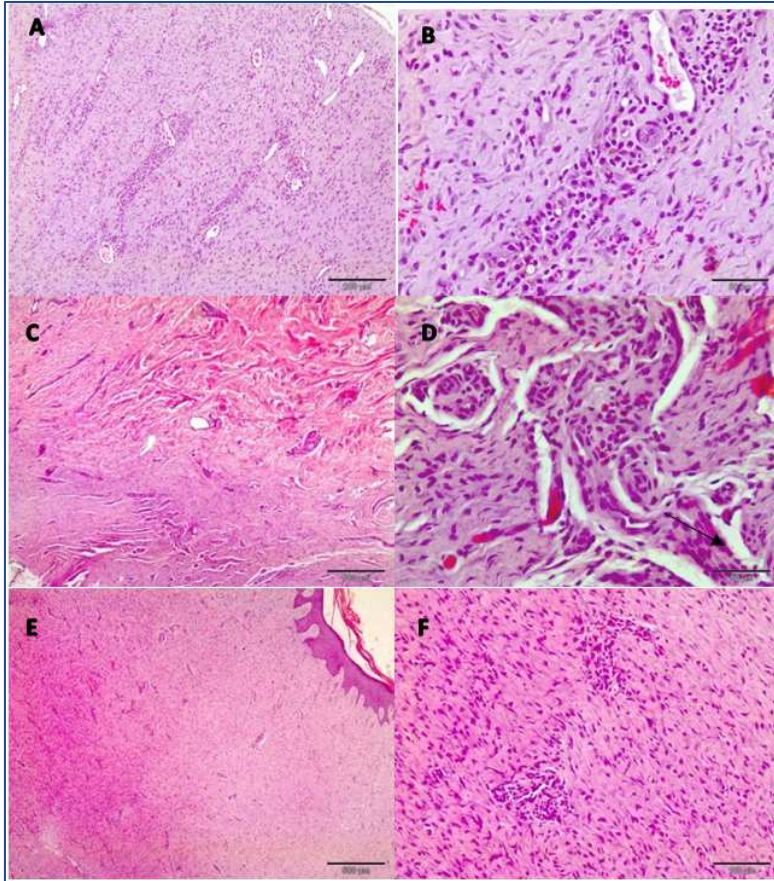


Figura 47. A y B: Animal 6 extremidad izquierda. Infiltrado moderado perivascular con fibrosis leve en tejido conjuntivo subcutáneo.
C y D: animal 5 extremidad izquierda. Inflamación y fibrosis leve aunque compuesta sobre todo por eosinófilos
E y F: animal 4 extremidad derecha. Inflamación leve con aumento de fibroblastos y matriz extracelular moderados.

Grupo I. Tratamiento ROV 1105.

En este grupo, el infiltrado inflamatorio perivascular es escaso en el tejido conjuntivo subcutáneo, con un ligero-moderado aumento en el número de fibroblastos y matriz extracelular (Figura 48: A, B, C, D y E). Sí es más evidente el aumento en el número de vasos aunque este aumento es sobre todo moderado.

Sólo en el animal 1 tanto en la extremidad derecha como en la izquierda, los valores de fibrosis son moderados y en la extremidad izquierda se observa la presencia de pequeños granulomas constituidos por células plasmáticas y macrófagos que han dado lugar a este tipo de células. (Figura 48: F)

Como en el grupo control, en este grupo la lesión observada es de tipo crónico, caracterizado por aumento del tejido conjuntivo fibroso y los neovasos, aunque inferiores al caso del grupo control.

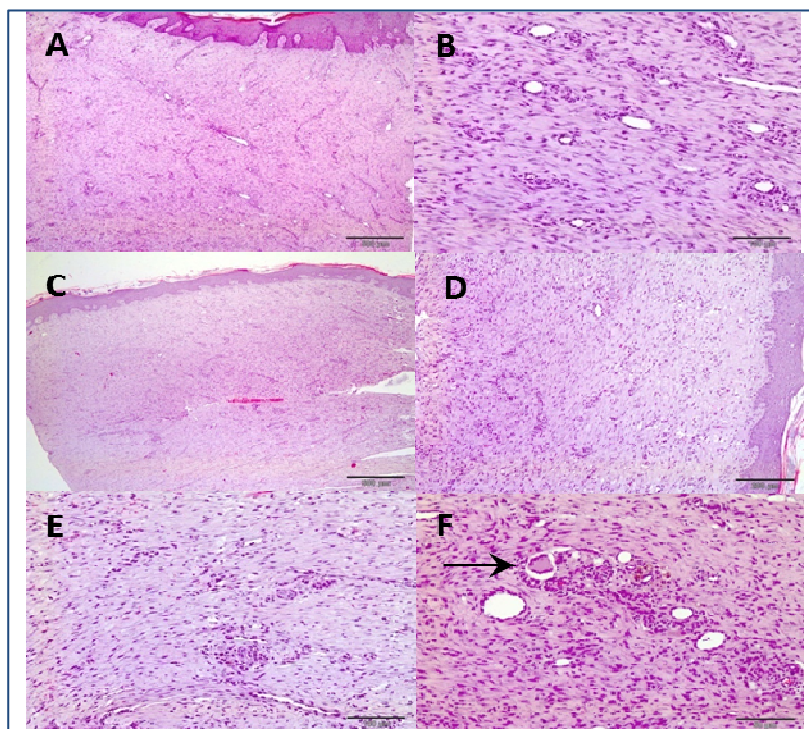


Figura 48. A y B: animal 2 extremidad derecha.
 C, D y E: animal 3 extremidad derecha. En ambos casos se observa un leve infiltrado inflamatorio perivascular y fibrosis con un incremento en el número de neovasos, más marcado en el animal 2
 F: animal 1 extremidad derecha. Pequeño granuloma con presencia de una célula gigante multinucleada (flecha).

Grupo II. Tratamiento ROV 1106.

En este grupo, 4 de las 10 muestras analizadas presentan una inflamación moderada y en tres de ellas aparece una inflamación de tipo granulomatosa (figura 49: A y B). En la extremidad izquierda del animal 10 se observan numerosos macrófagos con hemosiderina citoplásmica lo que puede significar la existencia de hemorragia previa (Figura 49: C, D y E). En el resto, de nuevo predomina una fibrosis moderada en el tejido conjuntivo subcutáneo y en dos casos, tanto inflamación como fibrosis son leves (Figura 49: F). Los valores medios son inferiores a los del grupo control, pero la lesión parece ser ligeramente más aguda. En este caso coincide también con un menor valor medio del grado de neovascularización que se encuentra más presente en los casos crónicos.

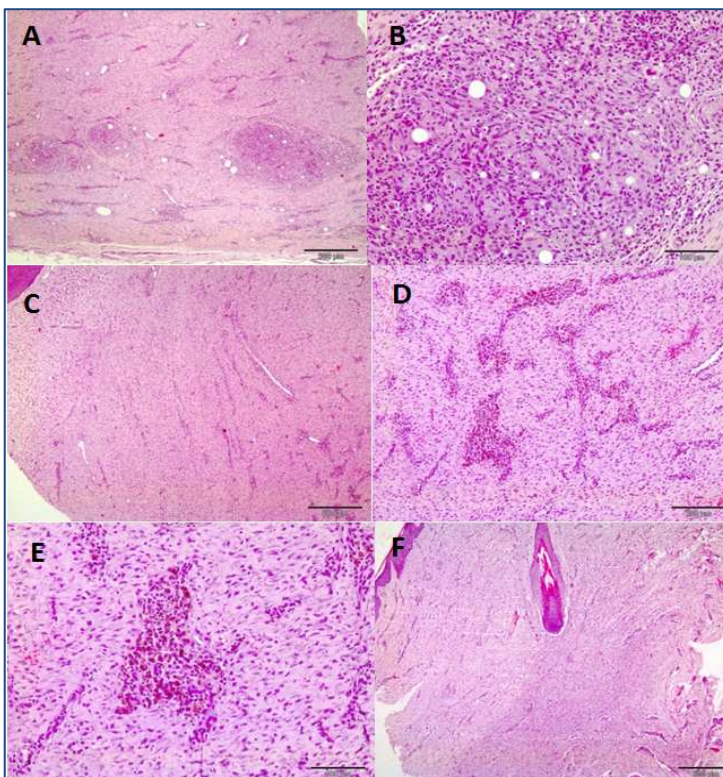


Figura 49. A y B: animal 11 extremidad derecha. Presencia de inflamación granulomatosa en el tejido conjuntivo subcutáneo.
C, D y E: animal 10 extremidad izquierda. Inflamación y fibrosis moderada junto con la presencia de acúmulos de macrófagos cargados de hemosiderina.
F: animal 7 extremidad derecha. Recuperación casi completa de la piel, con escasa fibrosis en el tejido conjuntivo subcutáneo

Grupo III. Tratamiento ROV 1107

En el grupo de animales tratados con ROV1107, en tres de los 12 casos predomina la inflamación sobre la fibrosis (Figura 50: A y C) y en otros 2 es al contrario. En el resto es similar y siempre leve (Figura 50: B). En los casos de predominio de la inflamación ésta es moderada o incluso severa y aguda como en la extremidad izquierda del animal 13, donde las células inflamatorias mayoritarias son neutrófilos (figura 50: D, E y F). También se observan algunas pequeñas áreas de hemorragia en el tejido conjuntivo de 4 de las muestras analizadas, lesión infrecuente en el resto de los grupos. Por otro lado, en este grupo como también en el control y a diferencia de lo que sucede en los grupos tratados con ROV1105 y ROV1106, no existe ninguna muestra en la que no se observe ni inflamación ni fibrosis (una en cada grupo).

Como ya sucedía en el grupo tratado con ROV1106, las lesiones en este caso son más agudas, siendo el valor medio de la inflamación superior al del resto de los grupos y menor el de la fibrosis y la neovascularización, aunque en estos dos últimos casos coinciden con los valores medios de ROV1105 y ROV1106 respectivamente.

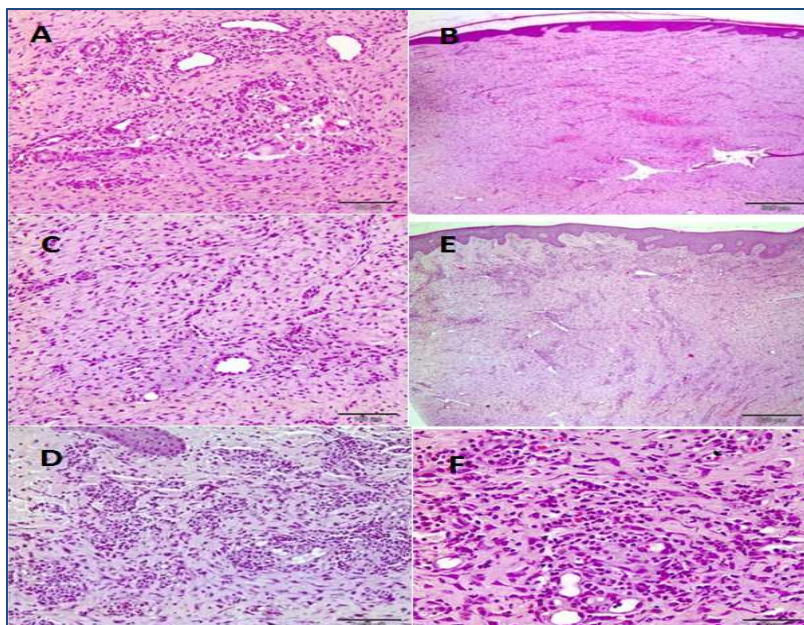


Figura 50. A: animal 12 extremidad izquierda. Predominio de la inflamación sobre la fibrosis, con presencia de un pequeño granuloma.

B y C: animal 14 extremidad derecha. Escasa fibrosis e inflamación perivascular. Áreas de hemorragia en el tejido conjuntivo.

D, E y F: animal 13 extremidad izquierda. Inflamación severa y aguda que se distribuye bajo la epidermis, pero también en el tejido conjuntivo subcutáneo. Las células inflamatorias son sobre todo neutrófilos.

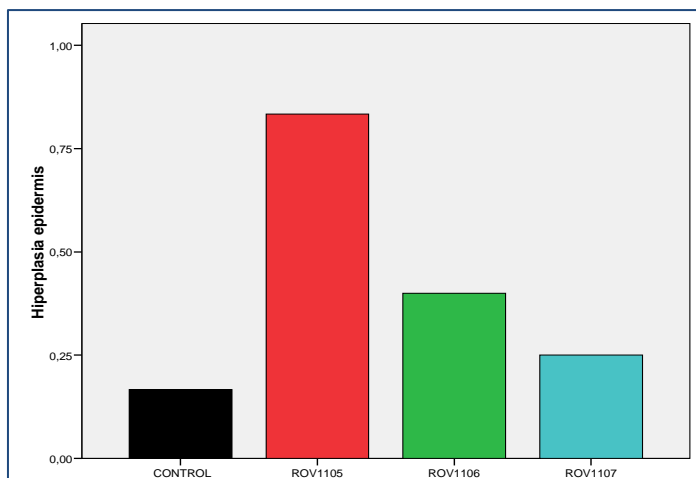


Figura 51. Media del grado de hiperplasia epidérmica en función del grupo.

Resultados comparativos de los grupos.

Tabla 39. Medidas de la puntuación histológica.

TRATAMIENTOS	Nº DE ÚLCERAS	EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA DERMIS			
		ULCERACIÓN	PÚSTULAS/ INFLAMACIÓN	HIPERPLASIA	HIPERQUERATOSIS
CONTROL	6	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,41	0,33±0,82
ROV1105	6	0,00±0,00	0,00±0,00	0,83±0,75	0,67±0,52
ROV1106	10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,40±0,52	0,60±0,52
ROV1107	12	0,00±0,00	0,00±0,00	0,25±0,45	0,08±0,29*

TRATAMIENTOS	Nº DE ÚLCERAS	EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA DERMIS			
		HEMORRAGIA	INFLAMACIÓN	T. GRANULACIÓN/ FIBROSIS	CONGESTIÓN/ NEOVASCULARIZACIÓN
CONTROL	6	0,00±0,00	1,17±0,41	1,50±0,55	2,33±0,52
ROV1105	6	0,17±0,41	1,00±0,63	1,17±0,75	2,17±0,75
ROV1106	10	0,10±0,32	1,10±0,88	1,30±0,67	1,90±0,74
ROV1107	12	0,33±0,49	1,25±0,75	1,17±0,39	1,92±0,67

* Diferencias significativas con respecto al grupo ROV1105 y ROV1106.

TRATAMIENTOS	Nº DE ÚLCERAS	EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EPIDERMIS			
		ULCERACIÓN	PÚSTULAS/ INFLAMACIÓN	HIPERPLASIA	HIPERQUERATOSIS
CONTROL	6	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,41	0,33±0,82
ROV1105	6	0,00±0,00	0,00±0,00	0,83±0,75	0,67±0,52
ROV1106	10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,40±0,52	0,60±0,52
ROV1107	12	0,00±0,00	0,00±0,00	0,25±0,45	0,08±0,29*

TRATAMIENTOS	Nº DE ÚLCERAS	EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EPIDERMIS			
		HEMORRAGIA	INFLAMACIÓN	T. GRANULACIÓN/ FIBROSIS	CONGESTIÓN/ NEOVASCULARIZACIÓN
CONTROL	6	0,00±0,00	1,17±0,41	1,50±0,55	2,33±0,52
ROV1105	6	0,17±0,41	1,00±0,63	1,17±0,75	2,17±0,75
ROV1106	10	0,10±0,32	1,10±0,88	1,30±0,67	1,90±0,74
ROV1107	12	0,33±0,49	1,25±0,75	1,17±0,39	1,92±0,67

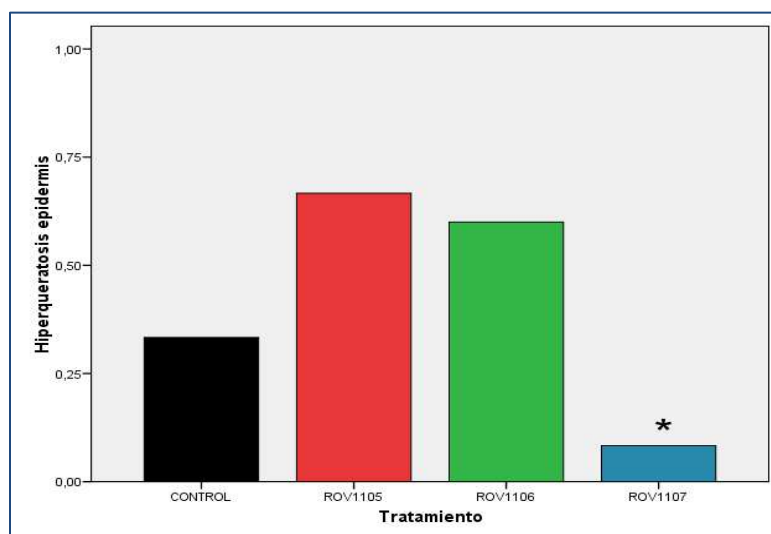


Figura 52. Media del grado de hiperqueratosis epidérmica en función del grupo.

*Diferencias significativas con respecto a los grupos ROV1105 y ROV1106

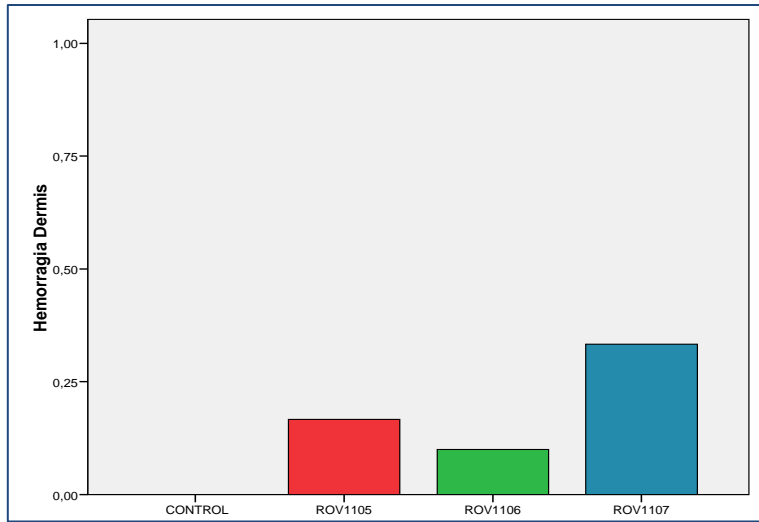


Figura 53. Media del grado de hemorragia en dermis en función del grupo.

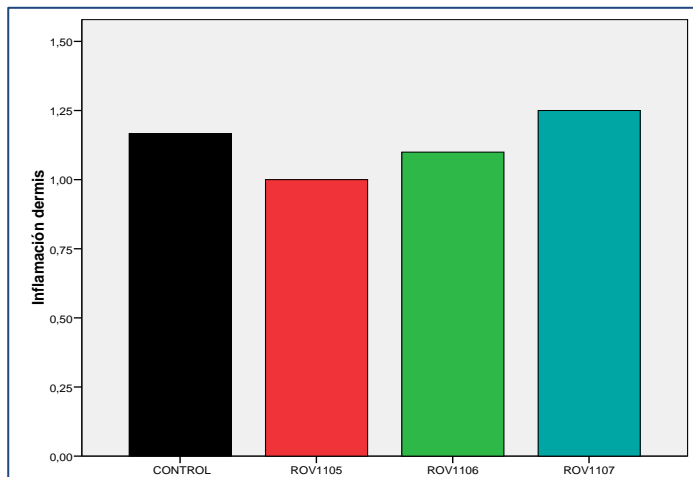


Figura 54. Media del grado de inflamación dérmica en función del grupo.

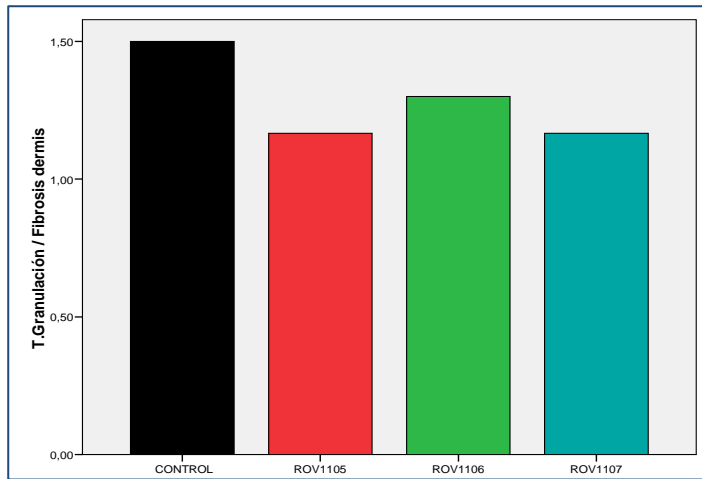


Figura 55. Media del grado de fibrosis dérmica en función del grupo.

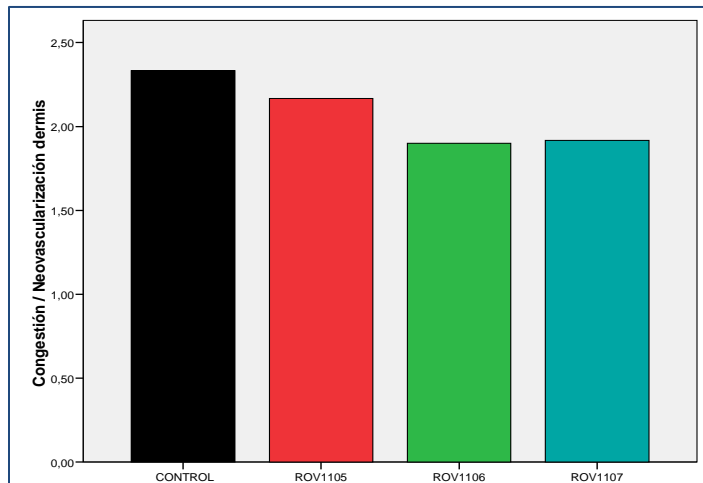


Figura 56. Media del grado de neovascularización dérmica en función del grupo.

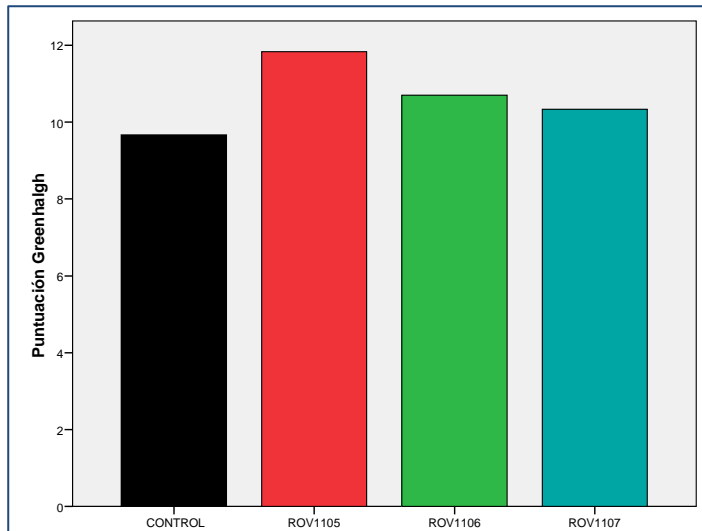


Figura 57. Media de la puntuación según la escala de Greenhalgh en función del grupo.

* Diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

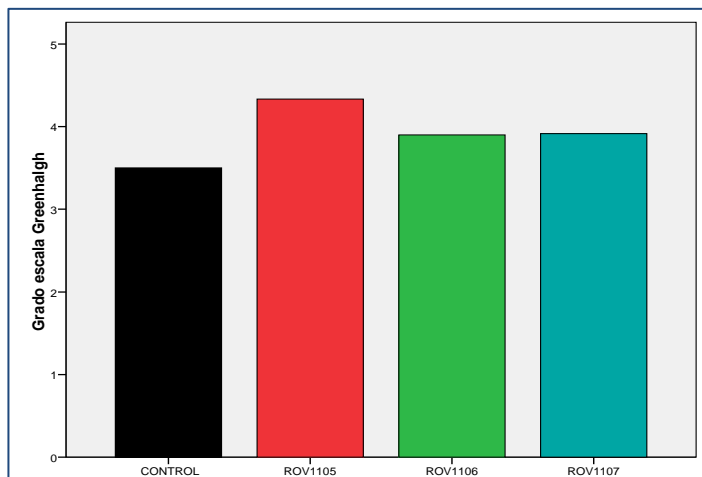


Figura 58. Media del grado de clasificación según la escala de Greenhalgh en función del grupo.

* Diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Tabla 40. Medias de puntuación según escala de Greenhalgh.

TRATAMIENTOS	Nº DE ÚLCERAS	EVALUACIÓN GREENHALGH	
		PUNTUACIÓN MEDIA	GRADO PROMEDIO
CONTROL	6	9,67±3,01	III
ROV1105	6	11,83±2,71	IV
ROV1106	10	10,70±3,47	III
ROV1107	12	10,33±3,77	III

Referencias bibliográficas

Ver capítulo 7.- de bibliografía [47,48,49,50,51]

5.4.- Estudios de úlceras por quemadura

5.4.1. Estudio código SIF 210-1, grupos VI y VII

Título

Estudios in vivo de evaluación de la actividad de principios activos desarrollados por laboratorios Rovi para el tratamiento de úlceras tópicas por quemadura en modelo experimental porcino, grupos VI y VII.

Objetivo

Evaluar la actividad terapéutica del tratamiento con nuevos principios activos sacarídicos desarrollados por los Laboratorios Farmacéuticos Rovi, administrados por vía tópica, mediante la comparación entre sí y con un grupo control no tratado en un modelo de ulcera por quemadura. Se evaluarán 2 nuevos productos de ensayo con la caracterización que se resumen en la siguiente tabla

Tabla 41. Grupos y productos de ensayo.

GRUPOS	GRUPO VI	GRUPO VII
Nombre del producto de ensayo	ROV1105	ROV1106
Pureza	N/A	N/A
Lote	ROV1105	ROV1106
Composición	ROV1105 1%, colágeno e hialuronato sódico	ROV1106 1%, colágeno e hialuronato sódico

Animales de estudio

La investigación se realizó con 12 cerdos enanos (“minipigs”) de la raza Göttingen, cuyas características están descritas en el estudio anterior.

Tras veintiocho días de aclimatación en las instalaciones del centro, se identificaron mediante crotales con el código de identificación del animalario del centro, y una vez identificados se dividieron en los grupos de estudio.

Tabla 42. Grupos de estudio.

	n	Producto de ensayo	Modelo
Grupo VI	6	ROV1105	Úlceras por quemadura
	6	Control no tratado	
Grupo VII	12	ROV1106	

Equipos e Instalaciones

Este estudio se ha realizado en las instalaciones del animalario del centro, para albergar a los animales en cubículos individuales en condiciones ambientales estrictamente controladas durante el transcurso del estudio.

Productos de ensayo

Los productos de ensayo fueron preparados en jeringa precargada. Cada jeringa contenía 1 ml de producto y el tratamiento diario consistía en la aplicación de 0,5 ml por cada úlcera y día. El tratamiento se aplicó uniformemente con la ayuda de un depresor lingual plástico estéril para cada úlcera.

Creación de las úlceras tópicas por quemadura de segundo grado

Siguiendo la metodología expuesta en la bibliografía consultada, con el animal bajo anestesia general inhalatoria y analgesia mediante infusión continua de remifentanilo, se realizaron 2 úlceras por quemadura cada una de ellas en cada una de las extremidades posteriores. Una de las úlceras realizadas a los animales del grupo VI, se empleó como control al tratamiento y al resto de los productos de ensayo a testar. Para la realización de las úlceras, se aplicó sobre un área circular de 16 cm², un disco metálico, de las mismas dimensiones, precalentado a 97 °C durante 20 segundos, originándose en dicha zona una quemadura de segundo grado. Se instauró un tratamiento antibiótico con amoxicilina clavulánico (20 mg/kg), y un tratamiento analgésico con parches de liberación continua de buprenorfina durante 7 días tras la creación de las úlceras.

Recogida y registro de datos.

La recogida de datos se llevó a cabo dos veces por semana, coincidiendo con el control y registro de peso. Se descubrieron las úlceras, para limpiar la zona con suero salino fisiológico y cambiar el vendaje, en este momento se realizaron fotografías digitales, de forma protocolizada, de la zona ulcerada para seguir la evolución e ir midiendo la reducción del área de las úlceras. De esta forma se determinó la velocidad de epitelización de cada animal.

Una vez concluida la fase de seguimiento, se procedió a coger muestras de biopsia para análisis histológico, y evaluar mediante estas técnicas la calidad de la cicatrización de cada animal.

Resultados relativos a la creación del modelo de úlcera tóxica por quemadura en modelo porcino.

Con los animales bajo anestesia general, se marcó con tinta indeleble un área circular de 16 cm² sobre el relieve óseo del trocánter mayor femoral de ambas extremidades posteriores. Una vez marcada el área se aplicó un disco de acero precalentado a 97 °C durante veinte segundos.

La metodología empleada permite recrear las características de una quemadura de grado II, es decir, una lesión cutánea que implica la totalidad de la epidermis y penetra de forma variable en la dermis. Mediante esta técnica se obtiene también una superficie afectada constante de 16 cm². Los resultados de la intervención fueron favorables en todos los casos.

Resultados relativos a la actividad farmacológica de los productos de ensayo en el tratamiento de las úlceras.

En el siguiente apartado se describen todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio. Esto es, la evolución del peso corporal, la evolución de la curación/cierre de las úlceras y la evaluación histológica de las mismas realizado tras la toma de muestras mediante punch de biopsia de 6 mm.

No se ha producido ninguna muerte debida a los tratamientos administrados (productos de ensayo) durante el desarrollo del estudio. Se han observado signos clínicos negativos causados por los productos de ensayo testados en este estudio: aparición de pequeñas ampollas que contenían líquido seroso transparente y estéril, así como hematomas en la zona cicatricial de algunas úlceras, tal y como se expone en las Figuras 63 y 64.

Tabla 43.- Signos clínicos negativos observados durante el estudio

TRATAMIENTO	N	Nº ULCERAS QUE PRESENTAN AMPOLLAS	ANIMALES	Nº ULCERAS QUE PRESENTAN HEMATOMAS	ANIMALES
CONTROL	6	4	19, 21, 22, 23	0	-
ROV-1105	1 2	2	21, 22	0	-
ROV-1106	1 2	7	25, 26, 30, 28 (ambas úlceras), 29(ambas úlceras)	6	25,30, 27(ambas úlceras), 28(Ambas úlceras)



Figura 59. Presencia de ampollas en úlcera no tratada (grupo control)



Figura 60. Presencia de hematomas en animal del tratamiento ROV1106

Peso corporal.

En la siguiente tabla se muestran los valores globales de la evolución del peso corporal a lo largo del estudio.

Se observa un aumento significativo de peso con respecto a su valor basal en el tratamiento ROV1106 a partir del día 17. Sin embargo estos cambios no son relevantes ni negativos para el bienestar de los animales en el animalario.

Tabla 44.- Evolución del peso durante el estudio

TIEMPO SEGUIMIENTO	DÍAS DE ESTUDIO		PESO (Kg)		
	GRUPO VI	GRUPO VII	CONTROL	ROV1105	ROV 1106
1	0	0	17,17 ± 1,09	17,17±1,09	16,83 ± 0,73
2	3	2	16,65 ± 1,27	16,65±1,27	17,39 ± 0,58
3	7	6	17,27 ± 1,57	17,27±1,57	17,62 ± 0,72
4	10	9	17,95 ± 2,04	17,95±2,04	18,83 ± 1,06*
5	14	14	17,20 ± 0,95	17,2 ± 0,95	18,32 ± 0,72
6	17	17	18,17 ± 1,01	18,16±1,02	19,67 ± 0,73*
7	20	20	18,07 ± 0,82	18,07±0,82	19,08 ± 0,69*
8	23	23	18,27 ± 1,02	18,27±1,02	18,99 ± 0,66*
9	27	27	17,84 ± 0,78	17,84±0,78	18,76 ± 0,87*
10	30	30	18,49 ± 1,16	18,49±1,16	19,18 ± 1,08*

*Diferencias significativas con respecto al valor basal.

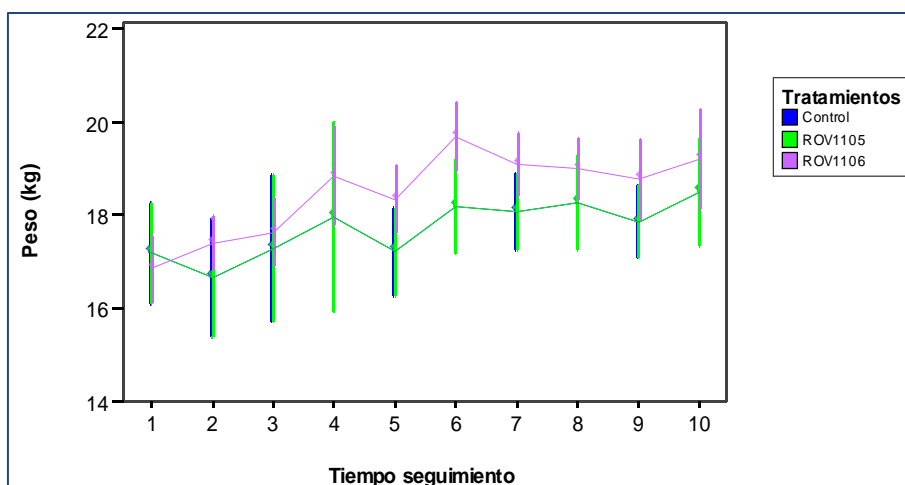


Figura 61. Evolución del peso durante el estudio.

Evolución del área de las úlceras.

En la tabla 45 se muestran los valores globales de la evolución del área de las úlceras a lo largo del estudio. Mientras que en la tabla 46 se refleja el porcentaje de reducción o curación de las mismas. En el tiempo 6, a los 17 días de tratamiento se observaron diferencias significativas del tratamiento ROV1105 frente al grupo control no tratado con menor reducción del área de las úlceras. En todos los grupos el área de las úlceras disminuyó significativamente a partir del día 14.

Tabla 45. Evolución del área de las úlceras durante el estudio.

TIEMPO SEGUIMIENTO	DÍAS DE ESTUDIO		ÁREA (cm ²)		
	GRUPO VI	GRUPO VII	CONTROL	ROV1105	ROV 1106
1	0	0	17,24 ± 1,18	16,53±0,87	17,05 ± 0,65
2	3	2	16,50 ± 1,29	15,71±0,67	17,06 ± 1,02
3	7	6	16,69 ± 1,02	15,90±0,83	16,79 ± 0,97
4	10	9	16,32 ± 0,94	16,08±1,10	17,17 ± 1,82
5	14	14	8,61 ± 2,87*	10,70±4,14*	10,36 ± 1,53*

ESTUDIOS IN VIVO

6	17	17	3,91 ± 1,85*	7,61±4,33*†	5,34 ± 1,55*
7	20	20	0,74 ± 0,74*	3,41±4,20*	1,80± 1,24*
8	23	23	0,18 ± 0,33*	0,40±0,66*	0,45 ± 0,61*
9	27	27	0,81 ± 1,32*	0,02±0,05*	0,04 ± 0,09*
10	30	30	0,89 ± 1,57*	0,00±0,02*	0,10 ± 0,16*

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto al grupo control

Tabla 46. Evolución del porcentaje de reducción de las úlceras.

TIEMPO SEGUIMIENTO	DÍAS ESTUDIO	% DE REDUCCIÓN DE LA ÚLCERA			
		GRUPO VI	GRUPO VII	CONTROL	ROV1105
0	0	0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
3	3	2	4,14 ± 7,79	4,64 ± 7,80	- 0,17 ± 7,01
7	7	6	2,89 ± 8,65	3,46 ± 8,85	1,41 ± 6,90
10	10	9	4,87 ± 9,96	2,32 ± 9,92	-0,82 ± 11,35
14	14	14	49,47 ± 17,83*	35,78±23,29*	39,27 ± 8,80*
17	17	17	77,42 ± 10,58*	54,79±23,71*†	68,67 ± 8,96*
20	20	20	95,75 ± 4,38*	80,20±23,18*	89,48 ± 7,20*
23	23	23	98,94 ± 1,92*	97,55±4,13*	97,39 ± 3,56*
27	27	27	95,20 ± 8,09*	99,88±0,29*	99,78 ± 0,53*
30	30	30	94,58 ± 9,63*	99,95±0,12*	99,40 ± 0,95*

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto al grupo control

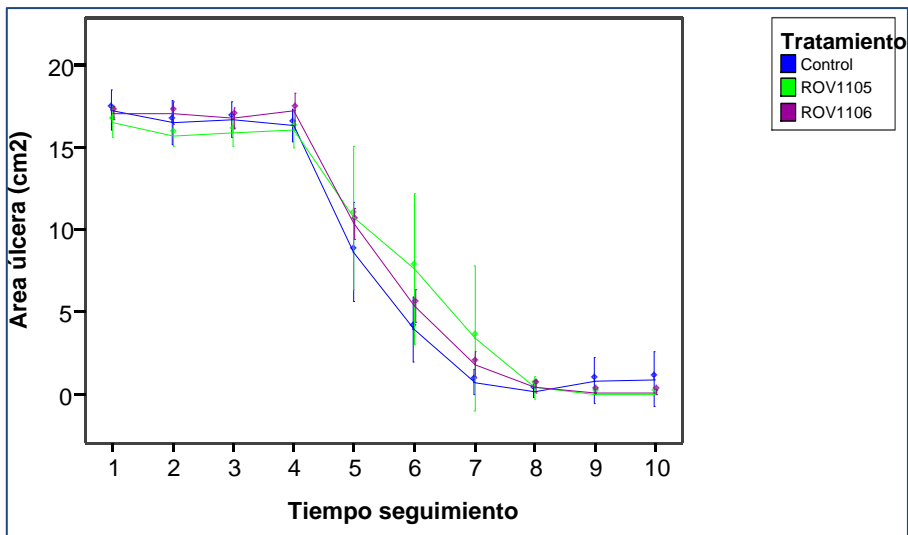


Figura 62. Evolución del área de la úlcera durante el estudio.

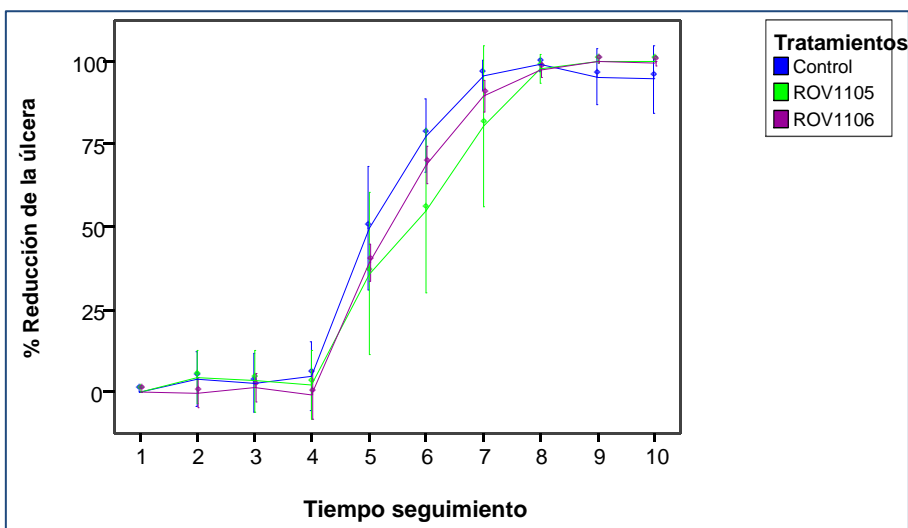


Figura 63. Evolución del porcentaje de reducción de la úlcera durante el estudio.

Evaluación histopatológica por grupos:

Grupo VI. Extremidad izquierda. Control.

En este grupo control, aunque las lesiones más importantes se localizan sobre todo en el tejido conjuntivo subcutáneo, la epidermis también presenta alteraciones histológicas. Así, en el animal 23 se observa una ulceración completa del epitelio, con presencia también de una severa inflamación

En este animal se observa también un infiltrado inflamatorio en el epitelio de la epidermis que está presente en casi todos los animales de este grupo. En dos casos leve y en otros dos moderado, que se acompaña de hiperplasia del epitelio. Esta hiperplasia se muestra como un crecimiento en forma de papilas hacia el tejido conjuntivo y normalmente aparece asociado a una acantosis con pérdida de la cohesión entre las células y una espongiosis con edema intercelular (figura 65 correspondiente al animal 19).

En el tejido conjuntivo subcutáneo la presencia de hemorragias se observa solamente en el animal 22 de forma moderada (figura 64). Sin embargo, el infiltrado inflamatorio vuelve a ser una constante en este grupo, siendo severo en los animales 22 y 23, moderado en los 20 y 24 y leve en los 19 y 21. También se acompaña de un aumento del número de células conjuntivas (fibrosis) que se orientan en diferentes direcciones espaciales y de un aumento del número de vasos.

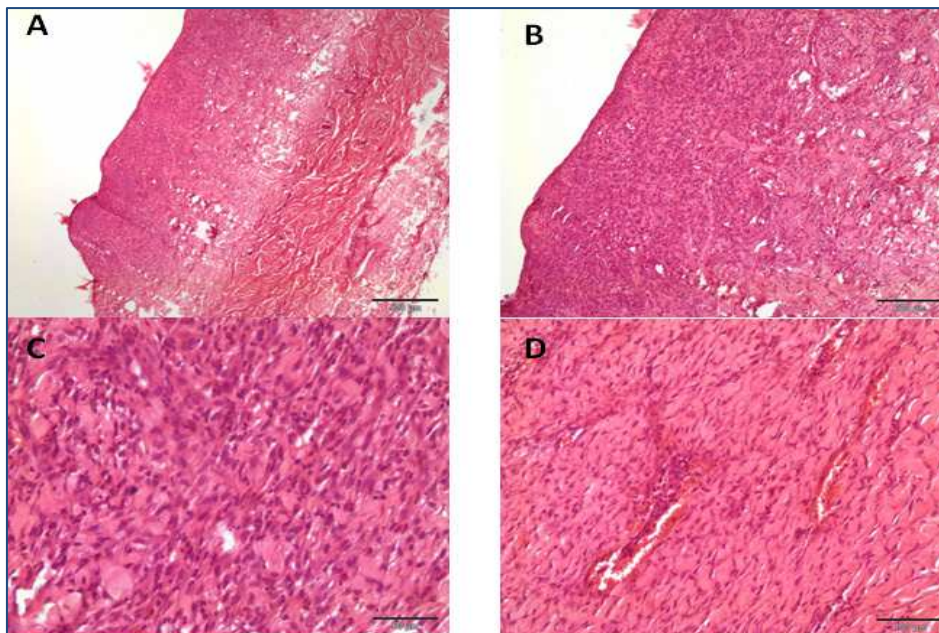


Figura 64. Controles. A, B y C: animal 23, extremidad izquierda. Ulceración completa de la epidermis, con sustitución por células inflamatorias, que se extienden también al tejido subcutáneo con presencia de una severa de la fibrosis. D: animal 22, extremidad izquierda. Zonas de hemorragia sobre todo alrededor de los neovasos.

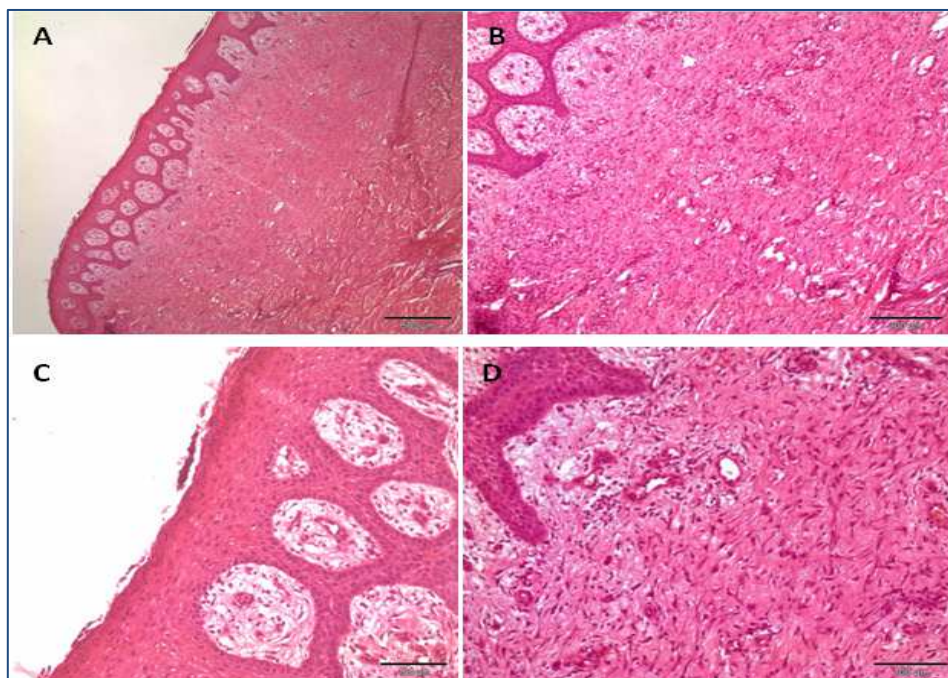


Figura 65. Animal 19 extremidad izquierda. Control. Hiperplasia de la epidermis con la emisión de papilas en la dermis. En ésta, el infiltrado inflamatorio es ligero, pero la fibrosis es moderada y la neovascularización es severa

Grupo VI. Extremidad derecha. Tratamiento ROV 1105.

En este grupo, los valores promedio de casi todas las lesiones de la epidermis han disminuido con respecto al grupo control, con la excepción de la hiperqueratosis en la capa córnea. En ningún caso se observa ulceración del epitelio de la epidermis y sólo en el animal 21, aparece una pústula bajo el estrato córneo. La inflamación sólo aparece también en este animal. La hiperplasia, acompañada de espongirosis, es más común en este grupo aunque menos severa que en el grupo control. Sin embargo, la hiperqueratosis aumenta, con presencia de núcleos en el estrato córneo.

En el tejido conjuntivo subcutáneo, los promedios del infiltrado inflamatorio y de la fibrosis son menos graves que en el grupo control, siendo sólo en el animal 22 severos. La neovascularización es también menor. El aumento del valor promedio respecto al control en el caso de la presencia de hemorragia se debe a que en el animal 24 (figura 66) esta es severa, pero sólo está presente en este animal y de forma leve en el 22. El animal más representativo de este grupo es el 20 donde se observa la hiperplasia e hiperqueratosis moderada y un leve incremento en el tejido conjuntivo fibroso subcutáneo (figura 67).

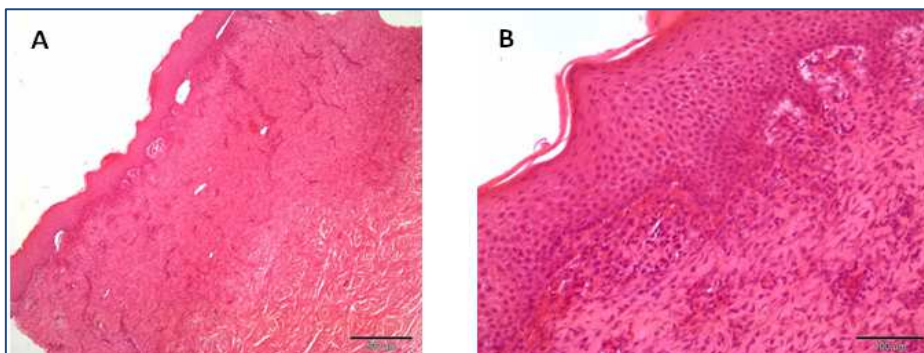


Figura 66. Animal 24: extremidad derecha. Tratamiento ROV 1105. Severa hemorragia en el tejido conjuntivo subcutáneo.

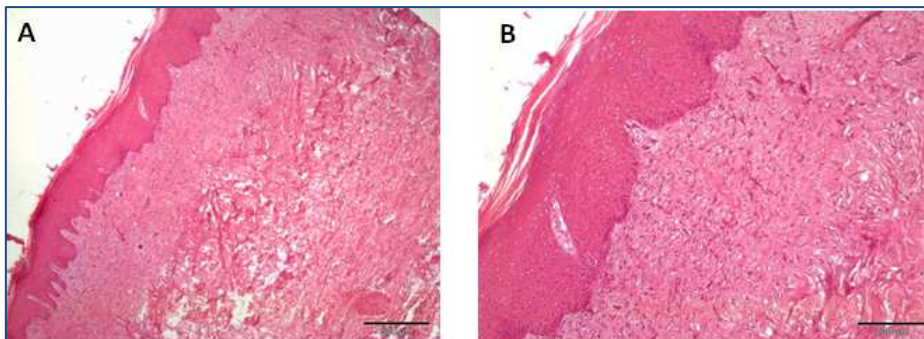


Figura 67. Animal 20: extremidad derecha. Tratamiento ROV 1105. A pesar la hiperplasia de la epidermis y la hiperqueratosis moderadas, es el animal más representativo del grupo.

Grupo VII. Tratamiento ROV 1106.

Los valores promedio en este grupo son generalmente inferiores a los encontrados en el grupo control aunque superiores a los del grupo ROV1105. La ulceración de la epidermis sólo aparece en la extremidad izquierda del animal 28 (figura 68) con lo que el valor medio es inferior al control pero no al tratamiento ROV1105, donde no aparece ninguna muestra ulcerada. En la extremidad izquierda no se observan pústulas ni inflamación en la epidermis y en la derecha aparecen en tres animales de los cinco analizados, aunque siempre de forma leve.

ESTUDIOS IN VIVO

La hiperplasia aparece en casi todos los animales de este grupo, sobre todo en la extremidad derecha (25 y 27 severas, 26 y 28 moderadas y 29 leve). En cambio, en la extremidad izquierda, los valores son más bajos. De nuevo, el valor promedio es inferior al control y similar al del grupo VI. La hiperqueratosis, aunque está también aumentada respecto al grupo control, el valor medio es inferior al tratamiento ROV1105. Se observa por ejemplo en los animales 26 extremidad izquierda y derecha (figuras 69 y 70) y en la extremidad derecha del 28 (figura 71). En el animal 30 no se observan lesiones en la epidermis (figura 72).

Son los animales 28 en su extremidad izquierda y derecha, y el 27 en su extremidad derecha, los que presentan los valores más altos de lesión en el tejido conjuntivo subcutáneo. En este animal 28, la hemorragia en el tejido subcutáneo, el aumento de la fibrosis, el infiltrado inflamatorio y la neovascularización son moderados o severos en las dos extremidades. En la extremidad derecha del animal 27, son la inflamación, la fibrosis y la neovascularización los que son severos. En el resto de los animales, en ambas extremidades, las lesiones son principalmente moderadas o leves. Sin embargo respecto al control, todos los valores promedios, excepto la hemorragia están disminuidos y están aumentados con respecto al grupo VI excepto la fibrosis, cuyo valor es similar.

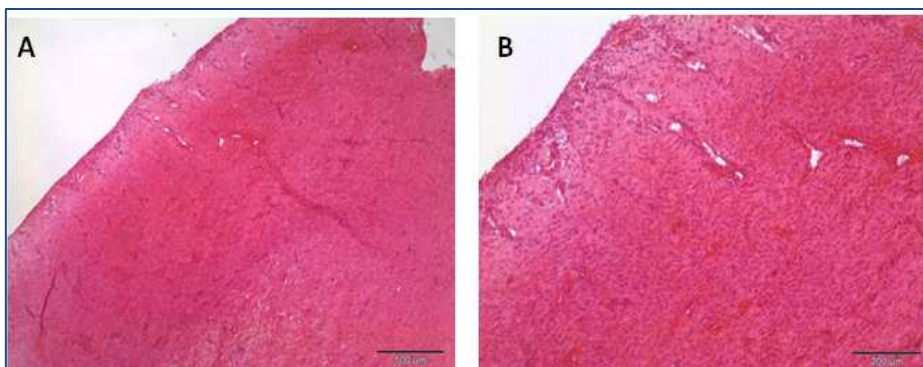


Figura 68. Animal 28: extremidad izquierda. Tratamiento ROV1106. Completa ulceración de la epidermis con aumento del tejido conjuntivo fibroso en la dermis, hemorragias e inflamación.

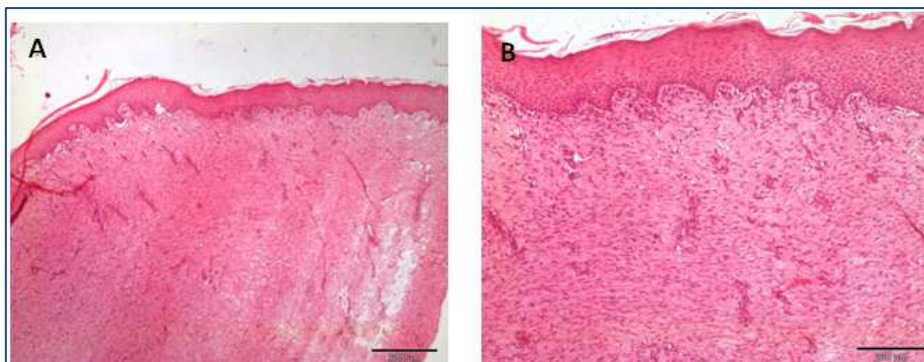


Figura 69 Animal 26: extremidad izquierda. Tratamiento ROV 1106. Hiperplasia de la epidermis.

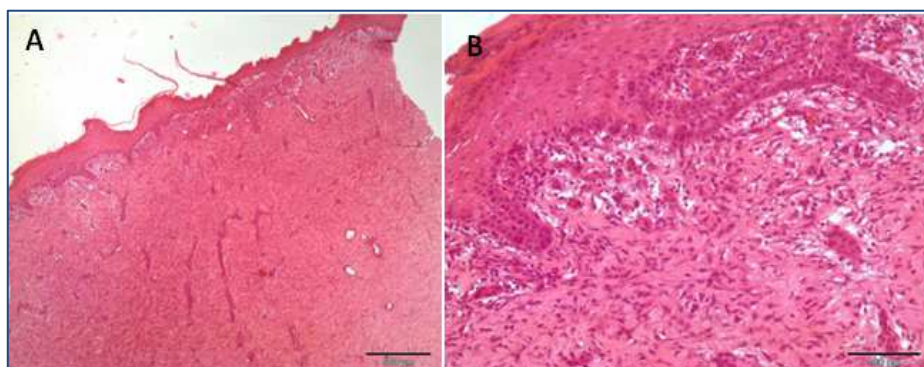


Figura 70. Animal 26: extremidad derecha. Tratamiento ROV 1106. Moderada hiperplasia de la epidermis y severa inflamación del tejido conjuntivo subcutáneo, sobre todo en la unión dermo-epitelial. También aparecen aumentos moderados de la fibrosis y de la neovascularización.

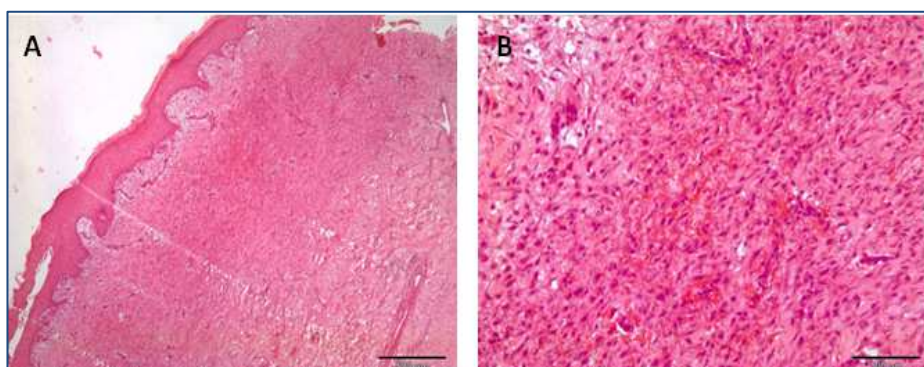


Figura 71. Animal 28: extremidad derecha. Tratamiento ROV 1106. Severa hemorragia en la dermis, con moderado aumento del infiltrado inflamatorio, tejido de granulación y vasos.

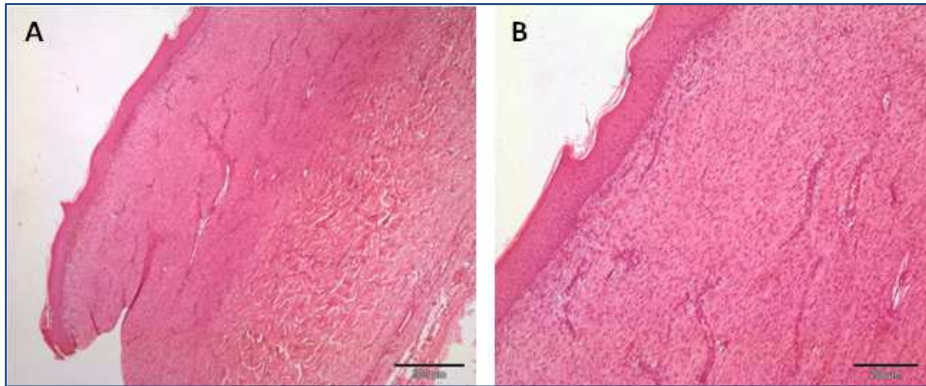


Figura 72. Animal 30: extremidad derecha. Tratamiento ROV 1106. La epidermis no presenta hiperplasia, pero en la dermis sí se observa un moderado aumento del infiltrado inflamatorio, fibrosis y la neovascularización y un ligero aumento de las zonas de hemorragia

Resultados comparativos de ambos grupos.

El tratamiento ROV1105 es el que presenta los mejores valores promedio respecto a ambos grupos: al grupo control y al tratamiento ROV1106 para casi todas las lesiones estudiadas. Además, también presenta la mayoría de sus animales incluidos en el grado V de Greenhalgh que es el grado donde la recuperación de la piel es más evidente. El siguiente grupo con menores lesiones es el tratamiento ROV1106 aunque con una mayor variabilidad en cuanto a la respuesta al tratamiento. Por último, el grupo control, es en el que las lesiones son más evidentes y los grados de Greenhalgh menores. El aumento de la hiperqueratosis en ambos grupos tratados con respecto al grupo control, pudiera ser atribuido a la aplicación del tratamiento, independientemente del tipo de este, ya que ni la ulceración, la inflamación o la hiperplasia aparecen aumentadas. En la tabla siguiente se describen las medias de las puntuaciones histológicas.

Tabla 47. Medias de la puntuación histológica.

TRATAMIENTO	N	EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA EPIDERMIS			
		ULCERACIÓN	PÚSTULAS/ INFLAMACIÓN	HIPERPLASIA	HIPERQUERATOSIS
CONTROL	6	0,50±1,23	1,50 ± 1,05	2,00 ± 1,00	0,00 ± 0,00
ROV1105	6	0,00 ± 0,00	0,17 ± 0,41 *	1,50 ± 0,55	1,17 ± 0,75 *
ROV1106	12	0,25 ± 0,87	0,25 ± 0,45 *	1,45 ± 1,04	0,55 ± 0,69
TRATAMIENTO	N	EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO SUBCUTÁNEO			
		HEMORRAGIA	INFLAMACIÓN	T. GRANULACIÓN / FIBROSIS	CONGESTIÓN/ NEOVASCULARIZACIÓN
CONTROL	6	0,33 ± 0,82	2,00 ± 0,89	1,83 ± 0,75	1,83 ± 0,75
ROV1105	6	0,67 ± 1,21	1,17 ± 1,67	1,50 ± 0,84	1,00 ± 0,63
ROV1106	12	0,83 ± 1,19	1,67 ± 0,99	1,42 ± 1,00	1,67 ± 0,78

* Diferencias significativas con respecto al grupo control.

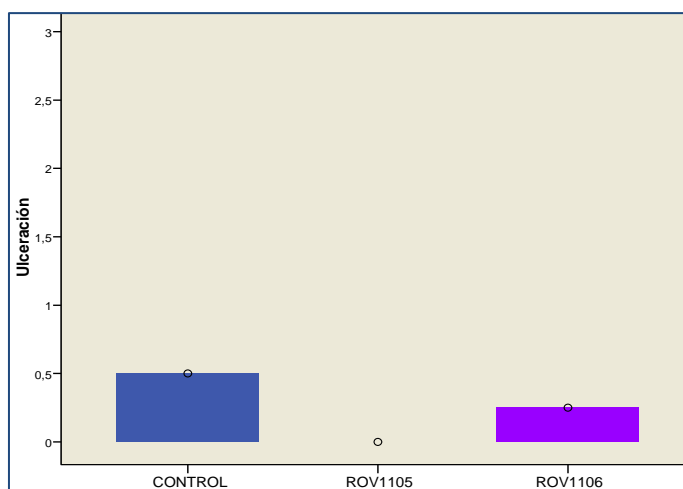


Figura 73. Media del grado de ulceración epidérmica en función del grupo

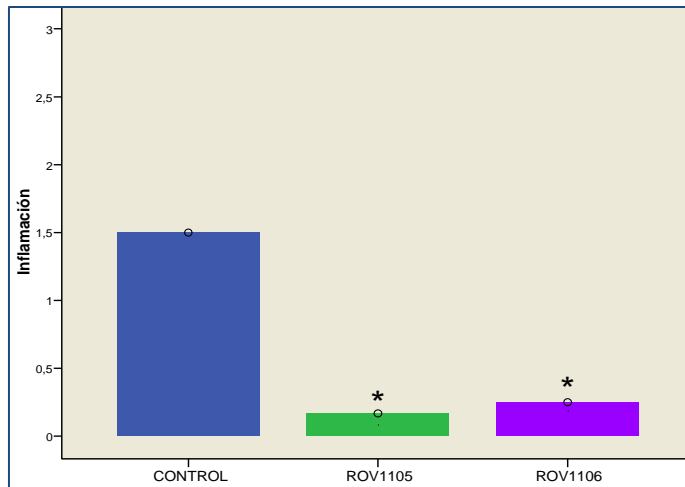


Figura 74. Media del grado de inflamación epidérmica en función del grupo

*Diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$)

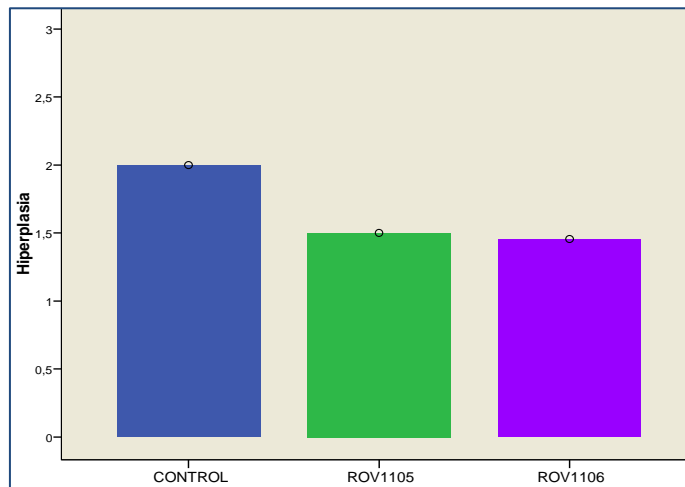


Figura 75. Media del grado de hiperplasia epidérmica en función del grupo

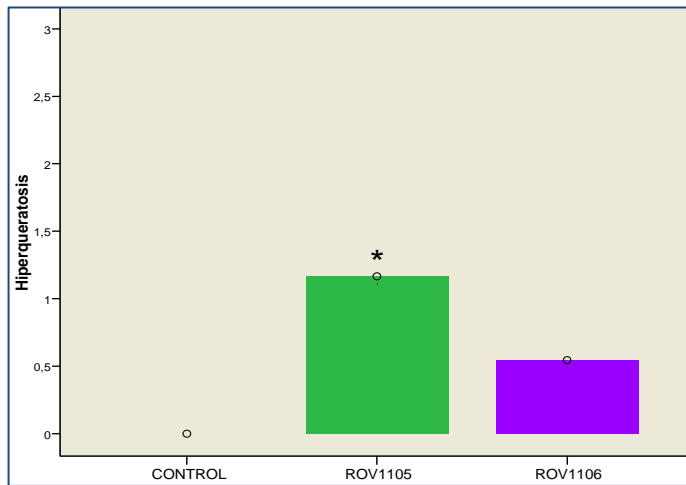


Figura 76. Media del grado de hiperqueratosis epidérmica en función del grupo

* Diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$)

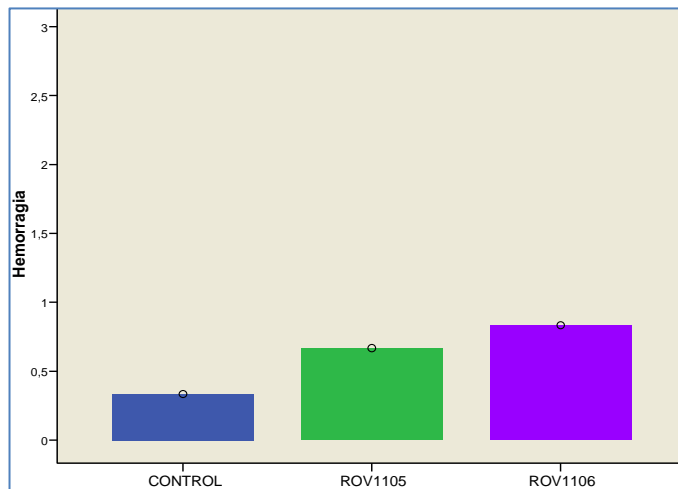


Figura 77. Media del grado de hemorragia subcutánea en función del grupo

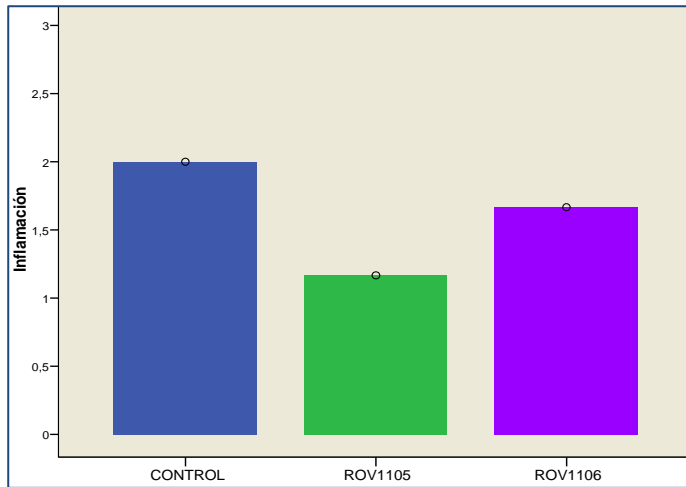


Figura 78. Media del grado de inflamación subcutánea en función del grupo

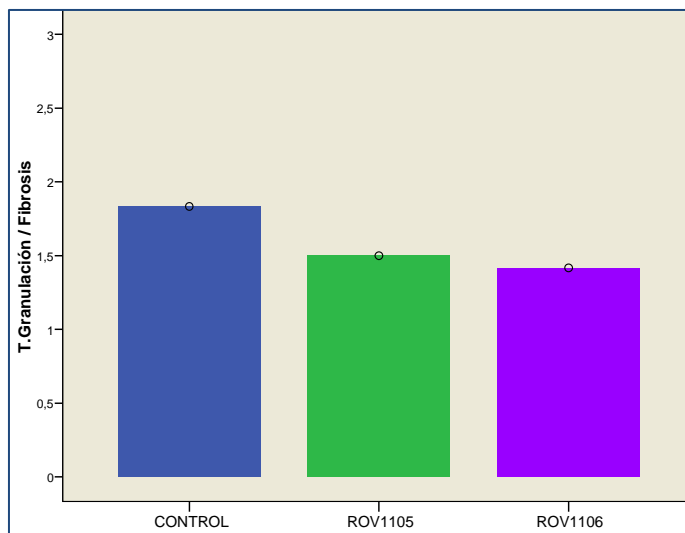


Figura 79. Media del grado de fibrosis subcutánea en función del grupo

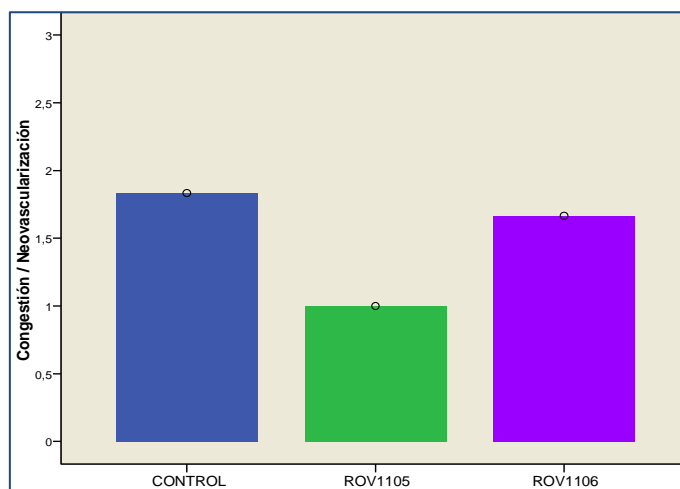


Figura 80. Media del grado de congestión subcutánea en función del grupo

Tabla 48. Medias de puntuación según escala de Greenhalgh

TRATAMIENTOS	N	EVALUACIÓN GREENHALGH	
		PUNTUACIÓN	GRADO PREDOMINANTE
CONTROL	6	6,33 ± 2,42	GRADO II
ROV1105	6	12,00 ± 2,45 *	GRADO IV
ROV1106	12	8,92 ± 4,01	GRADO III

* Diferencias significativas con respecto al grupo control.

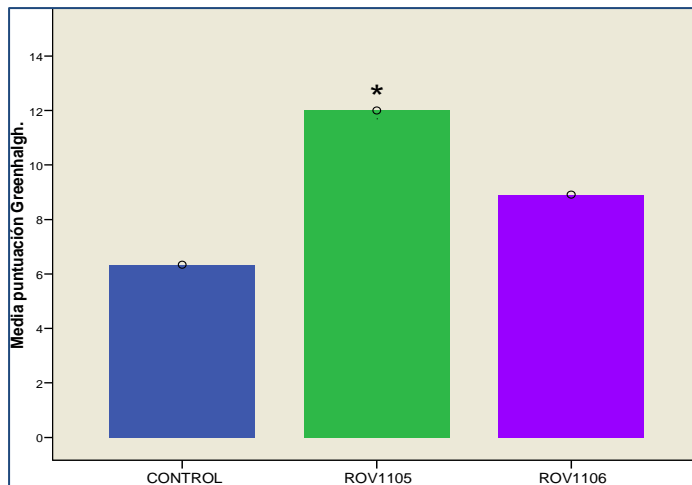


Figura 81. Media del grado de la puntuación según la escala de Greenhalgh

* Diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

Referencias bibliográficas

Ver capítulo 7.- de bibliografía [48,49,50,51,52]

5.5.- Estudios de úlceras corneales

5.5.1. Estudio SIF 110-1

Título:

Estudio in vivo en conejo diabético de la evaluación de la actividad de principios activos para el tratamiento de úlceras corneales

Objetivo

Evaluar la actividad terapéutica de 5 tratamientos farmacológicos (nuevas moléculas desarrolladas por Laboratorios ROVI) en la curación de úlceras corneales en modelo experimental de conejo diabético y compararlo entre ambos y con un grupo control sin tratamiento.

La úlcera corneal indolente es una queratitis ulcerativa superficial, también denominada Defecto Corneal Superficial Crónico (SCCED). Se caracteriza por ser defectos superficiales, crónicos, no infectados y con dificultad para cicatrizar. En este tipo de úlceras se daña la membrana basal del epitelio corneal, por lo que el epitelio que crece no se adhiere al estroma. Esto hace que con cualquier movimiento (incluso el parpadeo fisiológico), el epitelio que no está adherido se desprenda, siendo necesarias semanas o incluso meses para que se produzca una regeneración epitelial adecuada. El epitelio en estos casos, al no estar unido al estroma, se desbrida fácilmente.

En este proyecto se ha creado un modelo en conejo diabético de úlcera córnea indolente asociada ojo seco para el ensayo de la actividad terapéutica de 5 tratamientos farmacológicos en la curación de dichas úlceras corneales.

Tabla 49. Productos de ensayo.

Grupos	Grupo I (control)	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Nombre del producto de ensayo	-----	Vehículo	SRO-002	SRO-003	SRO-004	SRO-005
Lote		N/D	ROV1101	ROV1102	ROV1103	ROV1104

Animales del estudio

Para el estudio se han empleado 43 conejos albinos de raza neozelandesa (2 de reserva y 5 para poner a punto las técnicas quirúrgicas y de seguimiento de la patología corneal), con un peso medio de $4.35 \pm 0,37$ Kg.

Los animales tras 7 días de aclimatación, fueron sometidos a un examen clínico veterinario previo a la realización del estudio y fueron identificados mediante microchip.

Tras las 6 semanas de estabilización del estado diabético inducido en 38 conejos con aloxano (50mg/kg), los animales se distribuyeron aleatoriamente a 6 grupos experimentales. Tras la creación quirúrgica de la úlcera corneal, todos los tratamientos se administraron por vía tópica, en el ojo del animal, siendo el volumen de administración de 0,1 ml (2 gotas).

Producto de ensayo

Los productos de ensayo se detallan a continuación.

Tabla 50. Productos de ensayo.

IDENTIFICACIÓN	COMPOSICIÓN	ESTABILIDAD	PH	SOLUBILIDAD
Vehículo	colágeno/hialuronato sódico	Estable 3 meses a 4 °C	5.0	Solubles en agua Insoluble en etanol, metanol e isopropanol
ROV1101	ROV 1101 al 1% colágeno/hialuronato sódico	Estable 3 meses a 4 °C	5.3	Solubles en agua Insoluble en etanol, metanol e isopropanol
ROV1102	ROV 1102 al 1% colágeno/hialuronato sódico	Estable 3 meses a 4 °C	4.3	Solubles en agua Insoluble en etanol, metanol e isopropanol
ROV1103	ROV 1103 al 1% colágeno/hialuronato sódico	Estable 3 meses a 4 °C	5.4	Solubles en agua Insoluble en etanol, metanol e isopropanol
ROV1104	ROV1104 AL 1 % colágeno/hialuronato sódico	Estable 3 meses a 4 °C	5.5	Solubles en agua Insoluble en etanol, metanol e isopropanol

Sujetos de estudio

La investigación se ha llevado a cabo en treinta y ocho conejos machos.

Creación del modelo de diabetes en el conejo

Durante la semana previa a la diabetización se realizó una extracción de sangre, con el fin de obtener suero para medir perfil hepático, renal y metabólico (glucosa, colesterol, triglicéridos) basal de los animales de experimentación. Tras obtener esta primera muestra se procedió a la inducción experimental de la diabetes en los 38 conejos (2 de reserva por las posibles complicaciones que pudieran surgir de la creación de este modelo patológico).

La inducción de la diabetes se realizó mediante la inyección, en la vena marginal de la oreja, de una dosis única de un tóxico selectivo de las células β -pancreáticas, el aloxano (50 mg/kg disueltos en 15 ml de solución salina con pH ajustado entre 4,5-5,0). Debido a la destrucción de las células β -pancreáticas provocada por el aloxano, en las primeras horas posteriores a la inyección del mismo se produce una liberación masiva de insulina y un estado de hipoglucemia. Con el fin de evitar los graves problemas que la hipoglucemia pudiera acarrear para la vida del animal, tras el aloxano se le administró 2 ml de solución glucosada al 5% por vía intravenosa y 8 ml de la misma solución por vía subcutánea. Durante los primeros 5 días se mantuvo a los conejos con agua de bebida glucosada al 10% hasta que alcanzaron el estado hiperglucémico. Posteriormente, a los 5 días tras inducción con el aloxano la solución glucosada se sustituyó por agua de bebida normal.

Como tratamiento para proporcionar un buen bienestar de los animales de experimentación, durante los 7 días posteriores a la administración de aloxano se administró analgesia (buprenorfina 0,05 mg/kg) vía subcutánea cada 12 horas y metoclopramida (0,5 mg/kg) vía subcutánea cada 12 horas. Durante los primeros 3 días se administró carprofeno (3 mg/kg) vía subcutánea cada 24 horas y flunixin meglumine (2 mg/kg) vía subcutánea cada 24 horas.

Los animales permanecieron estabulados con agua y comida ad libitum durante 6 semanas. En el periodo de estabulación a todos los animales se les realizó controles de peso y glucemia dos veces a la semana.

Para confirmar la presencia de diabetes se consideró un nivel de glucosa mantenido mayor de 180-200 mg/ml.

ESTUDIOS IN VIVO

Tras la inducción de diabetes, los conejos se fueron distribuyendo aleatoriamente a los 6 grupos experimentales descritos anteriormente para la creación de la úlcera corneal.

Creación de la úlcera corneal

El día del ensayo se anestesiaron los animales con el siguiente protocolo anestésico: inducción con propofol vía IV (4 mg/kg), mantenimiento anestésico con sevoflurano (3-4%) vía inhalatoria y analgesia con buprenorfina IV (0.05 mg/kg). Tras la anestesia del animal se realizó el rasurado y desinfección de la zona periocular. Se procedió a preparar el campo quirúrgico según el procedimiento habitual: antisepsia cutánea y colocación de paños estériles fenestrados para el abordaje de toda la zona orbitaria y globo ocular. Se realizó un lavado de la superficie ocular con suero salino fisiológico y se realizaron las medidas basales:

- Toma de imágenes de la superficie corneal y el estado de su curvatura mediante la topografía corneal usando el Topógrafo CSO®. De esta forma se descartan enfermedades que alteren la forma correcta de la córnea.

- Medición de la presión intraocular en cada ojo con el tonómetro Care Vet, Tonovet.

- Toma de imágenes digitales para medidas de la úlcera y evaluación del segmento anterior con la lámpara de hendidura SL-D4 TopCon®.

- Medición de la profundidad del epitelio corneal mediante paquimetría.

- Medición de la secreción lacrimal mediante un test de Schirmer

Tras las medidas basales se realizó la úlcera empleando un microqueratomo (SBK® Moria). Se coloca el anillo de succión para el centrado e inmovilización de la córnea y se selecciona una profundidad de 100 micras para el paso de la cuchilla. El diámetro de la úlcera fue de 9 mm. Una vez realizada la úlcera se lavó abundantemente con solución salina isotónica (Cl Na 0.9%).

Tras la creación de la úlcera se tomaron las mismas medidas descritas anteriormente. Se utilizó como área basal de la úlcera la medida realizada inmediatamente después de la intervención quirúrgica.

Durante los 7 días posteriores a la intervención se administró analgesia (buprenorfina 0,05 mg/kg) vía subcutánea cada 12 horas y metoclopramida (0,5 mg/kg) vía subcutánea cada 12 horas. Durante los primeros 3 días se administró carprofeno (3 mg/kg) vía subcutánea cada 24 horas y flunixin meglumine (2 mg/kg) vía subcutánea cada 24 horas.

Al día siguiente y durante un total de 30 días, los animales se medicaron con los tratamientos asignados según el grupo de tratamiento (tabla 51).

Diariamente también se administró atropina vía tópica cada 8 horas para provocar ojo seco con disminución de producción de la lágrima.

Tabla 51. Distribución de animales por grupos del estudio.

GRUPO I CONTROL (N=5)	GRUPO II VEHÍCULO (N=5)	GRUPO III TRAT. SRO-002 (N=6)	GRUPO IV TRAT. SRO-003) (N=6)	GRUPO V TRAT. SRO-004 (N=6)	GRUPO VI TRAT. SRO-005 (N=6)
Animales 5,21,22,23,24	Animales 25,26,27,28, 29	Animales 6,30,31,32,33, 34	Animales 1,8,13,35,36,38	Animales 4,7,10,11,12,19	Animales 14,16,17,18,20, 37

Seguimientos

Los seguimientos de las úlceras se llevaron a cabo diariamente con la medición de las mismas medidas basales. Para la realización de las medidas los animales se sedaron con dexmedetomidina (40 microgramos/kg) que se revirtió posteriormente con atipamezol (400 microgramos/kg). Las medidas que se registraron en los seguimientos fueron las siguientes: radio de la superficie anterior de la córnea (mm), presión intraocular (mmHg), grosor de la córnea (micrómetros), área de la úlcera corneal (mm²), potencia corneal (dioptrías) y producción de lágrima (mm).

Se registró también, el peso corporal de los animales en los tiempos de seguimiento.

Tras la última medida a los 30 días de tratamiento, se eutanasiaron los animales. Se procedió a la disección del casquete esclerocorneal para extraer el área central de la córnea que se conservó en formol para su posterior procesamiento histológico (tinción de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson) por el laboratorio de anatomía patológica.

Valoración histológica de las úlceras

La evaluación histológica ha determinado la calidad del tejido formado así como la determinación de la disposición de las fibras de colágeno. Las muestras se remitieron en formol, se incluyeron en parafina y se realizaron tres cortes consecutivos de 5 μ . Sobre cada corte se realizaron las tinciones de hematoxilina-eosina (HE), Rojo Sirio y tricrómico de Masson (TCM). Los grados asignados a cada parámetro se recogen en la tabla 4. En los cortes teñidos con HE, se estudió el grado de epitelización en la zona de ulceración, el número absoluto de queratinocitos del epitelio, la profundidad de la úlcera o el grado de fibrosis, infiltrado inflamatorio, apoptosis, presencia de vasos, presencia de fibras nerviosas y estado de la Membrana de Descemet. La profundidad de la úlcera y el grado de fibrosis bajo el epitelio se estudiaron juntos ya que ambos se relacionan con el espesor del tejido conjuntivo en la zona lesionada. En los casos en los que no se observaba ulceración (valor 5), el grado asignado corresponde con la fibrosis encontrada siendo 1 de un espesor inferior al 25% del estroma corneal, 2 de entre 26 y 49% y 3 de más del 50%.

Con la tinción de Rojo Sirio, se valoró la pérdida del colágeno en el estroma como una disminución en la coloración y por último, con el TCM, la existencia de sustancia hialina en esta misma capa, que se tiñó de rojo.

Tabla 52. Puntuación dada en función de los grados asignados a cada parámetro

	PUNTUACIÓN	CLASIFICACIÓN DE LA PUNTUACIÓN
Grado de epitelización	1-5	1: ulceración severa 5: inexistencia de úlcera
Pérdida queratinocitos	Número absoluto de células	Número absoluto de células
Profundidad úlcera/fibrosis		
Infiltrado inflamatorio		
Pérdida colágeno		1: leve
Presencia hialina	1-3	2: media
Grado de apoptosis		3: severa
Presencia fibras nerviosas		
Presencia vasos		
Membrana de Descemet		

Resultados referentes a la creación del modelo diabético en el modelo experimental: conejo diabético

Tras la inducción de la diabetes con el aloxano (50 mg/kg) en los 38 conejos y tras el seguimiento de los niveles de glucemia durante la primera semana se observó que los conejos 1,2,3,4, 7,8,9,10,11,12,13,14,16,17,18,19,20 y 37 tenían valores de glucosa inferiores a 200 mg/ml. En función de estos resultados se consideró realizar una segunda inducción del estado diabético con una nueva dosis de aloxano (50 mg/kg). Realizando de nuevo el seguimiento de los niveles de glucosa de estos animales se observó de nuevo que los conejos 6,8 y 19 seguían con valores de glucosa inferiores a 200 mg/kg por lo que de nuevo se les indujo el estado diabético con una nueva dosis de aloxano (50mg/kg). Por último el conejo 19 no mostraba valores de glucosa que indicaran estado diabético por lo que se tuvo que reinducir la diabetes con una cuarta dosis de aloxano tras la cual se consiguió obtener dicho estado diabético en este animal experimental.

Tras la inducción del estado diabético del conejo 15, este presentó signos clínicos de intoxicación: convulsiones, taquipnea severa, hiperextensión y rigidez de extremidades que desencadenaron en muerte el mismo día. La necropsia macroscópica reveló hemorragia masiva en ambos pulmones. El conejo 2 a los 5 días post inducción del estado diabético muere. Tras la necropsia realizada se observó un tejido hepático amarillento y blando que indicó una lipidosis hepática. Estos datos junto con la analítica practicada hizo pensar que la causa de la muerte fue por fallo hepático. Del mismo modo, tras 10 días de la administración del aloxano el conejo 9 muere y tras 7 semanas muere el conejo 3, ambos también por fallo hepático.

En la tabla 53 y Figura 86 se muestran los valores medios de glucosa mantenidos durante el desarrollo del estudio, excluyendo los datos de los animales fallecidos (animales 2, 3, 9 y 15). Los valores de glucemia se mantuvieron por encima de 200 mg/kg en todos los animales durante el desarrollo del ensayo.

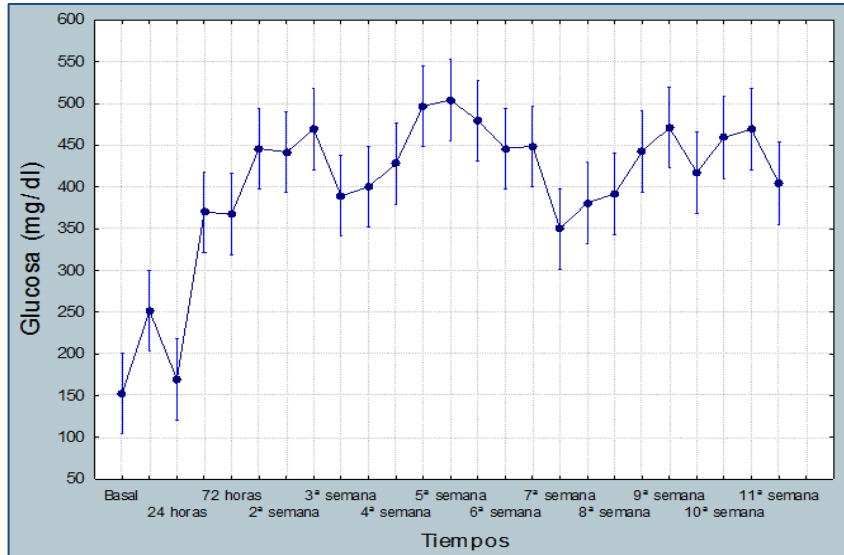


Figura 82. Valores medios de glucosa mantenidos en los conejos incluidos en el estudio experimental.

Tabla 53. Valores medios de glucosa mantenidos en los conejos incluidos en el estudio experimental

TIEMPOS	GLUCOSA (mg/ml)
Basal	152,26±20,10
8 horas post inducción aloxano	251,59±137,02
24 horas post inducción aloxano	169,29±89,35
48 horas post inducción aloxano	369,88±146,14*
72 horas post inducción aloxano	367,29±153,57*
Semana 2 post inducción aloxano	445,91±157,07*
Semana 2 post inducción aloxano	441,73±152,16*
Semana 3 post inducción aloxano	469,06±186,88*
Semana 3 post inducción aloxano	389,23±104,97*
Semana 4 post inducción aloxano	399,97±213,16*
Semana 4 post inducción aloxano	427,94±149,73*
Semana 5 post inducción aloxano	497,09±176,48*
Semana 5 post inducción aloxano	504,09±193,48*
Semana 6 post inducción aloxano	479,56±185,21*
Semana 6 post inducción aloxano	446,15±159,13*
Semana 7 post inducción aloxano	448,71±166,91*
Semana 7 post inducción aloxano	349,82±76,97*
Semana 8 post inducción aloxano	380,97±94,18*
Semana 8 post inducción aloxano	391,73±85,58*
Semana 9 post inducción aloxano	442,32±118,26*
Semana 9 post inducción aloxano	470,97±150,36*
Semana 10 post inducción aloxano	417,20±104,27*
Semana 10 post inducción aloxano	459,45±149,35*
Semana 11 post inducción aloxano	469,00±132,14*
Semana 11 post inducción aloxano	404,64±139,58*

* Diferencias estadísticamente significativas respecto al valor basal. $p < 0,05$.

Resultados relativos a la creación del modelo de úlcera corneal indolente y ojo seco en el conejo diabético

Exactamente a las 6 semanas de inducción con buenos resultados del estado diabéticos los animales fueron intervenidos quirúrgicamente para la creación de la úlcera corneal empleando un microqueratomo (SBK® Moria). Una vez realizada la úlcera se lavó abundantemente con solución salina isotónica (Cl Na 0.9%).

Tras la cirugía los animales fueron aleatoriamente distribuidos a los grupos de tratamiento.

No hubo ningún hallazgo intraoperatorio que impidiera o dificultara la creación de la úlcera corneal. Los resultados de la intervención fueron favorables. No se produjo ninguna muerte debida a la creación de la úlcera corneal.

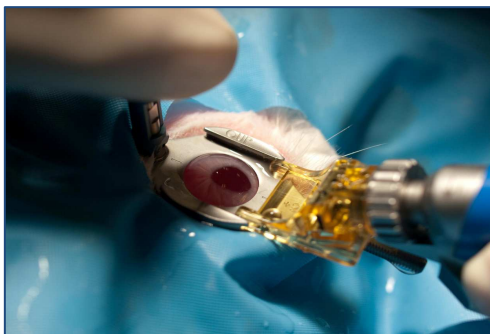


Figura 83. Realización del corte de la superficie corneal para creación de la úlcera.

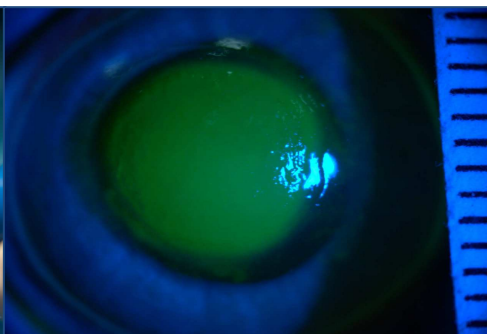


Figura 84. Úlcera corneal tras la cirugía.

Con respecto a la creación de ojo seco, se observó que la administración tópica de atropina cada 8 horas produjo una disminución significativa de la producción de lágrima consiguiendo el modelo de ojo seco en todos los sujetos de estudio. Se adjuntan los resultados de las medias medidas del test de schirmer (mm) durante el desarrollo del estudio y el % de reducción de la lágrima mantenido durante el estudio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos del estudio.

Tabla 54. Medidas del test de schrimer (mm) durante el desarrollo del estudio

TIEMPO (DÍAS)	PRODUCCIÓN DE LÁGRIMA MEDIANTE TEST DE SCHRIMER (MM)					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Basal	19,8±2,4	20,0±3,7	18,7±2,8	19,9±5,8	16,8±4,0	16,0±3,5
0 postcirugía	19,8±2,4	20,0±3,7	18,7±2,8	19,9±5,8	16,8±4,0	16,0±3,5
1	-----	-----	25,0±0,0	13,7±1,2*	13,0±5,8*	10,5±5,1*
2	12,8±3,3*	13,4±4,2*	13,0±5,8*	10,1±2,2*	8,5±1,4*	8,3±2,2*
3	10,0±2,4*	9,8±3,1*	11,0±2,7*	10,6±2,5*	7,8±1,2*	7,5±1,6*
4	11,2±3,6*	9,8±2,7*	11,0±3,1*	8,1±0,9*	7,3±0,8*	8,5±1,5*
5	8,8±1,9*	10,4±1,5*	10,7±2,2*	8,9±0,9*	7,7±1,5*	7,7±1,0*
6	8,4±2,5*	10,6±1,3*	8,0±2,1*	10,2±3,4*	7,2±0,7*	6,5±0,5*
7	8,4±2,7*	7,2±1,9*	7,5±2,4*	9,7±2,3*	8,7±3,3*	6,0±4,6*
8	8,6±4,0*	6,8±3,8*	6,5±3,0*	8,7±3,8*	10,2±3,9*	11,8±4,5*
9	6,8±2,9*	4,6±2,6*	8,5±1,6*	7,2±4,5*	8,3±1,2*	8,7±1,9*
10	6,6±4,2*	7,0±1,6*	8,7±1,6*	8,3±2,0*	7,8±0,7*	7,7±0,8*
11	7,0±2,5*	6,6±1,7*	8,3±1,0*	8,2±1,2*	7,0±2,1*	6,7±1,2*
12	7,8±2,3*	7,6±1,5*	9,0±0,9*	7,3±1,7*	7,5±1,2*	7,2±3,1*
13	7,0±1,9*	6,6±1,3*	7,7±1,0*	7,0±0,9*	8,0±1,4*	7,2±2,0*
14	7,8±2,4*	7,0±1,4*	7,7±1,6*	6,8±1,2*	8,2±1,2*	7,8±1,2*
15	8,2±1,3*	7,2±0,8*	7,8±1,6*	8,5±4,3*	7,2±1,9*	9,1±1,1*
16	9,2±0,8*	5,4±3,0*	7,3±1,6*	8,8±1,2*	7,0±1,7*	7,8±1,2*
17	6,8±3,7*	6,2±3,5*	8,2±4,3*	8,5±2,3*	6,8±1,0*	7,6±0,5*
18	6,0±1,6*	8,6±3,2*	8,2±2,9*	7,2±4,4*	6,5±1,4*	6,7±1,5*
19	6,2±0,8*	7,4±1,7*	7,0±1,7*	6,8±1,7*	6,2±1,7*	7,1±3,0*
20	7,2±1,3*	6,6±2,1*	7,5±1,9*	7,0±1,8*	6,8±1,2*	6,7±2,2*

ESTUDIOS IN VIVO

21	4,8±2,7*	7,2±5,9*	7,7±4,9*	5,3±1,9*	6,8±1,2*	7,1±1,1*
22	5,4±1,8*	6,6±2,6*	7,5±4,0*	5,7±1,9*	7,8±2,4*	8,4±2,2*
23	6,0±1,4*	7,8±0,8*	7,8±2,2*	6,8±0,7*	7,8±0,7*	7,9±0,9*
24	5,6±1,7*	8,2±0,8*	8,7±2,1*	7,8±1,7*	6,5±2,8*	6,6±1,4*
25	7,2±0,8*	6,4±0,9*	6,7±1,7*	6,5±2,4*	6,0±3,5*	6,1±1,5*
26	6,4±0,9*	7,6±0,5*	7,3±0,8*	7,8±1,3*	7,0±1,5*	7,6±1,0*
27	5,8±1,3*	6,8±0,8*	7,3±1,4*	7,3±1,0*	6,3±3,0*	8,1±3,4*
28	6,0±0,7*	7,2±1,6*	6,3±2,5*	6,3±2,4*	7,2±2,8*	7,8±1,9*
29	6,4±0,9*	5,8±0,8*	7,3±1,0*	7,0±1,3*	6,0±2,0*	6,6±1,4*
30	5,6±1,3*	6,8±1,3*	6,7±2,2*	7,7±2,4*	7,3±3,3*	7,3±1,2*
31	5,6±2,4*	7,6±2,5*	9,0±3,5*	6,0±2,4*	7,7±1,6*	7,4±0,8*

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

Tabla 55. % de reducción de lágrima durante el desarrollo del estudio.

TIEMPO (DÍAS)	% DE REDUCCIÓN DE PRODUCCIÓN DE LÁGRIMA					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Basal	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
0 postcirugía	-25,0±50,0	0,0±0,0	16,7±40,8*	0,0±0,0	16,7±40,8	0,0±0,0
1	-----	-----	-25,0±0,0	19,6±14,3*	24,4±21,9*	34,4±27,0*
2	35,1±16,2*	33,2±17,2*	30,5±30,8*	42,9±24,6*	48,0±11,9*	45,7±16,1*
3	47,7±10,3*	50,8±14,4*	39,4±20,2*	43,8±15,1*	51,6±12,3*	51,3±12,4*
4	43,9±14,3*	50,0±14,1*	38,7±23,9*	55,7±14,3*	54,9±9,3*	44,1±16,5*
5	55,3±9,8*	47,2±7,2*	41,2±17,8*	52,6±12,3*	53,7±7,7*	49,7±13,5*
6	57,2±13,3*	45,6±11,8*	56,3±12,9*	48,4±16,3*	55,8±9,3*	57,0±13,9*
7	57,6±12,9*	63,9±6,7*	57,8±19,8*	50,3±15,9*	44,7±29,2*	64,4±27,3*
8	56,2±22,4*	65,0±22,3*	63,1±21,2*	56,9±24,8*	34,9±31,2*	27,9±24,6*

9	66,5±11,2*	76,7±12,0*	53,7±10,7*	64,2±26,5*	47,1±17,7*	45,6±6,5*
10	67,6±17,9*	63,5±12,0*	53,4±7,1*	57,3±14,1*	51,1±13,2*	50,8±7,3*
11	64,9±11,2*	66,4±9,6*	55,1±3,2*	58,3±10,0*	58,2±10,9*	55,7±17,8*
12	60,6±10,5*	60,6±11,8*	51,0±7,7*	63,5±9,3*	53,4±13,5*	53,0±25,5*
13	64,8±7,8*	66,2±8,5*	58,1±8,5*	64,6±6,7*	51,4±8,4*	51,7±26,0*
14	60,7±10,2*	64,0±9,6*	60,5±12,4*	64,1±13,3*	48,5±16,6*	48,8±15,3*
15	58,3±7,0*	62,8±9,8*	57,4±9,4*	58,3±15,9*	55,7±15,8*	39,9±21,8*
16	52,9±7,7*	73,5±12,3*	60,1±11,0*	54,7±11,1*	58,0±6,2*	49,9±13,1*
17	65,8±18,2*	69,9±15,9*	54,7±30,0*	54,6±22,5*	58,2±8,0*	50,4±15,7*
18	69,8±6,1*	56,0±20,1*	55,3±18,8*	64,6±19,8*	58,7±14,9*	54,8±18,5*
19	67,9±7,9*	61,8±13,0*	61,2±13,6*	64,5±12,6*	60,4±19,4*	57,4±18,1*
20	62,7±10,6*	65,1±16,3*	59,6±10,4*	62,9±15,4*	57,9±10,4*	51,1±26,7*
21	75,6±13,3*	65,6±24,7*	57,9±24,6*	72,3±14,5*	57,5±12,1*	52,0±18,6*
22	72,6±8,2**	67,0±11,6*	59,4±16,2*	71,1±12,2*	51,9±16,3*	46,6±21,4*
23	69,0±9,6*	60,1±7,9*	56,9±13,5*	64,9±9,2*	51,9±8,5*	48,8±14,8*
24	71,5±8,2*	58,3±5,2*	52,2±14,4*	59,0±14,5*	62,0±9,1*	56,8±12,3*
25	63,2±6,2*	66,6±9,8*	64,2±8,7*	66,5±15,2*	65,3±12,5*	61,2±10,7*
26	67,3±5,8*	60,6±9,6*	59,9±7,9*	58,8±14,7*	58,0±5,0*	51,0±12,7*
27	70,9±4,6*	64,7±9,6*	60,0±8,4*	61,7±12,3*	62,8±11,3*	50,0±21,8*
28	69,1±6,6*	64,2±3,4*	65,1±16,0*	66,7±16,9*	55,7±19,8*	50,7±16,4*
29	67,3±6,0*	70,6±4,5*	59,9±7,9*	62,3±16,3*	64,0±9,5*	55,4±23,4*
30	71,2±8,2*	64,7±11,5*	63,9±11,5*	60,7±13,3*	55,5±18,5*	53,4±12,2*
31	72,4±9,9*	62,4±8,9*	50,8±21,7*	68,6±16,3*	53,0±12,5*	50,1±16,8*

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

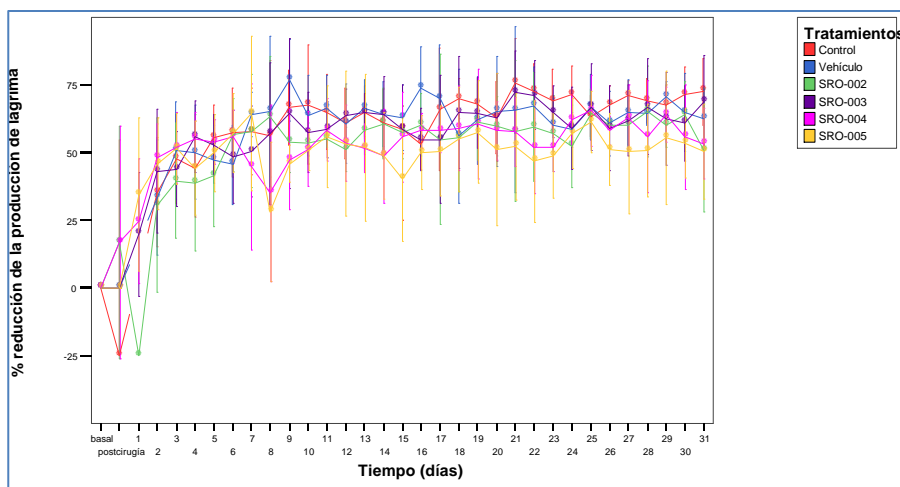


Figura 85. % de reducción de lágrima durante el desarrollo del estudio.

Resultados relativos a la actividad farmacológica de los productos de ensayo en el tratamiento de las úlceras corneales

En el siguiente apartado se describen todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio. Esto es, la evolución del peso corporal, la evolución de la curación/cierre de las úlceras y la evaluación histológica de las mismas realizado tras la eutanasia de los animales y toma de muestras.

No se ha producido ninguna muerte debida a los tratamientos administrados (productos de ensayo) durante el desarrollo del estudio. El único conejo que muere a los 8 días tras la creación de la úlcera corneal y tras la administración de su tratamiento es el conejo 3 (grupo IV: tratamiento SRO-003) y su muerte se debe a fallo hepático producido por la inducción de diabetes con el aloxano. Tampoco se han observado signos clínicos negativos causados por los productos de ensayo testados en este estudio.

Los datos recogidos del animal 3 (grupo IV) se eliminan del estudio estadístico.

Peso corporal

En la tabla siguiente se muestran los valores globales de la evolución del peso corporal a lo largo del estudio.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas del peso entre los grupos ni diferencias significativas observadas a lo largo del estudio.

Tabla 56. Evolución del peso durante el estudio.

TIEMPO (DÍAS)	PESO (Kg)					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
0	4,45±0,27	4,54±0,54	4,21±0,16	4,35±0,50	4,40±0,35	4,24±0,35
0 postcirugía	4,45±0,27	4,54±0,54	4,21±0,16	4,35±0,50	4,40±0,35	4,24±0,35
1	-----	-----	4,24±0,00	4,35±0,76	4,42±0,37	4,22±0,29
2	4,36±0,38	4,54±0,50	4,20±0,14	4,28±0,58	4,41±0,41	4,23±0,38
3	4,25±0,20	4,52±0,48	4,21±0,15	4,29±0,57	4,37±0,37	4,20±0,38
4	4,30±0,24	4,57±0,42	4,14±0,18	4,22±0,58	4,27±0,30	4,18±0,38
5	4,20±0,19	4,37±0,41	4,07±0,19	4,21±0,60	4,32±0,31	4,19±0,34
6	4,23±0,28	4,37±0,46	4,08±0,18	4,12±0,59	4,29±0,28	4,17±0,33
7	4,30±0,34	4,34±0,59	4,07±0,17	4,10±0,62	4,26±0,24	4,10±0,29
8	4,14±0,23	4,34±0,56	4,06±0,18	4,14±0,61	4,25±0,22	4,06±0,32
9	4,13±0,20	4,39±0,52	4,06±0,14	4,13±0,62	4,24±0,25	4,09±0,33
10	4,13±0,21	4,32±0,59	3,99±0,15	4,11±0,64	4,29±0,28	4,13±0,30
11	4,11±0,18	4,33±0,54	3,99±0,16	4,12±0,63	4,20±0,24	4,03±0,31
12	4,16±0,17	4,38±0,56	4,00±0,16	4,25±0,61	4,21±0,26	4,12±0,33
13	4,19±0,22	4,38±0,53	4,03±0,13	4,16±0,63	4,21±0,26	4,10±0,33
14	4,18±0,20	4,42±0,55	4,06±0,12	4,16±0,64	4,22±0,27	4,19±0,31
15	4,16±0,24	4,42±0,54	4,05±0,16	4,17±0,63	4,17±0,22	4,24±0,36
16	4,10±0,21	4,40±0,51	4,04±0,14	4,18±0,59	4,25±0,27	4,20±0,35
17	4,16±0,22	4,41±0,55	4,05±0,14	4,18±0,61	4,24±0,30	4,21±0,37
18	4,14±0,25	4,44±0,56	4,05±0,16	4,20±0,61	4,21±0,28	4,12±0,34
19	4,25±0,22	4,45±0,59	4,12±0,16	4,17±0,59	4,25±0,33	4,22±0,34
20	4,23±0,29	4,47±0,54	4,06±0,12	4,20±0,55	4,26±0,31	4,19±0,35

ESTUDIOS IN VIVO

21	4,23±0,19	4,45±0,52	4,10±0,13	4,19±0,60	4,22±0,30	4,28±0,38
22	4,25±0,21	4,45±0,52	4,09±0,16	4,20±0,54	4,23±0,33	4,23±0,38
23	4,25±0,20	4,46±0,53	4,09±0,14	4,19±0,54	4,22±0,28	4,26±0,37
24	4,25±0,23	4,48±0,55	4,11±0,16	4,19±0,55	4,21±0,31	4,28±0,36
25	4,28±0,22	4,49±0,55	4,15±0,12	4,21±0,56	4,23±0,30	4,22±0,36
26	4,28±0,27	4,52±0,54	4,13±0,14	4,20±0,56	4,25±0,29	4,31±0,38
27	4,24±0,26	4,50±0,56	4,11±0,14	4,22±0,57	4,23±0,32	4,33±0,34
28	4,27±0,23	4,51±0,52	4,12±0,14	4,21±0,56	4,23±0,29	4,26±0,35
29	4,25±0,21	4,53±0,59	4,14±0,13	4,21±0,57	4,24±0,34	4,30±0,37
30	4,27±0,23	4,58±0,61	4,11±0,12	4,26±0,53	4,27±0,30	4,31±0,37
31	4,27±0,25	4,56±0,63	4,16±0,11	4,20±0,55	4,23±0,30	4,28±0,39

Evolución del Área de las úlceras corneales.

A continuación se muestran los valores globales de la evolución del área de las úlceras corneales a lo largo del estudio, así como del porcentaje de reducción o curación de las mismas.

La reducción de las úlceras y por tanto la disminución del área de las mismas y el aumento del porcentaje de reducción es significativo ($p < 0,05$) a partir del día siguiente tras la creación de la úlcera para todos los grupos.

Se observa que los grupos 1, 2, 3, 4, y 6 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 50% a partir del día 2 mientras que esta reducción se observa en el grupo 5 a partir del día 3 de tratamiento.

No hay diferencias estadísticamente significativas en los valores de reducción de la úlcera entre los grupos del estudio durante el desarrollo del mismo.

Tabla 57. Evolución del área durante el estudio.

Tiempo (días)	Área (mm ²)					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
0 postcirugía	61,02±12,00	58,22±9,21	61,63±14,46	63,55±14,90	63,98±13,47	63,19±9,96
1	-----	-----	39,93±0,00*	42,32±16,12*	45,67±10,15*	46,69±11,43*
2	23,52±6,45*	23,26±14,37*	28,93±6,83*	29,37±17,32*	32,36±6,83*	26,84±9,29*
3	12,31±7,99*	11,10±8,44*	11,78±3,19*	17,39±12,18*	17,47±7,08*	13,94±7,68*
4	3,77±4,55*	4,17±3,45*	5,02±3,48*	6,45±6,48*	10,42±5,78*	6,04±5,06*
5	1,65±1,79*	1,58±1,18*	4,14±4,29*	1,97±1,81*	13,04±6,43*	1,92±1,50*
6	2,22±2,00*	2,28±2,78*	8,26±7,70*	4,51±5,16*	13,91±5,13*	4,46±3,03*
7	7,03±10,63*	7,78±7,75*	9,33±8,08*	2,12±2,58*	11,84±5,05*	2,30±1,65*
8	9,44±11,15*	5,99±5,93*	6,24±7,09*	1,45±1,63*	12,70±8,13*	3,27±3,05*
9	11,63±11,17*	6,18±6,61*	5,61±7,97*	0,99±1,25*	10,69±6,55*	5,74±8,96*
10	10,51±9,48*	7,48±7,23*	6,90±9,14*	3,16±4,77*	8,58±6,86*	5,30±7,94*
11	7,61±9,94*	5,70±4,31*	2,78±3,84*	4,89±7,07*	8,38±6,64*	3,45±3,36*
12	8,69±11,55*	5,30±3,43*	3,88±5,25*	6,71±9,01*	9,70±5,42*	3,13±3,24*
13	9,10±10,55*	5,51±3,52*	2,96±3,42*	6,56±7,66*	9,36±7,06*	4,20±4,75*
14	8,49±8,89*	9,73±7,61*	3,70±5,56*	8,78±7,42*	6,88±5,73*	3,62±4,54*
15	9,06±8,48*	11,59±8,65*	3,52±3,69*	9,41±6,64*	12,10±9,22*	3,15±3,91*
16	7,68±7,21*	10,13±3,65**	3,45±3,75*	8,20±6,00*	9,26±7,31*	3,40±4,34*
17	6,31±8,14*	9,24±5,00*	4,02±4,29*	9,07±6,90*	9,32±6,72*	4,22±5,61*
18	6,26±8,31*	7,32±4,23*	3,62±3,22*	9,96±7,44*	9,75±3,47*	6,80±5,10*
19	4,98±6,60*	4,87±3,07*	2,01±2,31*	13,17±8,33*	9,35±3,67*	7,01±5,24*
20	6,18±4,98*	3,99±4,10*	1,40±1,69*	9,92±7,97*	7,31±4,60*	3,70±1,11*
21	5,11±5,02*	2,92±2,07*	1,24±1,41*	8,58±5,68*	8,13±5,91*	4,10±3,66*

ESTUDIOS IN VIVO

22	3,84±3,88*	2,21±2,01*	0,70±1,19*	7,27±3,20*	5,92±3,24*	7,85±12,06*
23	2,80±3,41*	0,76±0,84*	0,70±1,52*	4,65±3,40*	6,00±4,12*	9,10±13,19*
24	4,71±2,59*	0,79±0,87*	2,33±4,08*	4,29±3,01*	5,94±4,21*	9,28±13,77*
25	4,50±3,19*	1,44±0,80*	2,00±3,48*	3,76±5,70*	5,47±2,99*	10,62±9,66*
26	3,73±4,71*	1,67±0,39*	2,09±2,83*	2,81±5,04*	6,09±2,93*	7,48±5,73*
27	5,50±1,89*	0,80±1,40*	0,74±1,14*	1,84±1,83*	5,88±2,21*	5,98±5,47*
28	5,75±4,18*	0,64±1,18*	0,67±1,08*	2,07±2,22*	6,35±2,89*	6,77±7,05*
29	4,92±5,05*	0,49±0,48*	0,49±1,15*	1,72±2,72*	4,98±2,75*	5,01±6,28*
30	2,70±2,18*	1,13±1,71*	1,23±2,11*	1,42±1,23*	3,89±2,49*	4,95±6,91*
31	3,78±2,82*	0,15±0,14*	1,68±2,72*	1,06±0,73*	3,20±1,70*	4,87±6,24*

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales 2, 3, 9 y 15.

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

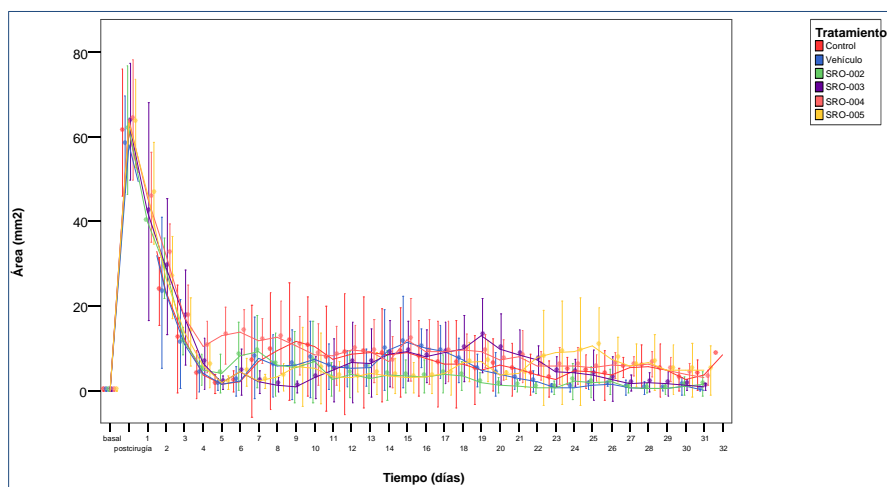


Figura 86. Evolución del área durante el estudio.

Tabla 58. Evolución de la reducción de las úlceras.

TIEMPO (DÍAS)	% DE REDUCCIÓN DE LA ÚLCERA					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
0 postcirugía	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
1	-----	-----	3,6±8,7	17,6±19,1*	28,5±6,1*	26,8±8,6*
2	61,6±6,3*	61,0±19,6*	52,3±10,6*	62,2±17,1*	48,9±7,3*	57,8±11,7*
3	79,0±12,3*	80,6±15,3*	79,6±8,6*	77,4±15,7*	72,8±8,3*	78,3±10,3*
4	94,1±7,1*	93,2±5,2*	90,9±7,5*	92,1±8,8*	83,5±7,7*	90,9±6,9*
5	97,5±2,3*	97,3±2,0*	93,1±7,2*	97,5±2,4*	80,3±6,4*	96,9±2,4*
6	96,5±2,9*	95,8±5,5*	86,8±10,6*	93,3±7,3*	78,3±5,6*	93,1±4,1*
7	89,7±14,1*	86,0±15,2*	85,1±12,7*	96,8±3,8*	82,1±4,5*	96,5±2,3*
8	84,8±15,6*	89,1±11,7*	89,0±13,5*	97,9±2,5*	81,4±9,1*	95,0±3,9*
9	79,5±20,4*	88,7±13,3*	90,2±15,3*	98,4±1,9*	84,5±7,7*	90,7±14,1*
10	81,7±16,0*	85,6±15,1*	88,0±18,0*	94,0±9,7*	87,8±8,5*	91,2±12,7*
11	88,1±13,3*	89,4±9,2*	95,3±7,4*	90,4±14,3*	88,1±8,5*	93,9±6,2*
12	87,0±15,5*	90,4±7,2*	93,3±10,5*	88,1±16,1*	84,2±10,2*	94,6±5,4*
13	86,1±14,3*	90,5±5,7*	95,0±6,8*	88,7±13,1*	85,8±9,8*	92,8±7,9*
14	86,3±13,3*	83,8±11,4*	93,4±11,1*	86,5±9,9*	89,6±8,1*	92,6±8,1*
15	84,7±13,6*	80,7±12,7*	94,0±6,9*	84,3±12,4*	81,3±13,0*	93,6±7,0*
16	87,6±9,9*	82,8±4,5*	94,2±7,1*	87,3±8,6*	85,9±9,9*	93,2±7,4*
17	90,5±10,9*	83,8±9,2*	93,6±6,7*	85,9±10,3*	85,7±9,0*	92,0±9,3*
18	90,7±11,2*	87,1±7,9*	94,0±5,6*	85,9±10,0*	85,0±3,5*	87,7±8,9*
19	92,6±9,0*	91,2±5,9*	96,7±4,3*	80,5±10,8*	85,7±4,2*	87,5±9,4*
20	90,6±6,9*	92,7±7,2*	97,8±2,9*	85,8±10,4*	88,4±6,8*	93,9±2,2*
21	92,1±7,0*	94,6±3,9*	98,2±1,9*	87,5±7,5*	87,1±8,9*	94,7±4,9*

ESTUDIOS IN VIVO

22	93,8±6,0*	95,8±3,8*	99,1±1,5*	88,7±4,2*	90,6±4,7*	92,3±15,3*
23	95,5±5,0*	98,6±1,6*	99,1±1,9*	92,5±5,3*	90,8±5,4*	90,7±16,7*
24	92,5±3,3*	98,4±1,7*	97,0±5,0*	93,3±4,0*	91,0±5,4*	90,6±17,4*
25	92,9±4,5*	97,4±1,7*	97,5±4,3*	95,2±6,3*	91,6±3,7*	86,1±13,4*
26	94,6±6,3*	97,1±0,7*	97,2±3,5*	96,5±5,5*	90,1±4,8*	89,8±7,9*
27	90,7±3,6*	98,7±2,3*	99,1±1,4*	97,2±2,2*	90,6±3,2*	92,0±8,0*
28	90,7±5,2*	99,0±1,9*	99,1±1,4*	96,8±2,8*	90,2±3,5*	91,9±9,2*
29	92,8±6,6*	99,2±0,7*	99,4±1,5*	97,7±2,9*	92,0±4,4*	94,6±8,1*
30	96,0±2,9*	98,2±2,9*	98,3±2,7*	97,8±1,8*	93,8±3,7*	94,9±8,8*
31	94,0±4,2*	99,7±0,2*	97,9±3,4*	98,0±1,6*	94,8±2,6*	94,8±8,0*

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

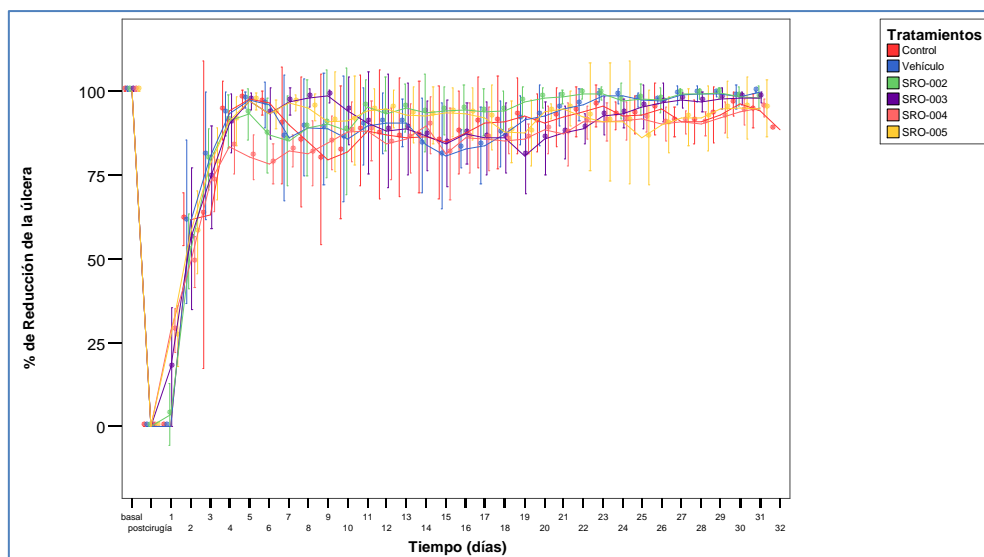


Figura 87. Evolución de la reducción de las úlceras.

Evolución del resto de parámetros corneales: grosor corneal y potencia corneal

Grosor corneal

Se observó un aumento significativo del grosor corneal en todos los grupos tras la cirugía que se mantuvo hasta el día 5 en todos los grupos excepto en el grupo V en el que se mantuvo el aumento del grosor corneal durante los 30 días de estudio. Este aumento de grosor es indicativo de un proceso inflamatorio de la córnea. El grosor corneal es significativamente mayor en el grupo V que en el resto de los grupos durante el desarrollo del estudio.

Tabla 59. Evolución del grosor corneal.

Tiempo (días)	Grosor Corneal (MICRAS)					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Basal	410,6±28,1	399,8±33,7	403,0±25,2	436,1±34,9	423,0±15,4	398,0±11,1
0 postcirugía	411,4±47,2	409,6±7,2	412,0±22,1	433,0±42,0	377,8±30,3	392,2±20,1
1	-----	-----	587,0±0,00*	560,0±108,1*	680,8±64,4*†	597,2±125,7*
2	569,2±113,6*	600,4±68,0*	629,7±68,3*	670,3±128,4*	659,8±68,0*	688,8±69,3*
3	567,7±121,6*	556,6±90,8*	573,7±111,3*	605,0±132,0*	703,5±40,1*†	613,8±60,3*
4	438,6±52,8	465,2±133,1*	516,7±103,8*	540,8±155,2*	613,3±129,9*†	530,2±104,7*
5	383,2±48,7	378,4±98,9	443,7±60,8	477,4±155,6	638,0±89,5*†	406,0±88,8
6	350,6±14,9	370,8±54,2	405,2±58,5	390,3±68,4	663,2±77,5*†	379,8±36,8
7	415,0±123,3	421,8±118,5	447,7±72,6	382,5±61,1	659,8±91,7*†	395,5±33,1
8	405,4±98,5	423,2±130,3	437,0±93,8	396,3±48,7	616,5±132,1*†	388,5±28,1
9	444,2±119,5	442,4±135,5	408,0±55,8	388,7±68,3	575,2±125,5*†	434,3±97,3
10	439,2±92,2	418,0±91,7	430,7±88,1	422,8±54,3	575,0±126,1*†	462,5±108,5
11	475,0±83,4	428,6±85,1	425,0±47,0	454,3±59,3	596,3±107,9*†	446,3±75,3
12	426,4±96,5	441,8±62,5	453,0±77,1	450,3±82,3	559,0±108,7*†	411,3±46,9
13	444,8±81,3	452,6±106,0	447,3±55,6	496,3±90,9	549,3±105,9*†	432,3±83,1
14	447,2±84,4	487,6±69,2	437,5±55,0	532,8±127,8	591,0±99,7*†	476,6±131,5

ESTUDIOS IN VIVO

15	444,4±106,2	548,0±62,3*	475,8±75,5	512,8±113,6	570,3±114,5*†	446,3±126,2
16	455,4±72,97	516,4±49,3*	466,2±76,4	500,3±90,9	572,3±102,1*†	431,7±81,2
17	457,2±96,8	523,2±126,9*	466,5±86,0	532,3±90,5	629,5±174,9*†	451,4±77,4
18	440,4±72,5	461,0±55,7	464,2±69,9	561,5±109,2	601,0±89,5*†	445,4±75,5
19	397,0±36,0	466,0±81,1	481,7±83,0	566,3±133,3	600,2±108,5*†	414,3±77,5
20	408,2±88,8	471,2±110,6	457,0±77,7	552,3±80,9	627,5±124,1*†	467,7±68,5
21	473,2±111,9	487,0±127,4	441,0±47,8	524,8±59,3	635,0±150,6*†	449,8±35,8
22	429,0±63,3	485,2±142,8	463,3±70,2	505,5±57,6	598,2±141,7*†	482,1±77,5
23	416,8±47,6	486,2±117,9	460,3±82,5	528,7±78,7	621,3±130,6*†	486,4±68,3
24	457,8±65,1	470,8±127,6	464,8±54,7	521,7±143,6	612,2±161,4*†	459,5±54,2
25	426,2±48,6	454,0±136,3	465,3±60,6	504,5±102,4	590,7±146,8*†	485,0±89,5
26	435,0±64,2	440,2±105,7	470,6±87,5	500,8±89,9	556,5±137,6*†	464,3±36,4
27	427,0±45,6	456,6±118,0	474,1±79,0	473,5±65,8	626,7±165,1*†	459,6±41,1
28	422,6±50,9	484,4±132,1	463,7±72,8	472,0±83,2	646,7±147,5*†	466,3±35,0
29	423,2±66,8	449,2±118,0	443,0±85,5	470,8±96,4	630,3±153,4*†	449,7±48,4
30	444,2±71,9	473,2±138,9	456,8±85,5	475,8±89,9	608,7±172,5*†	457,6±50,3
31	427,2±53,1	451,8±129,2	457,0±94,0	458,3±65,7	611,7±197,5*†	432,1±37,2

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto al resto de los grupos de estudio.

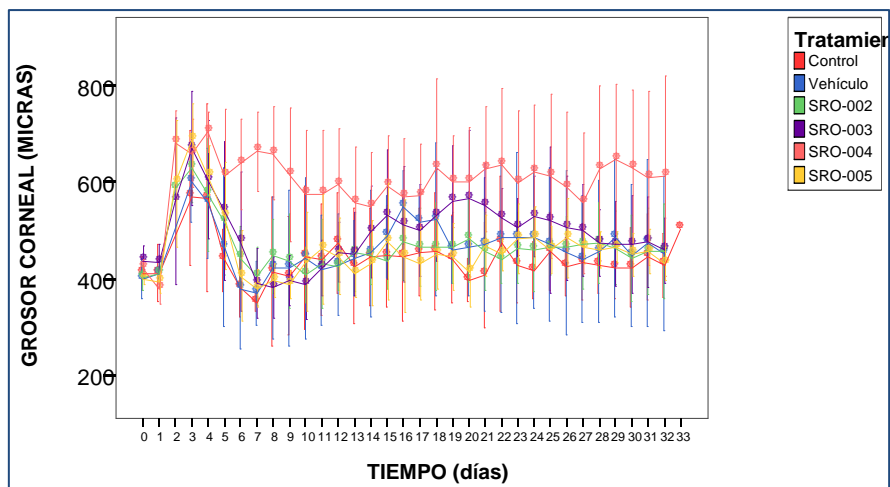


Figura 88. Evolución del grosor corneal.

Potencia corneal

Se observó un aumento significativo de la potencia corneal en los grupos I, II y III al segundo día tras la cirugía que revirtió al tercer día en en los grupos I y III y al cuarto día en el grupo II. El resto del estudio este parámetro se mantuvo dentro de valores normales en todos los grupos.

Tabla 60. Evolución de la potencia corneal.

Tiempo (días)	Potencia Corneal (dioptrías)					
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Basal	44,89±2,05	44,37±1,01	44,46±1,55	43,43±1,84	43,52±1,80	44,01±1,62
0 postcirugía	42,99±1,59	43,47±2,27	43,19±1,80	41,84±2,49	41,14±1,36	42,71±2,39
1	-----	-----	41,56±0,00	44,34±2,69	47,65±1,37	44,61±3,41
2	54,70±8,62*†	47,98±5,42*	49,09±5,29*	44,75±3,86	45,70±4,22	46,27±2,67
3	45,61±3,20	48,76±6,34*	46,40±3,62	45,72±4,38	45,54±1,91	46,93±5,51
4	45,87±3,49	42,78±3,11	44,86±3,03	42,30±5,61	41,99±1,35	44,78±5,44
5	47,79±4,66	45,72±2,13	43,51±1,81	44,53±3,57	41,35±3,16	43,68±2,96
6	44,44±3,34	43,98±1,22	43,80±2,85	42,63±4,58	43,41±7,25	42,94±2,82

ESTUDIOS IN VIVO

7	44,80±1,75	44,17±4,26	43,91±2,28	41,93±2,73	41,93±3,54	43,33±3,40
8	45,37±2,45	46,16±3,61	45,64±4,77	42,45±3,11	41,05±3,39	42,27±2,36
9	45,97±5,32	45,12±5,87	44,64±5,09	41,80±1,81	40,82±1,67	41,72±3,24
10	43,57±2,04	44,76±3,02	42,14±1,92	43,12±3,45	43,97±2,96	43,11±3,12
11	45,39±3,88	42,63±2,95	43,61±2,46	43,29±2,34	41,60±3,66	43,51±4,73
12	42,86±2,73	43,62±1,69	43,16±3,71	42,64±4,10	42,41±4,37	41,37±2,51
13	43,91±3,04	41,61±2,68	42,47±1,94	41,07±3,29	41,93±3,27	42,20±4,22
14	43,76±2,16	40,50±1,19	43,12±1,66	43,38±5,35	40,18±2,39	43,12±3,44
15	44,26±4,69	45,05±5,33	43,46±2,23	43,35±3,85	42,50±2,41	44,68±3,47
16	45,23±3,24	44,54±1,91	44,42±1,61	43,39±2,68	41,97±2,88	43,08±2,31
17	43,52±2,51	42,27±2,56	44,58±2,09	45,64±5,85	40,71±2,35	43,23±4,48
18	42,65±3,80	44,91±3,13	42,90±1,66	44,09±2,02	42,45±3,27	42,69±4,67
19	44,65±4,45	42,15±3,73	45,31±2,51	41,58±3,31	43,43±4,45	42,17±1,41
20	41,81±0,75	42,54±2,34	42,77±1,68	42,44±4,29	44,21±3,73	42,18±3,93
21	42,26±3,01	43,67±4,03	42,17±1,45	43,01±3,34	42,58±2,35	41,75±3,02
22	46,33±3,91	43,35±2,16	43,50±1,59	42,99±0,80	42,64±1,23	41,09±2,80
23	42,84±1,63	42,21±1,89	41,08±2,12	40,88±1,85	41,79±2,13	43,17±2,84
24	43,33±1,19	42,49±2,77	42,24±1,84	41,76±3,00	39,85±3,24	42,99±3,98
25	43,37±1,31	43,36±1,71	43,43±3,23	41,91±2,85	40,07±2,18	43,73±3,33
26	42,98±2,82	42,72±2,66	41,92±2,58	43,43±3,28	41,24±2,60	41,13±2,22
27	42,92±1,97	42,10±2,08	43,51±2,07	40,73±2,39	41,70±1,83	42,49±2,32
28	44,30±1,79	43,19±1,91	42,58±1,85	41,46±1,99	41,49±1,58	42,04±1,67
29	43,27±1,76	41,93±0,77	43,10±2,46	41,35±1,91	40,94±2,86	41,43±2,43
30	43,54±1,54	42,00±2,37	41,56±1,38	41,35±3,17	40,61±2,30	41,58±3,54
31	44,23±1,96	43,06±2,58	41,85±1,17	41,35±2,31	41,36±1,55	40,86±1,84

* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto al resto de los grupos de estudio.

Evaluación histopatológica

Resultados histológicos por grupos: los promedios de los valores obtenidos para los parámetros estudiados en los diferentes grupos se recogen en la tabla 61.

Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo V y el resto de los grupos en las valoraciones asignadas a la profundidad de úlcera/fibrosis y a la pérdida de colágeno, y diferencias estadísticamente significativas en el grado de epitelización del grupo II con el resto de los grupos.

Tabla 61. Resultados del estudio histológico. MEDIAS DE LOS GRUPOS.

GRUPOS DE ESTUDIO						
	Grupo I (Control)	Grupo II (vehículo)	Grupo III (SRO-002)	Grupo IV (SRO-003)	Grupo V (SRO-004)	Grupo VI (SRO-005)
Grado de epitelización	3,8±1,6	3,2±2,0†	4,6±0,8	4,6±0,5	4,0±1,5	4,3±1,2
Pérdida queratinocitos	2,2±1,9	1,8±1,6	4,0±1,7	2,2±1,6	1,5±0,5	2,8±1,5
Profundidad úlcera/fibrosis	0,6±0,5	0,8±0,8	1,2±0,9	1,0±0,6	2,3±0,5†	1,0±0,6
Infiltrado inflamatorio	0,6±0,5	1,0±1,2	0,7±1,2	0,7±0,8	1,8±0,9	0,3±0,5
Pérdida de colágeno	0,8±0,4	2,2±0,8	1,5±0,8	1,2±0,7	2,3±0,5†	1,0±0,6
Presencia hialina	0,4±0,9	1,8±1,3	0,7±1,2	1,0±1,3	0,7±1,2	0,5±0,5
Grado de apoptosis	0,0±0,0	0,6±1,3	0,0±0,0	0,3±0,8	0,0±0,0	0,0±0,0
Presencia fibras nerviosas	0,0±0,0	0,2±0,4	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,2±0,4
Presencia vasos	0,0±0,0	0,6±1,3	1,0±1,5	0,0±0,0	0,5±1,2	0,3±0,8
Membrana de Descemet	0,2±0,4	0,4±0,5	0,0±0,0	0,2±0,4	0,7±0,8	0,2±0,4

† Diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de los grupos.

ESTUDIOS IN VIVO

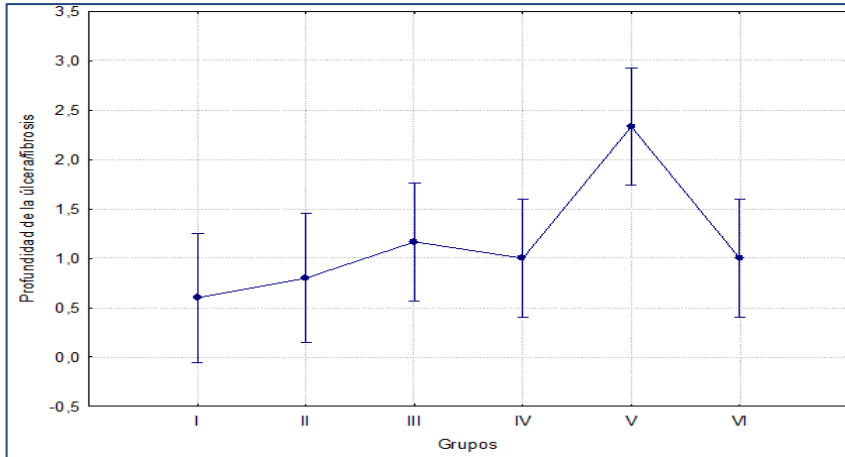


Figura 89. Puntuación de la relación entre profundidad de la úlcera/fibrosis.

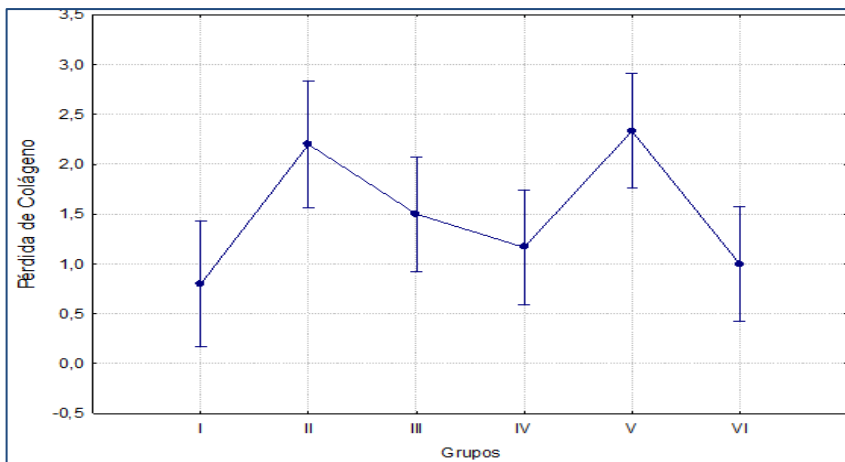


Figura 90. Puntuación asignada al grado de pérdida de colágeno.

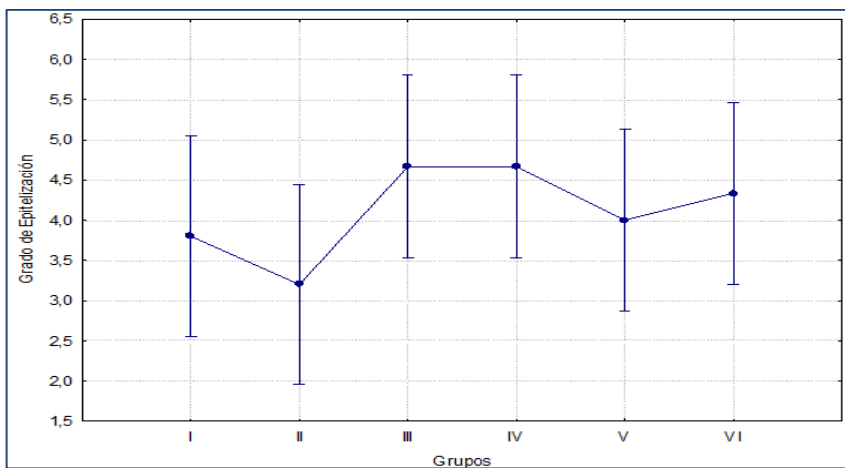


Figura 91. Grado de epitelización en los grupos de estudio.

Resultados histológicos del Grupo I (control)

En el grupo I, el promedio en el grado de epitelización es 3,8 ya que, en los animales 5 y 21, la ulceración es importante aunque en el resto de los animales esta no se observa. Sin embargo, el número de queratinocitos en el epitelio es bajo (promedio de 2,2), excepto en el animal 24, donde está prácticamente completo. La profundidad de la úlcera o la presencia de fibrosis bajo el epitelio son leves, apareciendo en tres de los 5 animales estudiados. El infiltrado inflamatorio también es escaso, constituido sobre todo por neutrófilos polimorfonucleares. Por otro lado, la pérdida de colágeno, aunque pequeña, aparece en 4 de los 5 animales del grupo, coincidiendo en un caso con el aumento de la sustancia hialina. En ninguno de los animales de este grupo se observa apoptosis celular, presencia de fibras nerviosas o vasos en el estroma y sólo en el animal 22 aparece un engrosamiento de la membrana de Descemet en el área afectada.

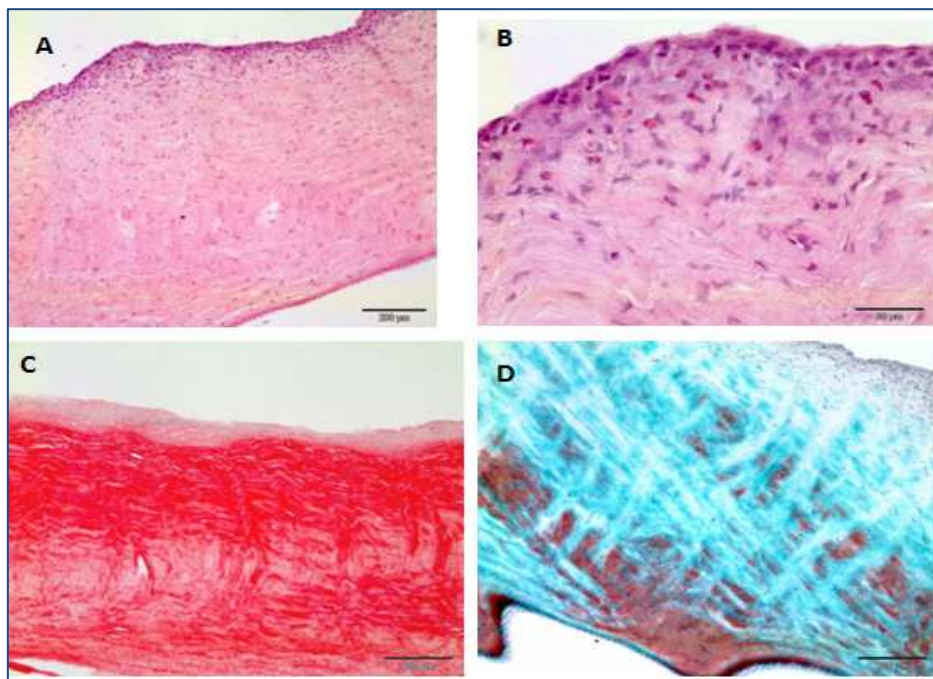


Figura 92. Animal 21: grupo 1 (control sin tratamiento). A y B: HE; C Rojo Sirio; D: TCM.

Presencia de ulceración del epitelio corneal junto con un infiltrado inflamatorio de neutrófilos polimorfonucleares. Con rojo sirio se observa una disminución del colágeno en las áreas donde luego aparece presencia de sustancia hialina (roja con el TCM).

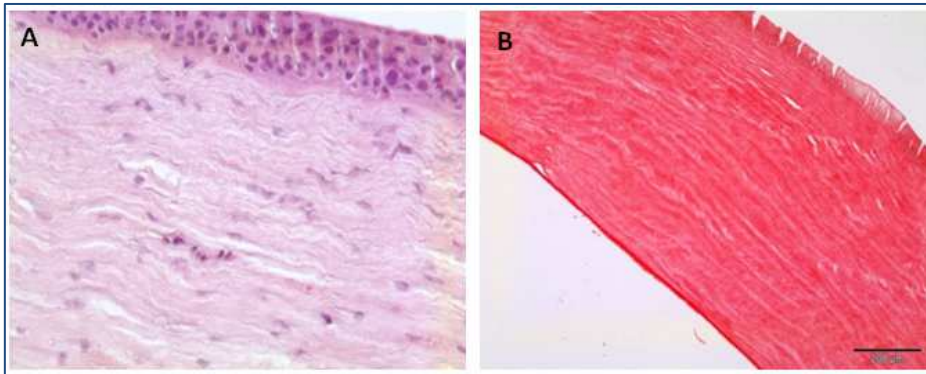


Figura 93. Animal 23: grupo I (control sin tratamiento). A: HE; B: Rojo Sirio.

En este animal, la córnea tan sólo presenta un ligero infiltrado inflamatorio en el estroma.

Resultados histológicos del Grupo II (vehículo)

Es en este grupo es donde la ulceración es más marcada ya que en dos animales ocupa la mayor parte de la córnea y en otro, también aparece. Por esto, el promedio es el más bajo de todos los grupos estudiados. También el número de queratinocitos es pequeño incluso en los animales en los que no existe úlcera, pasando de 5 a 6 que serían el número existentes en una córnea normal a 2-3 en estas córneas. En el animal 28, donde la ulceración es mayor, la profundidad de ésta se encuentra entre el 25 y 50% del espesor de la córnea con un infiltrado inflamatorio abundante y una presencia de vasos en el estroma severos. En todos los animales de este grupo se observa una pérdida de colágeno puesta de manifiesto mediante la tinción de rojo sirio, siendo severa en dos casos, moderada en otros dos y sólo leve en uno. Esta pérdida se acompaña de su sustitución por sustancia hialina prácticamente en el mismo grado. Una apoptosis severa se observa en el animal 25 junto con un engrosamiento de la membrana de Descemet.

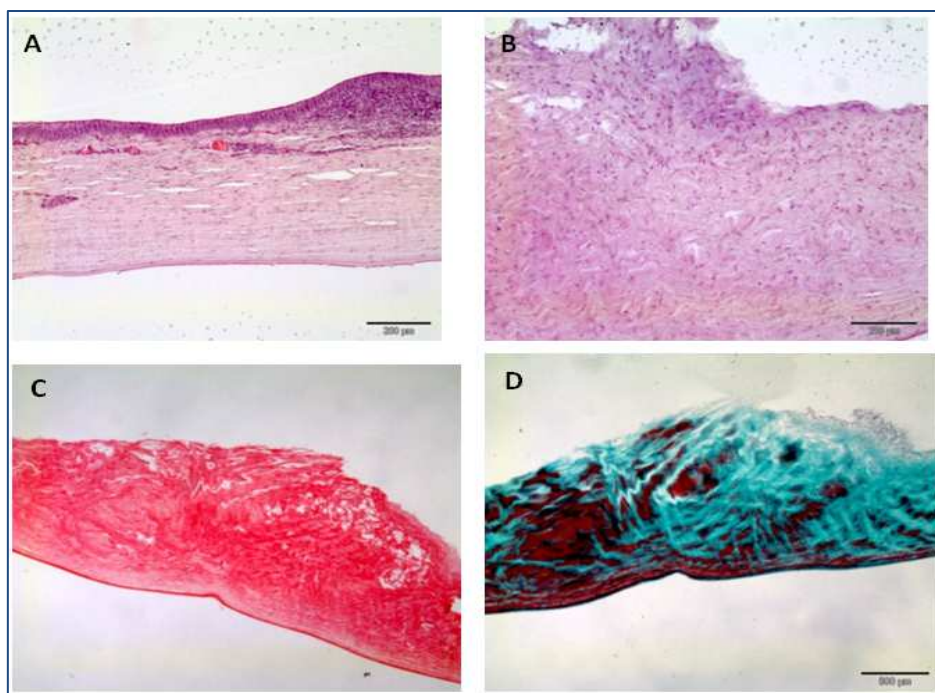


Figura 94. Animal 28: grupo II (control y vehículo). A y B: HE; C Rojo Sirio; D: TCM.

Este es el animal cuya córnea presenta el mayor grado de lesión, con una severa ulceración del epitelio acompañada por un infiltrado inflamatorio, presencia de vasos en el estroma y engrosamiento de la membrana de Descemet. Además, en las imágenes C y D tomadas en el mismo campo se observa la sustitución del colágeno por la sustancia hialina.

Resultados histológicos del Grupo III (tratamiento SRO-002)

En este grupo, el promedio de grado de epitelización es elevado (4,6) y la pérdida de queratinocitos escasa (promedio de 4 queratinocitos en el epitelio corneal). Sólo uno de los animales presenta ulceración en el epitelio (animal 6), donde también se observa una reducción en el número de queratinocitos. Sin embargo, la profundidad de la úlcera y la fibrosis es escasa y no se observa infiltrado inflamatorio. En el animal 30, aunque no presenta ulceración y el número de queratinocitos es mayor, la presencia de tejido fibroso bajo la úlcera es más importante, así como el infiltrado inflamatorio y la pérdida de colágeno. Son precisamente en estos dos animales números 30 y 6 donde se observan las mayores pérdidas del colágeno con sustitución por sustancia hialina en el caso del animal 6 y presencia de vasos en el estroma en el animal 30. En el resto de los animales todos los parámetros estudiados son normales o levemente alterados.

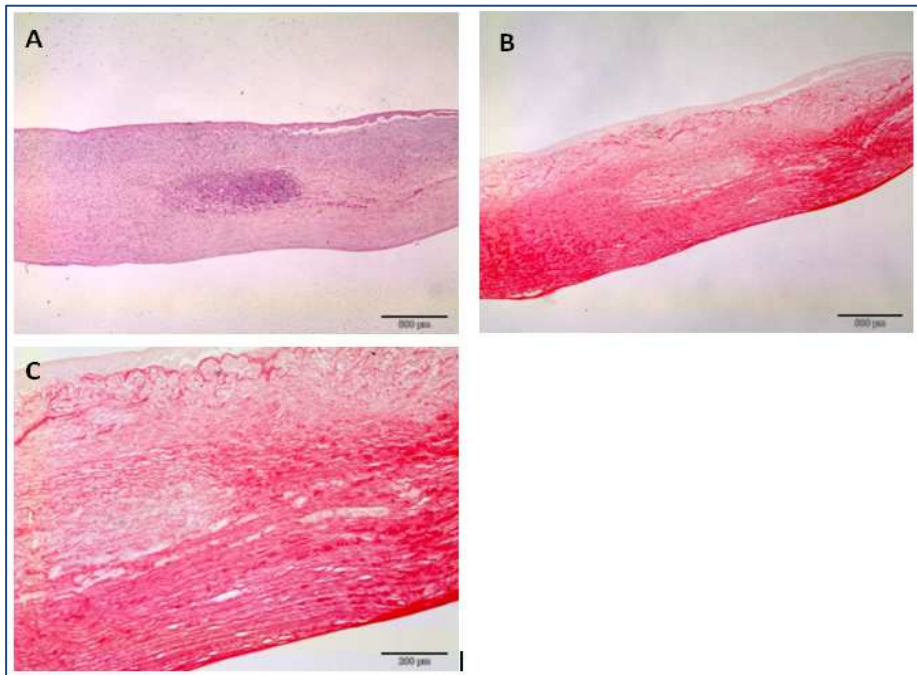


Figura 95. Animal 30: grupo III (SRO-002). A: HE; B y C: Rojo Sirio.

En este animal se observa un infiltrado inflamatorio de tipo granulomatoso junto con presencia de vasos y pérdida del colágeno en el estroma.

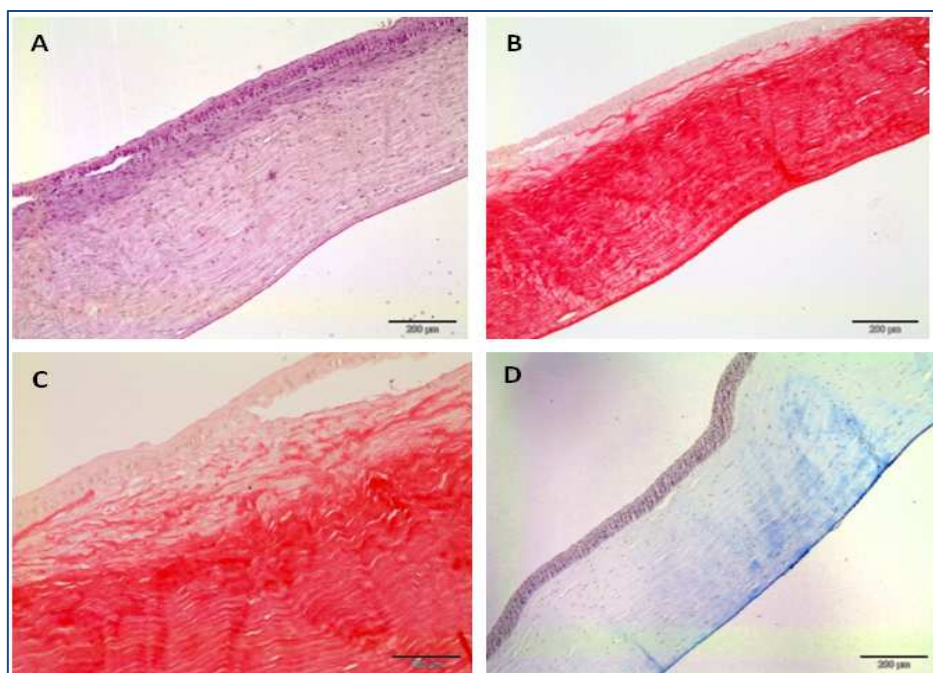


Figura 96. Animal 31: grupo III (SRO-002). A: HE; B y C: Rojo Sirio; D: TCM.

Este es el animal más representativo del grupo III, sin presencia de ulceración en el epitelio, con escasa pérdida de queratinocitos, poca fibrosis, infiltrado inflamatorio o pérdida de colágeno y siempre a nivel superficial.

Resultados histológicos del Grupo IV (tratamiento SRO-003)

En este grupo, el promedio de ulceración es también bajo (4,6), aunque la pérdida de queratinocitos es algo más elevada (promedio de 2,1) que en el anterior grupo. Sin embargo, en el resto de los parámetros, el grado de lesión corneal es leve o moderado, destacando solamente la moderada fibrosis e infiltrado inflamatorio en el animal 13 y la también moderada pérdida de colágeno y presencia de sustancia hialina en el animal 35. En el animal 1, la pérdida de colágeno es moderada y el aumento de la sustancia hialina severo. En el animal 8 se observa un aumento en el grado de apoptosis de las células del estroma.

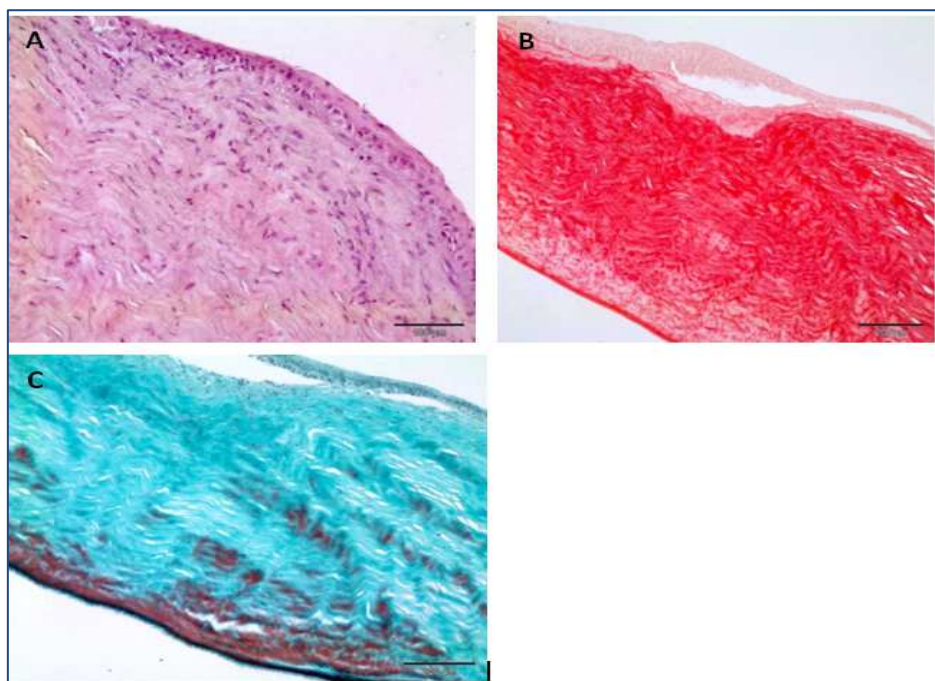


Figura 97. Animal 35: grupo IV (SRO-003). A: HE; B: Rojo Sirio; C: TCM.

Ligero infiltrado inflamatorio y fibrosis en la zona superficial. En las zonas donde existe mayor fibrosis, el epitelio aparece despegado. Moderada pérdida de colágeno en la zona cercana a la membrana de Descemet que se corresponde con el aumento de la sustancia hialina en esa misma zona.

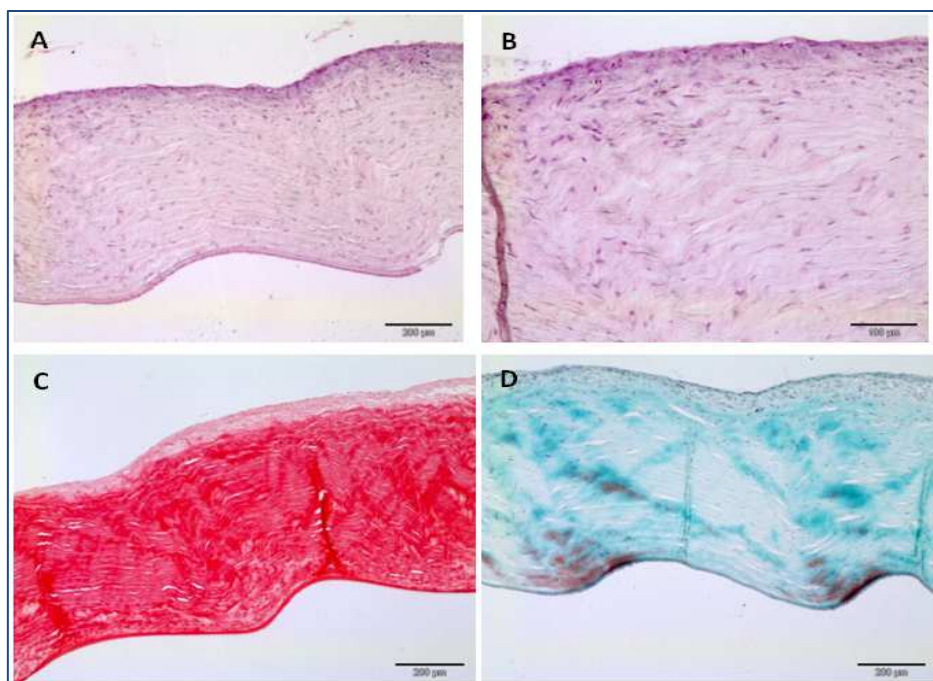


Figura 98. Animal 38: grupo IV (SRO-003). A y B: HE; C: Rojo Sirio; D: TCM.

En este animal, excepto una pequeña ulceración del epitelio, todos los demás parámetros estudiados se han alterado levemente o son normales.

Resultados histológicos del Grupo V (tratamiento SRO-004)

De todos los grupos en los que se ha aplicado un tratamiento, este es el que presenta los mayores grados de lesión, con promedios ligeramente más altos para la ulceración pero reducción importante en el número de queratinocitos. También fueron mayores el grado de profundidad de las úlceras y la fibrosis, el infiltrado inflamatorio, la pérdida de colágeno e incluso, alteraciones en la membrana de Descemet, que aparecen en 3 de los 6 animales estudiados. Los animales 7 y 12 son los que presentan las úlceras de mayor tamaño mientras que son el 7 y el 11 donde las úlceras o la fibrosis son más profundas y el infiltrado inflamatorio más severo. La pérdida de colágeno es moderada o severa en todos los animales de este grupo y la presencia de sustancia hialina es marcada en el animal 19.

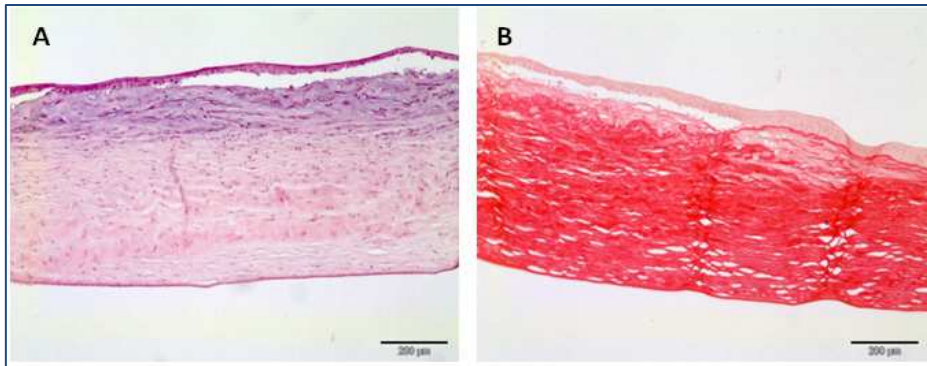


Figura 99. Animal 4: grupo V (SRO-004). A: HE; B: Rojo Sirio.

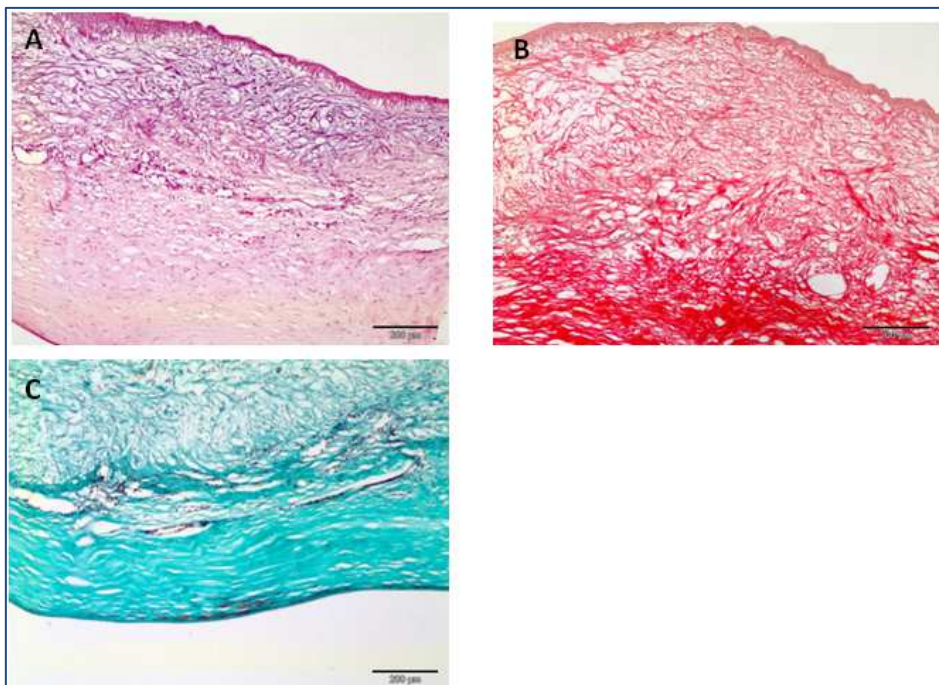


Figura 100. Animal 11: grupo V (SRO-004). A: HE, B: Rojo Sirio; C: TCM.

La pérdida significativa en el número de queratinocitos (A) se asocia a una fibrosis moderada bajo el epitelio y una pérdida de colágeno en esa misma zona.

Aunque el epitelio de la córnea se mantiene, la fibrosis es severa, junto con un infiltrado inflamatorio y presencia de vasos también severos. La pérdida de colágeno es manifiesta (B) aunque en este caso, no se ha sustituido por sustancia hialina (C).

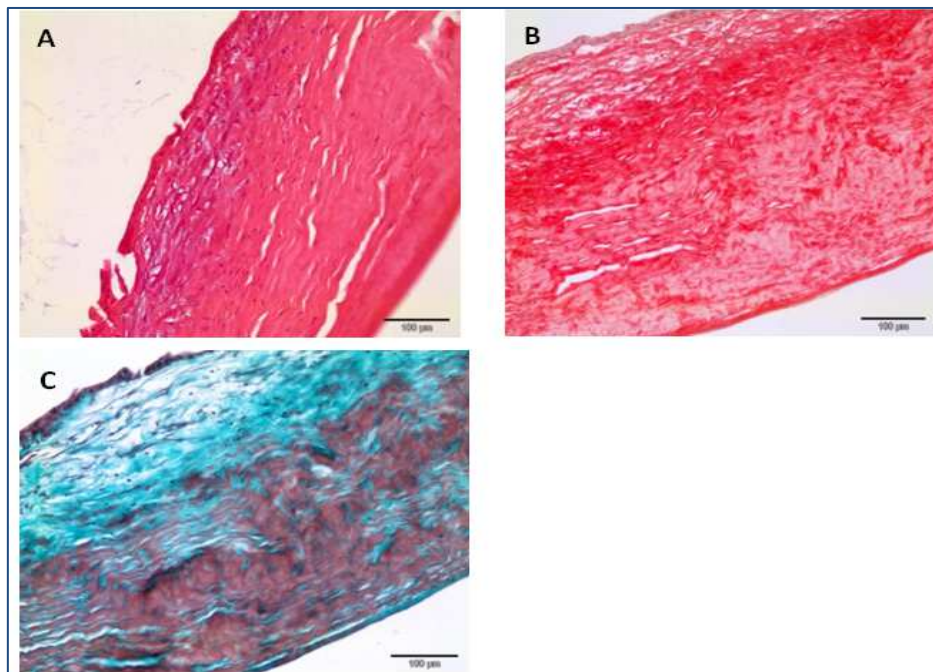


Figura 101. Animal 19. A: HE; B: Rojo Sirio; C: TCM.

El epitelio no aparece ulcerado aunque el número de queratinocitos está claramente disminuido. En las imágenes se observa una disminución del colágeno y su sustitución por sustancia hialina.

Resultados histológicos del Grupo VI

En este grupo, se observa ulceración del epitelio en 2 de los 6 animales estudiados, aunque sólo en uno, el animal 37, es más marcada. El promedio en el número de queratinocitos es superior al del grupo IV en el que la presencia de ulceración fue menor. En el resto de los animales, todos los grados de lesiones fueron leves con la excepción de un moderado aumento en el número de vasos en el estroma del animal 20. Sin embargo, de nuevo sólo en el animal 37, la profundidad de la fibrosis bajo el epitelio fue moderada junto con la pérdida de colágeno y una leve presencia de sustancia hialina.

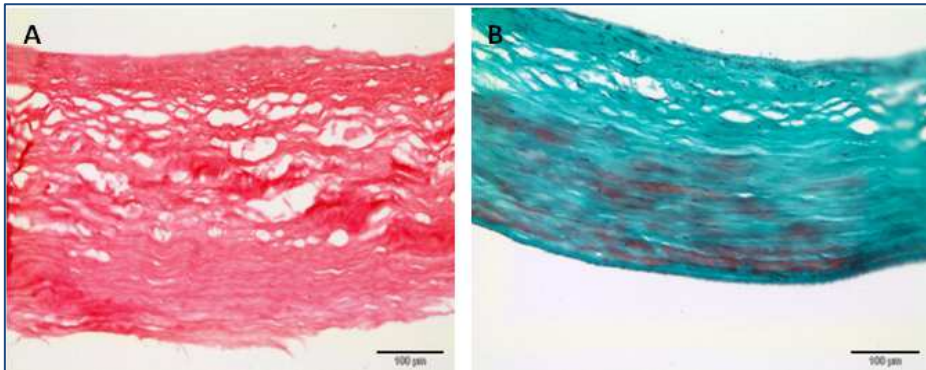


Figura 102. Animal 37: grupo VI (SRO-005). A: Rojo Sirio; B: TCM

En la zona donde el epitelio está ulcerado se observa una disminución de la presencia de colágeno y un ligero aumento de la sustancia hialina en esa misma zona.

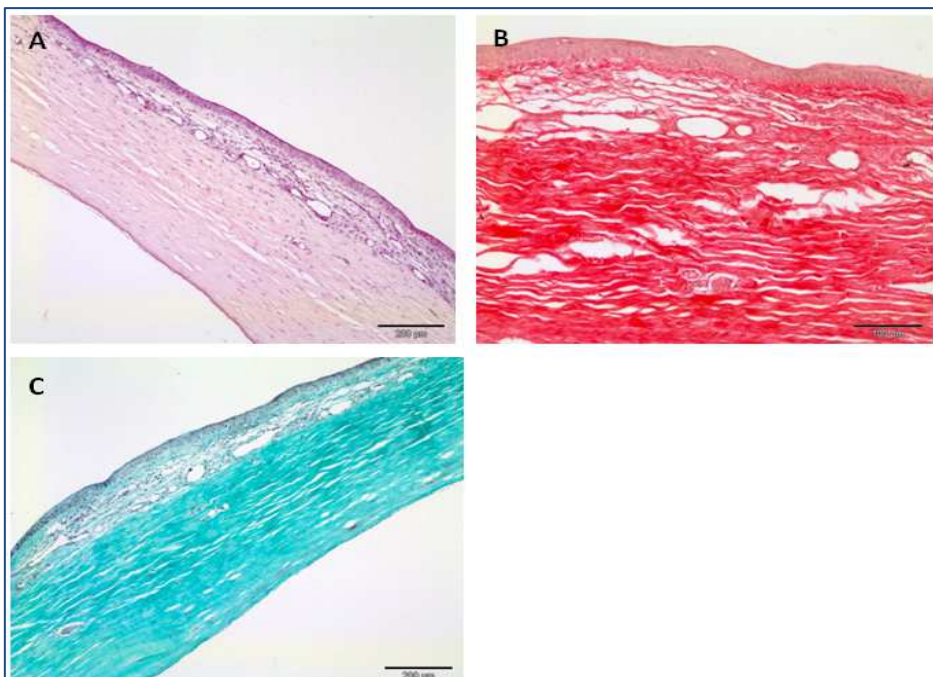


Figura 103. Animal 20: grupo VI (SRO-005). A: HE; B: Rojo Sirio; C: TCM

Se observa un aumento en el número de vasos en el estroma corneal con una fibrosis y una pérdida de colágeno leves.

Tabla 62. Valores individuales de los Grupos I y II.

Animales	GRUPO I (control)						GRUPO II (control y vehículo)					
	5	21	22	23	24	Media	25	26	27	28	29	Media
Grado de epitelización	2	2	5	5	5	4	5	1	5	1	4	3,2
Pérdida queratinocitos	0	1	2	3	5	2,2	3	0	3	0	3	1,8
Profundidad úlcera/fibrosis	1	1	1	0	0	0,6	0	1	0	2	1	0,8
Infiltrado inflamatorio	1	1	0	1	0	0,6	1	0	0	3	1	1
Pérdida colágeno	1	1	1	0	1	0,8	2	3	1	3	2	2,2
Presencia hialina	0	2	0	0	0	0,4	2	3	1	3	0	1,8
Grado de apoptosis	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0,6
Presencia fibras nerviosas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,2
Presencia vasos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0,6
Membrana de Descemet	0	0	1	0	0	0,2	1	1	0	0	0	0,4

Tabla 63. Valores individuales de los Grupos III y IV

Animales	GRUPO III (SRO-002)							GRUPO IV (SRO-003)						
	30	31	32	33	34	6	Media	35	36	38	1	13	8	Media
Grado de epitelización	5	5	5	5	5	3	4,6	5	5	4	5	4	5	4,6
Pérdida queratinocitos	3	5	5	5	5	1	4	3	1	1	2	1	5	2,1
Profundidad úlcera/fibrosis	3	1	1	1	0	1	1,16	1	1	1	1	2	0	1
Infiltrado inflamatorio	3	1	0	0	0	0	0,6	1	0	1	0	2	0	0,6
Pérdida colágeno	3	1	1	1	1	2	1,5	2	1	1	2	1	0	1,1
Presencia hialina	0	0	1	0	0	3	0,6	2	0	1	3	0	0	1
Grado de apoptosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,3
Presencia fibras nerviosas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia vasos	3	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0
Membrana de Descemet	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,1

Tabla 64. Valores individuales de los Grupos V y VI.

Animales	GRUPO V (SRO-004)							GRUPO VI (SRO-005)						
	4	7	10	11	12	19	Media	14	16	17	18	20	37	Media
Grado de epitelización	5	2	5	5	2	5	4	5	4	5	5	5	2	4,3
Pérdida queratinocitos	2	1	2	2	1	1	1,5	4	2	5	2	3	1	2,8
Profundidad úlcera/fibrosis	2	3	2	3	2	2	2,3	1	1	0	1	1	2	1
Infiltrado inflamatorio	1	3	1	3	2	1	1,8	0*	1	0	0*	0	1	0,3
Pérdida colágeno	2	2	2	3	2	3	2,3	1	1	0	1	1	2	1
Presencia hialina	0	0	0	1	0	3	0,6	1	1	0	0	0	1	0,5
Grado de apoptosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Presencia fibras nerviosas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,1
Presencia vasos	0	0	0	3	0	0	0,5	0*	0	0	0*	2	0	0,3
Membrana de Descemet	1	1	0	2	0	0	0,6	1	0	0	0	0	0	0,1

Referencias bibliográficas

Ver capítulo 7.- de bibliografía [48,49,50,51,52].

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

6.1. Estudio código SIF 109-1

Este estudio ha sido realizado en modelo ratón diabético y la administración de los productos se ha realizado vía subcutánea, para el tratamiento de úlceras diabéticas.

Los productos de estudio han sido heparina, bemiparina y dos derivados nitrados de heparina y bemiparina respectivamente.

Los resultados obtenidos con los 4 tratamientos farmacológicos tanto de la evolución de la herida por medición de su área, como del estado histológico de la piel el último día del estudio, muestran que la reducción de las heridas es significativo ($p < 0,05$) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera en los grupos 1-4, mientras que en el grupo 5 lo es a partir del día 3 Sin embargo, los grupos 1-4 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 90% a partir del día 18 mientras que el grupo 5 no.

El grupo 3 (Producto de ensayo 2: BP-116, Lote 21) muestra una mayor reducción del área de la herida y un menor tiempo necesario para ello respecto al resto de los grupos, sin embargo, este grupo fue el que presentó el mayor número de animales con un grado I de recuperación histológica y presentó mayor número de muestras con un infiltrado celular poco grueso o constituido mayoritariamente por células inflamatorias con menor recuperación del epitelio.

Por el contrario, el grupo 4 fue el que presentó el mayor número de animales con el grado de recuperación más elevado, el grado IV, observándose una re-epitelización muy avanzada en varias muestras y la formación de un tejido conjuntivo grueso y maduro debajo de este epitelio neoformado.

Por tanto se considera que el grupo 4: tratamiento con HO5106C-116 Lote 2, es el que muestra mejores resultados de reducción de la herida y de recuperación histológica del epitelio.

El comportamiento de este producto frente al resto podemos atribuirlo a las características de ser el producto nitrado en mayor proporción, lo que unido a su baja actividad anti Xa ha dado lugar a los mejores resultados de curación de las heridas.

CONCLUSIONES

6.2. Estudio código SIF 109-6

Este estudio ha sido realizado en modelo ratón diabético y la administración de los productos como en el estudio anterior, se ha realizado vía subcutánea, para el tratamiento de úlceras diabéticas.

Los productos de estudio han sido cuatro derivados nitrados de heparina.

Los resultados obtenidos con los 4 tratamientos farmacológicos, de la evolución de la herida por medición de su área, muestran que la reducción de las heridas es significativo ($p < 0,05$) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera en el grupo 3, a partir del día 10 para los grupos 1, 4 y 5 y a partir del día 14 para el grupo 2. El grupo 5 alcanza valores de reducción de las heridas superiores al 90% a partir del día 28, el grupo 3 a partir del día 31 mientras que el resto de los grupos grupo no consigue esta reducción hasta el día 35 tras la creación de la úlcera.

El grupo 3 (Producto de ensayo 2: HO5106C-116, Lote 2) y el grupo 5 (Producto de ensayo 4: HO854-116 Lote 41) muestran en menor tiempo una mayor reducción del área de la herida que el resto de los grupos. Sin embargo, el grupo 3 es el grupo donde se observa una mayor presencia de células inflamatorias en las muestras y también mayor cantidad de tejido de granulación en la dermis con menor recuperación del epitelio.

Los grupos 2 y 5 son los que presentan un mayor grado de recuperación histológica, aunque en todos los grupos es muy evidente la reducción de la lesión y la reepitelización de la úlcera.

Por tanto en conjunto el grupo 5: producto de ensayo 4, HO854-116 Lote 41, es el que muestra mejores resultados de reducción de la herida y de recuperación histológica del epitelio.

Dentro del grupo de compuestos estudiado, el comportamiento de este producto frente al resto podemos atribuirlo a la combinación del grado de nitración, con el peso molecular y la baja actividad anti Xa, características que han dado lugar a los mejores resultados de curación de las heridas.

6.3. Estudio SIF 109-7

Este estudio ha sido realizado en modelo ratón diabético y la administración de los productos se ha realizado vía tópica, para el tratamiento de úlceras diabéticas.

El grupo de productos de estudio ha estado formado por un producto registrado, un vehículo de administración y dos derivados nitrados de heparina.

Los resultados obtenidos, tras evaluar la actividad terapéutica de 4 tratamientos farmacológicos, tanto de la evolución de la herida por medición de su área como del estado histológico de la piel el último día del estudio, muestran que la reducción de las heridas es significativo ($p < 0,05$) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera en todos los grupos 1-5.

Se observa que los grupos 1, 2, 4, y 5 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 60% a partir del día 8 mientras que esta reducción no se observa a este tiempo en el grupo 3.

El grupo 3 (Producto de ensayo 3: RG-003) muestra significativamente ($p < 0,05$) valores menores de reducción de úlcera a los días 8 y 10 del estudio. Los animales de este grupo mostraron sangre abundante durante los primeros 10 días tras la creación de la úlcera.

El estudio histológico revela que la recuperación se encuentra en un estadio más avanzado en los grupos 1 y 2, ya que el infiltrado inflamatorio está siendo sustituido por fibroblastos cada vez más maduros y matriz extracelular elaborada por estos.

Por tanto el grupo 1: tratamiento tópico con producto de ensayo RG-001, es el que muestra mejores resultados de reducción de la herida y de recuperación histológica del epitelio, con la mayor puntuación de Greenhalgh. Este producto se corresponde con el producto comercial, que debido a su composición, y sobretodo al principio activo, es el que dentro del comportamiento positivo del grupo haya destacado con los mejores resultados.

CONCLUSIONES

6.4. Estudio código SIF 210-1, Grupos de estudio I, II y III

Este estudio ha sido realizado en modelo cerdo diabético y la administración de los productos se ha realizado vía tópica, para el tratamiento de úlceras diabéticas, y en concreto úlceras cutáneas grado II.

El grupo de productos de estudio ha estado formado por bemiparina, un derivado nitrado de heparina y una heparina de muy bajo peso molecular.

Los resultados obtenidos mediante la evolución de la úlcera por medición de su área y porcentaje de reducción, no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento y el grupo control que evidencien una mayor rapidez de cierre de las mismas con respecto al grupo control.

Se observó un mayor porcentaje de contracción de las úlceras correspondientes al tratamiento ROV1107 a partir de los 63 días de tratamiento.

Las conclusiones que desde el punto de vista histológico se pueden obtener después del estudio de las muestras remitidas es que, aunque las lesiones son en la mayoría de los casos crónicas, en el grupo de tratamiento ROV1107 los procesos son ligeramente más agudos y por tanto están menos recuperados que el resto de los grupos tratados. La media de inflamación es superior y la de fibrosis y neovascularización son inferiores con respecto al control. También hay mayor número de muestras incluidas en el grado II de la clasificación de Greenhalgh y col.

El siguiente grupo menos recuperado es el tratado con ROV1106, aunque en este caso, los valores medios son inferiores a los del grupo control. Además, en este caso, aparecen granulomas de cuerpo extraño que, aunque también están presentes en los otros grupos, en este caso tienen un mayor tamaño.

Por último, el grupo tratado con ROV1105 es el más recuperado con los valores medios más bajos en inflamación, fibrosis y neovascularización.

El producto bemiparina se corresponde con el que da los mejores resultados en la curación de las úlceras.

6.5. Estudio código SIF 210-1, grupos VI y VII

Este estudio ha sido realizado en modelo cerdo diabético y la administración de los productos se ha realizado vía tópica, para el tratamiento en este caso de úlceras por quemadura.

El grupo de productos de estudio ha estado formado por bemiparina y un derivado nitrado de heparina.

Los resultados obtenidos con los 2 nuevos productos de ensayo, mediante la evolución de la úlcera por medición de su área y porcentaje de reducción, no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento y el grupo control que evidencien una mayor rapidez de cierre de las mismas con respecto al grupo control.

El estudio histológico de las muestras concluye que de todos los grupos estudiados, el que mejor valores promedio ha obtenido de epitelización y cicatrización es el tratamiento ROV1105. La mayoría de las úlceras tratadas con este tratamiento presentan un grado de epitelización que corresponde al grado V de Greenhalgh que es el grado donde la recuperación de la piel es más evidente. El siguiente grupo con menores lesiones es el tratamiento ROV1106 aunque con una mayor variabilidad en cuanto a la respuesta al tratamiento. Por último, el grupo control es el que presenta las lesiones más evidentes y los grados de Greenhalgh menores.

Es importante detallar que se han observado signos clínicos negativos en las úlceras tratadas con el tratamiento ROV1106: aparición de pequeñas ampollas de líquido seroso en 7 de las 12 úlceras y hematomas en la zona cicatricial de algunas 6 de las 12 úlceras. Las úlceras tratadas con el tratamiento ROV1105 no mostraron hematomas y 2 de ellas presentaron también las ampollas mencionadas, que también se observaron en 4 de las 6 úlceras no tratadas por lo que se considera que la aparición de estas ampollas no se debe al tratamiento con los productos de ensayo y se debe al fino espesor de la neoepidermis formada.

Por tanto el tratamiento ROV1105, es el que muestra mejores resultados de recuperación histológica de las úlceras.

El producto bemiparina, como en el estudio anterior, se corresponde con el que da los mejores resultados en la curación de las úlceras.

CONCLUSIONES

6.6. Estudio SIF 110-1

Este estudio ha sido realizado en modelo conejo diabético y la administración de los productos se ha realizado vía tópica, para el tratamiento en este caso de úlceras corneales.

El grupo de productos de estudio ha estado formado por bemiparina y tres derivados nitrados de heparina.

La administración de aloxano vía IV según la metodología descrita y la administración tópica de atropina, permitieron obtener un modelo de conejo diabético con patología ocular de ojo seco que permitió realizar la úlcera corneal en el modelo preclínico adecuado.

Los resultados obtenidos con los 5 tratamientos farmacológicos, mediante la evolución de la úlcera corneal por medición de su área y porcentaje de reducción, no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las medidas elevadas del grosor de la córnea durante los días de tratamiento del grupo V revelaron un fuerte componente inflamatorio en la córnea de los animales de este grupo (tratamiento SRO-004).

El estudio histológico de las muestras concluye que de todos los grupos estudiados en los que se ha administrado tratamiento, el que mejor valores promedio ha obtenido de epitelización y cicatrización es el grupo III (SRO-002) seguido por los grupos VI (SRO-005) y IV (SRO-003). El grupo V (SRO-004) presenta una menor ulceración del epitelio, pero sin embargo el resto de valores promedio son similares al grupo I y II (control y vehículo). El grupo II (vehículo) es el que presenta los mayores grados de lesión y el grupo V el que presenta un mayor grado de inflamación.

En cuanto a los valores promedio de los parámetros analizados, la ulceración está presente sobre todo en los grupos I y II. Sin embargo, el número de queratinocitos es menor en los grupos II y V. La fibrosis o a la profundidad de las úlceras es mayor en el grupo V junto con el infiltrado inflamatorio y la pérdida de colágeno. La apoptosis, presencia de fibras nerviosas, presencia de vasos en el estroma o alteraciones en la membrana de Descemet son hallazgos poco frecuentes en todos los grupos estudiados.

Por tanto, el grupo III: tratamiento SRO-004, es el que muestra mejores resultados de recuperación histológica del epitelio corneal.

En este estudio el producto que da los mejores resultados en la curación de las úlceras corneales se corresponde con un producto nitrado.

6.7. Conclusiones generales

Se han obtenido por hemisíntesis derivados de heparina sódica unidos covalentemente a grupos donadores de óxido nítrico, mediante dos estrategias de síntesis diferente sobre la sal de benzalconio de derivados de heparina sódica y heparina de bajo peso molecular:

- Reacción con ácido nítrico
- Reacción vía linker

El procedimiento de obtención de estos derivados permite modular el grado de sustitución, peso molecular medio, actividad anticoagulante, etc.

Los derivados obtenidos presentan una actividad anticoagulante minimizada con lo que se evita la aparición de efectos secundarios asociados tales como hemorragias, hematomas, etc.

Los compuestos obtenidos han mostrado:

- su capacidad para regenerar tejido ulcerado.
- su capacidad de reducción y de reepitelización de la úlcera, la cual varía no sólo con el grado de sustitución con grupos nitro de los compuestos sino también con el peso molecular medio de éstos y su actividad biológica.

Los diversos ensayos realizados sobre diversos modelos animales y con vías de administración diferentes, han mostrado su capacidad para la reducción de úlceras, aunque en varios de ellos no han mejorado significativamente los resultados obtenidos con bemiparina, heparina de bajo peso molecular.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- [1] Camblor-Santervás L, Meana-Infiesta A, Llana-Coto JM, Vaquero-Lorenzo F, Gómez-Llames S. Tratamiento de úlceras vasculares crónicas con equivalentes cutáneos obtenidos mediante ingeniería tisular. *Angiología* 55: 21-33, 2003.
- [2] Asociación Española de Enfermería Vascular y Heridas. Guía de práctica clínica: Consenso sobre úlceras vasculares y pie diabético. Segunda edición. Sevilla: <http://www.aeev.net/pdf/AEEV%2035%20calidad%20web.pdf>. 2014
- [3] Ramos S, Méndez E, Labat A, Peyré A, de Anda G. Úlceras de pierna: causas infrecuentes. *Rev Med Uruguay*; 17: 33-41, 2001.
- [4] Chan, R.K., et al., Effect of recombinant platelet-derived growth factor (Regranex) on wound closure in genetically diabetic mice. *J Burn Care Res.* 27: 202-205, 2006.
- [5] FDA announces new labeling changes for Regranex. FDA news June 6, 2008. <<http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2008/NEW01845.html>>.
- [6] Petrova, N. and M. Edmonds. Emerging drugs for diabetic foot ulcers. *Expert Opin Emerg Drugs*, 11: 709-724, 2006.
- [7] Kuo YR, Wang CT, Wang FS, Chiang YC, Wang CJ .Extracorporeal shockwave therapy enhanced wound healing via increasing topical blood perfusion and tissue regeneration in a rat model of STZ-induced diabetes. *Wound Repair Regen* 17: 522-530, 2009.
- [8] Wang CJ, Kuo YR, Wang FS, Wu RW, Liu RT, Hsu CS, Yang KD. Extracorporeal Shock Wave Treatment for Chronic Diabetic Foot Ulcers. *J Surg Res* 152: 96-103, 2009.
- [9] A.E. Salazar-Álvarez, L.F. Riera-del-Moral, M. García-Arranz, J. Álvarez-García , N.A. Concepción-Rodríguez y L. Riera-de-Cubas. Uso de plasma rico en plaquetas para cicatrización de úlceras crónicas de miembros inferiores. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. Elsevier España S.L., 2013.
- [10] CC Hardt, RB Conforti, R Garcia, A Garcia. Diabetic ulcers treated with autologous rich platelets plasma. *Med Cutan Iber Lat Am*; 43: 145-148, 2015.
- [11] A. Gámez Pérez. Advantages of preserved allogenic platelets in the treatment of ulcers of lower limbs. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* vol.29 no.1 Ciudad de la Habana ene.-mar, 2013.

BIBLIOGRAFÍA

- [12] N. Córdor Salazar, D. Padilla Morán. Manejo de úlceras crónicas con plasma rico en plaquetas. Serie de casos y revisión de literatura. *Dermatología* Vol. 19, Nº 1-4 Volumen 19 Nº 1-4 Sociedad ecuatoriana de dermatología, 2013.
- [13] Herse PR. A review of manifestations of diabetes mellitus in the anterior eye and cornea. *Am J Optom Physiol Opt* 65:224– 230, 1988.
- [14] Hatchell DL, Magolan JJ Jr, Besson MJ, Goldman AI, Pederson HJ, Schultz KJ. Damage to the epithelial basement membrane in the corneas of diabetic rabbits. *Arch Ophthalmol* 101: 469–471, 1983.
- [15] Schultz GS, Davis JB, Enferman RA. Growth factors and corneal epithelium. *Cornea*; 7:96-101, 1988.
- [16] Scardovi C, De Felipe GP, Gazzaniga A. Epidermal growth factor in the topical treatment of traumatic corneal ulcers. *Ophthalmologica*; 206:119-24, 1993.
- [17] López-García JS, García-Lozano I, Rivas I, Martínez-Garchitorena J - López-García JS, et al. Use of autologous serum in ophthalmic practice. *Arch soc esp oftalmol*; 82: 9-20, 2007.
- [18] V.J. Ortuño-Prados, J.L. Alio. Treatment of a neurotrophic corneal ulcer with solid platelet-rich plasma and Tutopatch® *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011;86:121-3 - DOI: 10.1016/j.oftal.2010.11.006. Vol.86. Núm. 4. Abril 2011.
- [19] Tsai R.J., Tseng S.C. Human allograft limbal transplantation of corneal surface reconstruction. *Cornea*.; 13:389-400, 1994.
- [20] K. Fernández García, LY Bonet Hernández, U Rodríguez de Paz, Z. Gómez Castillo, M. Jareño Ochoa, P. Andújar Caba. Amniotic membrane as a therapeutic option for the ocular surface. *Rev Cubana Oftalmol* vol.25 no.2 Ciudad de la Habana oct.-dic. 2012.
- [21] Casu B., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem*, 43, 51-134, 1985.
- [22] U. Lindahl and et al., *Biosynthesis of heparin. Trends Biochem. Sci.*, vol. 11, 221-225, 1986.
- [23] H. Kitagawa y K. Sugahara. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, nº 10, 518-527, 2000.
- [24] Petitou M., *ACS Symposium Series*, 560, 90-103, 1994.
- [25] Conrad, H.E., *Heparin Binding Protein*, (Academic Press, San Diego), 1998.

- [26] I. Capila and R. J. Linhardt, Heparin-Protein Interactions., *Angew. Chem. Int.*, vol. 41390-412, 2002.
- [27] Mulloy B., Forster M., Jones C., Davies D.B., *Biochem. J.* 293: 849-858, 1993.
- [28] Linhardt R.J., Toida T., *Carbohydrates in Drug Design*, capítulo 7, 277-341 (Marcel Dekker Inc., New York), 1997.
- [29] van Boeckel A.A., Petitou M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32: 1671-1690, 1993.
- [30] G. Torri, B. Casu, G. Gatti and P. Sinaÿ, Mono and bidimensional 500 MHz ¹H-NMR spectra of a synthetic pentasaccharide corresponding to the binding sequence of heparin to antithrombin-III: Evidence for conformational peculiarity of the sulfated iduronate residue, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 128: 134-140, 1985.
- [31] R.J. Linhardt, D. Loganathan, A. al-Hakim, H. M. Wang, J. M. Walenga, D. Hoppensteadt y J. Fareed, Oligosaccharide mapping of low molecular weight heparins: structure and activity differences., *J Med Chem.*, vol. 33 nº (6), 1639-1645, Jun 1990.
- [32] M. e. a. Gerrini, Antithrombin-binding Octasaccharides and Role of Extensions of the Active Penta saccharide Sequence in the Specificity and Strenght of Interaction., *J. Biol. Chem.*, vol. 283, 26662-26675, 2008.
- [33] European Medicines Agency, Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal, Science Medicines Health, 2013.
- [34] A. Fernandez Pavón, *Farmacología de Bemiparina*, Emergencias, nº 15, S2-S4, 2004.
- [35] Oturai PS, Rasch R, Johansen P. Low doses heparin treatment prevents glomerular basement membrane thickening in diabetic rats. *Diabetología*; 46; 37 (Suppl 1): 14, 1994.
- [36] Nader HB, Buonassisi V, Colbrun P, Dietrich CP. Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfatation pattern of heparin sulphate proteoglycan from endothelial cells. *J Cell Physiol*; 140: 305-10, 1989.
- [37] Hehenberger K, Kratz G, Hansson A, Brismar K. Fibroblasts derived from human chronic diabetic wounds have a decreased proliferation rate, which is recovered by the addition of heparin. *J Dermatol Sci.*; 16:144-51, 1998.

BIBLIOGRAFÍA

[38] Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252(5013):1705-8, 1991.

[39] Loo BM, Salmivirta M. Heparin/Heparan Sulfate Domains in Binding and Signaling of Fibroblast Growth Factor 8b. *J. Biol. Chem.*; 277: 32616–23, 2002.

[40] Kreuger, J., Salmivirta, M., Sturiale, L., Giménez-Gallego, G., and Lindahl, U. Sequence Analysis of Heparan Sulfate Epitopes with Graded Affinities for Fibroblast Growth Factors 1 and 2. *J. Biol. Chem.*; 276: 30744-52, 2001.

[41] Rullán, M., Cerdà L, Frontera G, Masquimel L, Llobera J. Treatment of chronic diabetic foot ulcers with Bemiparin: a randomized, triple-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Diabet Med*, 25: 1090-1095, 2008.

[42] Chen Z., Zhang J., Stamler S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 8306–8311, 2002.

[43] Neubauer R, Wölkart G, Opelt M, Schwarzenegger C, Hofinger M, Neubauer A, Kollau A, Schmidt K, Schrammel A, Mayer B. Aldehyde dehydrogenase-independent bioactivation of nitroglycerin in porcine and bovine blood vessels. *Biochemical Pharmacology*, 93: 440–448, 2015.

[44] Franco G, Gómez MT. Procedimiento de preparación de derivados de glicosaminoglicanos donadores de óxido nítrico, nitroderivados obtenidos y su uso en tratamiento de úlceras crónicas. ES 2357601.

[45] Zhang L, Nederberg F, Pratt RC, Waymouth RM, Hedrick JL, Wade CG. Phosphazene bases: A new category of organocatalysts for the living ring-opening polymerization of cyclic esters. *Macromolecules*, 40, 4154-4158, 2007.

[46]. Gopi Krishna Kolluru, Shyamal C. Bir, and Christopher G. Kevil. Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. *International Journal of Vascular Medicine*. Volume 2012, Article ID 918267, Department of Pathology, LSU Health Sciences Center-Shreveport, LA, USA, 2012.

[47] Endothelial dysfunction and diabetes mellitus. *Revista Cubana de Endocrinología*. 23:166-185, 2012.

[48] Greenhalgh D.G., Sprugel K.H., Murray M.J. and Ross R. PDGF and FGF Stimulate Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse. *American Journal of Pathology*, Vol 136, No 6, June 1990.

[49] Sullivan SR et al. Validation of a Model for the Study of Multiple Wounds in the Diabetic Mouse (db/db). Presented at the 11th Annual Meeting of the

Wound Healing Society Meeting, in Albuquerque, New Mexico, May 17, 2001.
DOI: 10.1097/01.PRS.0000105044.03230.F4 953.

[50] Gold L.I. et al Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 11, 57–65.
doi:10.1038/sj.jidsymp.5650011. 2006

[51] Robert D. Galiano RD, et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *American Journal of Pathology*, Vol. 164, No. 6, June 2004.

[52] Cross SE et al. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *British Journal of Plastic Surgery*. 48, 189-197, 1995.