



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE RESTAURACION  
EN MUSCULO ESQUELETICO DE RANA Y DE CONEJO

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

RAFAEL MEDINA NAVARRO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C O N T E N I D O .

	págs.
1.- Introducción.	1-3
2.- Objetivos.	4
3.- Generalidades.	5-16
a) Curso normal de la cicatrización en mamíferos.	
b) Generalidades sobre la regeneración en anfibios.	
c) Poblaciones celulares y su papel en la cicatrización.	
d) Poblaciones celulares en la regeneración de anfibios.	
4.- Material y Método.	17-25
a) Organismos de experimentación y <u>mus</u> culatura utilizada.	
b) Procedimiento de cirugía.	
c) Disección de músculo.	
d) Fijación, inclusión y corte.	
e) Técnicas de coloración.	
f) Identificación de los elementos celulares y extracelulares bajo el -- microscopio.	
5.- Resultados.	26-57
a) Cronología comparada del proceso de restauración del músculo.	
b) Cambios observados en las poblaciones celulares en cada estadio.	
c) Variación en la cantidad de células observadas durante el proceso de -- restauración.	
6.- Discusión.	58-65
7.- Conclusiones.	66-67
8.- Apéndice.	68-70
9.- Bibliografía.	71-76

## 1.- INTRODUCCION.

Las células de un organismo superior, de acuerdo a su capacidad de regeneración pueden clasificarse como - células lábiles, células estables y células permanentes [Robbins, 1973].

Las células lábiles se reproducen constantemente y constituyen a aquellos tejidos que sufren recambio continuo o que son sustituidos por fenómenos naturales. -- Constituyen la mayor parte de las superficies epiteliales, las células linfoides y las hematopoyéticas.

Las células estables no se reproducen en condiciones normales, pero su capacidad de regenerar puede ser activada bajo determinadas circunstancias como la producción de una herida. Las células que constituyen el - parénquima de algunas víceras y en especial las del hígado son ejemplos de células estables.

Las células permanentes carecen de la capacidad de dividirse y por lo tanto de regenerar al tejido que -- constituyen. Estas células se encuentran representadas por las del sistema nervioso y las de la musculatura lisa y listriada.

Sin la capacidad de regeneración, los tejidos constituidos por células permanentes solo pueden restable - cer la continuidad perdida por una lesión a través del proceso de cicatrización, en el cual el hueco de la herida será llenado con un tipo de tejido particular no - especializado denominado tejido conectivo.

Teóricamente la pérdida de la capacidad de regeneración de un tejido puede obedecer a la completa dife--renciación de sus células resultado del desarrollo em--brionario, que suele excluir la posibilidad de ulterio--res divisiones celulares en los tejidos más especializaados [Schwartz, 1977].

Sin embargo resulta notable el hecho de que el desarrollo completo en algunos vertebrados no termina con la capacidad de regenerar tejidos especializados, como sucede en la regeneración de la totalidad de un miembro amputado. Los anfibios urodelos como el ajolote y la salamandra ejemplifican esta condición y regeneran miembros perdidos en todas las etapas de su desarrollo.

Por otro lado, el desarrollo parece excluir la posibilidad de regenerar miembros perdidos en los anfibios anuros. Estos exhiben regeneración epimórfica\* en estadios larvarios, pero excepto ciertas formas acuáticas [ Xenopus, Hymenochirus ], esta habilidad se pierde con la metamorfosis [Thornton, 1968].

Aparentemente, los cambios inherentes a la metamorfosis con el consiguiente aumento en la complejidad orgánica terminan con la posibilidad de regeneración en los anuros; este grupo representa a el único ejemplo conocido disponible de la pérdida súbita de la capacidad de regeneración epimórfica.

Siendo la restauración una propiedad esencial de los seres vivos con la cual se enfrentan continuamente a las adversidades del ambiente en que habitan, los anuros deben responder a la necesidad de restablecer la continuidad de sus tejidos cuando estos llegan a lesionarse. Para ello existen dos posibilidades: que posean la capacidad de regenerar tejidos individualmente aun cuando carecen de la capacidad de regenerar miembros completos, o bien, que la continuidad se restablezca por medio del proceso de cicatrización tal como ocurre en los tejidos constituidos por células permanentes como el músculo esquelético en mamíferos.

\* El término epimorfosis fué introducido por Morgan en 1901 para designar la regeneración de miembros perdidos entre los anfibios y diferenciarla de la reorganización del tejido residual común entre los invertebrados, a lo cual llamó morfoláxis [Schmidt, 1968].

La intención del presente trabajo es determinar la forma de restauración del músculo esquelético de rana y compararlo con el proceso reparativo común entre los mamíferos y denominado cicatrización.

La idea de comparar dos organismos filogenéticamente apartados, se desprende de la antigua noción de que la capacidad regenerativa es dependiente del nivel de organización y que encuentra su origen en las ideas de Prizbram [1909], quien afirmaba que la regeneración es una propiedad de los organismos, la cuál es progresivamente menos aparente en aquellos grupos los cuales ocupan posiciones altas en la escala filogenética [citado por Vorontzova, 1972 pág. 401].

Es posible que cuando los primeros peces invadieron el medio terrestre, los cambios que dicho acontecimiento trajo consigo condujeron, entre otras muchas cosas a un aumento progresivo en la complejidad y con esto a la pérdida paulatina de los poderes de regeneración.

Cuando el renacuajo a través de la metamorfosis se convierte en una rana adulta y pierde la capacidad de regenerar miembros perdidos, nos ayuda a comprender lo que tal vez pudo ocurrir hace millones de años; si la pérdida tuvo lugar de ésta forma, la importancia de tal hecho radica en que resulta profundamente lamentable.

Para los fines del presente estudio, es importante delimitar el significado de los términos de reparación por cicatrización y regeneración. Si el hueco de la herida es llenado con tejido distinto del original, el fenómeno se denomina reparación por cicatrización. Si por otro lado la continuidad se restablece con tejido igual al original, el fenómeno se denomina regeneración.

## 2.- OBJETIVOS.

Comparar el proceso de restauración de músculo esquelético de conejo con el de rana, determinando sus diferencias y semejanzas.

Determinar si la pérdida de la capacidad de regenerar miembros perdidos en anuros postmetamórficos como la rana ha dado como consecuencia la adopción de la cicatrización tisular para restablecer la continuidad del músculo y a través de los resultados establecer si la capacidad de regeneración se pierde por completo con la metamorfosis o si por el contrario se conserva el poder de regenerar tejido muscular esquelético de forma individual.

Inferir si el desarrollo ontogenético de la rana y la consecuente especialización de los tejidos, resulta en la pérdida total de la capacidad de regeneración.

## 3.- GENERALIDADES.

a] Curso normal de la cicatrización de mamíferos.

La descripción del proceso de cierre de una herida se ha efectuado principalmente en organismos superiores incluyendo al hombre, e independientemente del tipo de tejido afectado es posible delimitar para una mejor exposición del fenómeno, cuatro grupos de eventos que no obstante ser descritos por separado se encuentran estrechamente relacionados y que son:

Hemostasia y formación de una costra.

Actividad de células de respuesta inflamatoria y - fibroblastos.

Neoformación vascular.

Depósito de sustancia intercelular y fibras.

Hemostasia y formación de una costra.

El evento más común que sigue al daño tisular es - la ruptura de vasos sanguíneos con la hemorragia resultante. En las regiones lesionadas de los vasos, las plaquetas se adhieren y forman un trombo blanco que taponaa la salida de la solución de continuidad, a la vez que - producen vasoconstricción local y espásmo por la liberación de 5-hidroxitriptamida.

La sangre extravasada ocupa el hueco de la herida y da lugar a un coágulo que tiene al principio el mismo volumen de la sangre en estado líquido, pero que al cabo de cierto tiempo comienza a deshidratarse y contraerse, separándose en dos porciones, una líquida o suero y otra, una trama de una proteína insoluble, la fibrina - que une tenuemente los bordes de la herida.

Al deshidratarse el coágulo y separarse el suero, se forma una costra.



## Actividad de células de respuesta inflamatoria y fibroblastos.

Unas cuantas horas después de producida una lesión aparecen células inflamatorias como macrófagos, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares en la vecindad del área afectada. Sin embargo, las poblaciones de estas células varían notablemente en el transcurso del proceso reparativo, posiblemente de acuerdo a la función que desempeñan y que no siempre resulta ser inmunológica.

Mientras tanto, fibroblastos jóvenes invaden el área lesionada por medio de movimientos amiboides y provenientes de la vecindad de los vasos donde permanecían fijos, desplazándose a una velocidad de 0.2 cm en 24 h. Es posible que los fibroblastos también deriven de --- otras células indiferenciadas del tejido conectivo o -- por proliferación de fibroblastos preexistentes. En esta etapa temprana de su actividad son células redondeadas o piriformes, de citoplasma abundante y acidófilo, núcleo esférico e intensamente basófilo y bien delimitado; poseen así mismo capacidad fagocitaria y son denominados por algunos autores histiocitos [Correa, et.al., 1970].

Es a partir aproximadamente del cuarto día de producida la lesión, cuando los fibroblastos asumen la función de síntesis de fibrillas intersticiales y se transforman en elementos bipolares, de citoplasma menos abundante, núcleos en punta y dispuestos en dirección perpendicular a las asas capilares neoformadas. Esta fase de intensa producción de fibras decrece paulatinamente hasta que aproximadamente al octavo día disminuyen en tamaño y en número y se distinguen como elementos alargados de núcleo hipercromático distribuidos en escaso número entre las fibras conjuntivas [colágena y reticulina] completamente desarrolladas.

### Neoformación vascular.

Las primeras yemas capilares aparecen en el área - de la lesión desde el segundo día de producida, y se derivan de células endoteliales de los vasos vecinos al área, apareciendo primero como pequeñas prolongaciones - que paulatinamente adquieren una luz en la que es posible apreciar eritrocitos. Algunas yemas capilares nunca llegan a tener circulación definitiva, por lo que se degeneran y reabsorben; las demás adquieren circulación y pronto se diferencian en capilares, venulas y arterio-las.

El máximo de formación vascular se alcanza aproximadamente al sexto día de producida la lesión, y en ese momento el área presenta más vasos que cualquier otra - del organismo. Los capilares entonces pueden sobresalir de la superficie lesionada y ser visibles macroscópicamente, constituyendo lo que se denomina tejido de granulación.

Progresivamente los vasos disminuyen su calibre y su número, hasta que aproximadamente a los diez días de iniciado el proceso de cicatrización, la involución vasular alcanza su máximo y solo se observan algunos capilares de calibre muy pequeño, entre las bandas de tejildo conectivo.

### Depósito de sustancia intercelular y fibras.

Desde las primeras etapas del proceso de cicatrizalción es posible encontrar cantidades progresivamente alltas de mucopolisacáridos que representan gran parte de las mucoproteínas de la sustancia fundamental del tejildo conjuntivo. Al mismo tiempo es notable la presencia de aminoácidos como la glicina y la prolina, que junto con los mucopolisacáridos representan la fase de sustralto, en el cual se están depositando los elementos que -

formarán las fibras de colágena. Esta fase se inicia -- desde las 24 h. después de producida la lesión y dura a proxímadamente cinco días.

En una segunda fase las fibras colágenas maduran y a partir del quinto día se inicia su franca deposita -- ción hasta llegar a la cicatrización completa. Al mismo tiempo, es notable un incremento en la resistencia de -- la cicatriz a la tensión, relacionada con el aumento de fibras colágenas en la herida.

Cuando se ha concluido el proceso de cicatrización aproximadamente 12 días después de iniciado, el área re presentada por una cicatriz es relativamente simple, es decir, existen muy pocos vasos de calibre pequeño, así como escasos fibrocitos esparcidos entre abundante cantidad de fibras colágenas.

#### b] Generalidades sobre la regeneración en anfibios.

La mayor parte de los estudios sobre regeneración en vertebrados se llevan a cabo en anfibios, y más espe -- cíficamente en urodelos. La regeneración de un miembro perdido en estos organismos se utiliza comunmente como prototipo de este fenómeno, puesto que es posible deter -- minar por separado la forma de regeneración de los teji -- dos que constituyen el apéndice.

A continuación se describe brevemente los aspectos más importantes de la regeneración de un miembro amputa -- do en anfibios urodelos y algunas características gene -- rales de la regeneración de la musculatura estriada.

Unos minutos después de la amputación, un coágulo cubre la superficie del muñón. Durante las horas subsi -- guentes, una migración de células epidérmicas del área contigua a la lesión cubre la superficie de amputación, formando el denominado epitelio de la herida. A su vez,

una apreciable respuesta inflamatoria se inicia y continúa por varios días.

El epitelio de la herida provoca cambios aparentes en la forma del muñón de amputación, debido a un progresivo engrosamiento de las células epiteliales que crecen por mitosis.

Unos diez días después de la amputación y bajo el epitelio de la herida, se aprecia un crecimiento en forma de cono que constituye el llamado blastema de regeneración constituida por la acumulación de un tipo especial de células indiferenciadas llamadas blastémicas, y que en conjunto sirven de base y origen para la subsecuente morfogénesis del nuevo miembro y de los tejidos que lo forman, es decir, se diferencian para dar lugar a el nuevo cartilago, hueso, músculo etc.

Sin embargo, aparentemente existen dos vías para la regeneración de la musculatura estriada en urodolos: [1] formación de novo de miofibrillas a partir de células blastémicas y [2] a partir de células uninucleadas, mitoticamente activas denominadas mioblastos. [Schmidt, 1968].

De 10 a 15 días después de la lesión, es posible observar la fusión de mioblastos en complejos denominados miosimblastos o miotubulos multinucleados precursores de futuras fibras [Sloper, J.C., & Partridge, T.A., 1980].

La completa restauración de la musculatura depende en gran medida del crecimiento de tejido conectivo en el sitio de la lesión. La regeneración procede mejor si el crecimiento de este tejido no es excesivo [Vorontzova, 1976].

c] Poblaciones celulares y su papel en la cicatrización.

En el curso de la cicatrización de una herida, diferentes tipos de células participan activamente en la inducción y control de los procesos de hemostasia, inflamación, proliferación celular y depósito de fibras. Estas células aparecen a diferentes tiempos y sus poblaciones varían notablemente de acuerdo al estadio en que se encuentre el proceso reparativo.

A continuación se realiza una descripción general de las principales células que comúnmente se pueden encontrar en el lugar en que se lleva a cabo el proceso de cicatrización.

#### Monocitos.

Los monocitos son leucocitos que se caracterizan por ser células relativamente grandes, que pueden medir hasta 10 micras de diámetro; poseen núcleo excéntrico, de forma ovoide, reniforme o en herradura, no se colorea tan intensamente como en los linfocitos, por la disposición menos compacta de su cromatina, su citoplasma es abundante y contiene gránulos que son principalmente lisosomas.

Los monocitos son en esencia células fagocitarias. Alrededor de las primeras 12 h. después de producida una herida, los monocitos aparecen en el área y es entonces cuando reciben el nombre de macrófagos [hace ya varios años que Carrel demostró que monocitos y macrófagos son una variación funcional de un mismo tipo celular (Carrel, 1926)].

Los macrófagos en la herida remueven gran parte de los desechos tisulares por ingestión. Para el caso, son capaces de sintetizar proteínas, principalmente enzimas que se utilizan en la fagocitosis, durante la fase inflamatoria del proceso de cicatrización. Entre estas enzimas se encuentran colagenasas, y hay evidencia de que los macrófagos son capaces de degradar colágena intracelular.

lularmente, seguida de fagocitosis de fibras de colágena [Hunt, et.al., s.a.; Diegelmann, Cohen & Kaplan, 1981].

Recientes datos señalan que otro papel importante de los macrófagos en la cicatrización puede ser la inducción de la proliferación de fibroblastos [Leibovich & Ross, 1976]; Al provocar monocitopenia por la administración de suero antimacrofágico e hidrocortisona, la migración de fibroblastos y el depósito de sustancia intercelular en organismos de experimentación se ven notablemente alterados.

#### Neutrófilos.

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares que tienen en el humano de 7 a 9 micra de diámetro. Comprenden de 65 a 75% del total de leucocitos. En general se caracterizan por poseer un citoplasma abundante que incluye gránulos neutrofilicos que son un tipo especial de lisosomas que contienen principalmente hidrolasas. - Sus nucleos son notablemente polimórficos, lobulados, - en los cuales no se observan nucleolos. Las lobulaciones del núcleo pueden variar mucho y se encuentran unidas por pequeñas prolongaciones de cromatina. Sus afinidades tintorias pueden variar notablemente de una especie a otra, por lo que se les ha llamado también heterocromófilos.

La función más común de los neutrófilos es la de fagocitar partículas pequeñas, como bacterias y otros organismos así como complejos antígeno-anticuerpo; constituyen la primera línea celular de defensa contra organismos invasores y son muy notables desde las primeras etapas de la cicatrización. Sin embargo, resultados obtenidos con suero antineutrófilo indican que en la ausencia de una infección severa, la cicatrización en los

organismos aneutrófilos procede de manera idéntica que en organismos normales [Simpson & Ross, 1972].

Se ha mostrado también que la presencia de neutrófilos no es necesaria como estímulo para la aparición de monocitos, es decir, su presencia no determina la aparición de otros tipos celulares en la cicatrización.

#### Eosinófilos.

Los eosinófilos en el hombre tienen de 9 a 10 micra de diámetro y representan del 2 al 4% del total de leucocitos. Se caracterizan porque su núcleo es generalmente bilobulado y su citoplasma incluye gránulos de naturaleza enzimática que tiñen intensamente con los colorantes ácidos. Estos gránulos se ha comprobado contienen peroxidasas y otras enzimas hidrolíticas, por lo cual son de naturaleza lisosómica.

Los eosinófilos se cree fagocitan complejos antígeno-anticuerpo y su número aumenta en algunos trastornos alérgicos y en enfermedades parasitarias.

Recientes investigaciones demuestran que los leucocitos eosinófilos pueden participar activamente en la cicatrización, aparentemente en lo que se refiere a la remodelación de la colágena en la cicatriz. Estos hechos se apoyan en el descubrimiento de actividad colagenasa en eosinófilos y en la observación de que en el proceso de cicatrización aumentan considerablemente entre los 7 y 14 días después de producida la lesión, período de intensa síntesis y remodelación de la colágena [Shoshan, 1981].

#### Fibroblastos.

Los fibroblastos representan la especie celular tipo del tejido conectivo y participan activamente en el proceso de síntesis de fibras y de la matriz intercelular que constituirá finalmente la cicatriz. Su papel de

termina en última instancia el curso de la cicatriza --  
ción.

Su aspecto puede variar a razón del estado de desarrollo en que se encuentren. Generalmente son células - grandes y planas, extensamente ramificadas, de aspecto fusiforme, cuyas prolongaciones son largas y delgadas. Los bordes celulares son en sí imprecisos y su citoplasma es basófilo.

Los fibroblástos de la cicatrización son alargados con sus ejes paralelos a las bandas de tejido conectivo. Sus organelos citoplásmicos se encuentran polarizados, sugiriendo que sus productos secretorios están relacionados con las partes terminales de la célula [Alexander et.al., 1930]. Son abundantes en la vecindad de los vasos neoformados y sus prolongaciones citoplásmicas pueden teñirse fuertemente con impregnaciones argénticas, por lo que se conocen como argirófilas.

Al final del proceso de cicatrización, los fibro--blástos se transforman en células más pequeñas y de núcleo hipercromático, que se distinguen en escaso número entre la densidad de fibras. Reciben entonces el nombre de fibrocitos [Correa et.al., 1970].

#### d] Poblaciones celulares en la regeneración de anfibios.

A un gran número de células se les atribuye una intervención directa o indirecta en el fenómeno de regeneración, si bien gran parte de la información disponible es contradictoria.

A continuación se describe brevemente la participación de las células más importantes en la regeneración de apendices en anfibios y en la regeneración de fibras musculares.



### Células blastemáticas.

Quizá la especie celular más importante en la regeneración tisular en anfibios está representada por las llamadas células blastémicas. Su presencia es tan característica de este fenómeno como lo pueden ser los fibroblastos en la cicatrización de las heridas. Se asume -- que se trata de células que permanecen indiferenciadas durante el desarrollo y en las etapas adultas están inactivas hasta que el estímulo apropiado las induce a entrar en actividad de diferenciación hacia diferentes vías. Son específicas para cada tejido y se encuentran distribuidas a través dentro del cuerpo del organismo -- hasta que se agregan en el sitio de la amputación formando el llamado blastema de regeneración [Brookbank, - 1978].

La función de las células blastemáticas parece estar confinada a la formación de otras células especializadas a través de su diferenciación. Son éstas las responsables directas de la conformación de los tejidos que constituirán el nuevo miembro.

### Células epiteliales.

Como un mecanismo de protección casi inmediato, -- después de producida una lesión las células epiteliales cubren la superficie expuesta formando el llamado epitelio de la herida [Repeh et.al., 1980]. Sin embargo la función de estas células parece ir mucho más lejos. Basta decir que si el epitelio de la herida es removido, -- la regeneración se interrumpe.

Aparentemente la morfogénesis del nuevo miembro se realiza gracias a la interacción [transferencia de estímulos] entre las células blastemáticas y el epitelio de la herida [Schmidt, 1968], es decir, como si las células epiteliales "dirigen" a las blastemáticas como deben

comportarse.

Existen otras funciones a las cuales parecen estar destinadas las células epiteliales, de las cuales dos - muy importantes son las siguientes: primero, son capaces de producir enzimas que degradan colágena y regulan su cantidad y segundo, producen un factor de crecimiento cuyos efectos se han demostrado unicamente in vitro - [Shoshan, 1981].

Mioblastos.

Para la miogénesis, en la etapa embrionaria, del mesénquima primario se originan células llamadas mioblastos, precursores de fibras musculares [Minguetti, 1980]. Células mononucleadas idénticas toman parte en el proceso de regeneración muscular, aunque su origen - para algunos autores desde este punto de vista puede encontrarse en los núcleos de la fibras musculares afectadas [Reznik, 1969].

Nueva evidencia apoya la conclusión de que la regeneración de las miofibrillas recapitula muchas de las actividades asociadas con el desarrollo del músculo. De esta forma, el origen de las fibras en desarrollo es tempranamente somático o a partir del mesénquima primario, después, en las etapas adultas es posible que mioblastos de reserva puedan intervenir en la regeneración del músculo esquelético [Schmidt, 1968]. Como se mencionó en otra parte, el músculo esquelético también se origina a partir de células blastémicas, es decir, es posible que tenga un doble origen [idem. supra.].

De la morfología de los mioblastos existe poca información, pero puede decirse en base a la observación de fotografías, que se trata de células fusiformes, muy alargadas y de núcleo central, grande y redondeado. Se localizan generalmente en grupos de cuatro o más célu-

las estrechamente asociadas [Glynn, 1979].

#### Células sanguíneas.

La búsqueda de los factores que regulan e influyen la regeneración de miembros perdidos en anfibios, ha llevado a los investigadores a poner atención recientemente en las células sanguíneas. Esta noción deriva de los descubrimientos sobre la inmuoestimulación de la médula ósea, que puede conducir a la formación de crecimientos tumorales y a la inducción de la regeneración [Sicard, 1982].

Un descubrimiento interesante es aquél que demuestra que durante la formación de el blastema de regeneración, las células sanguíneas circulantes se reducen notablemente, lo que ha llevado a suponer que estas células son las precursoras de el blastema de regeneración en anfibios. Sin embargo, una objeción para esta suposición es el hecho de que el decremento en la cantidad de células sanguíneas circulantes puede obedecer a muchas otras causas, incluso, a la migración preferencial de dichas células hacia el lugar de la lesión, respondiendo a el proceso inflamatorio normal.

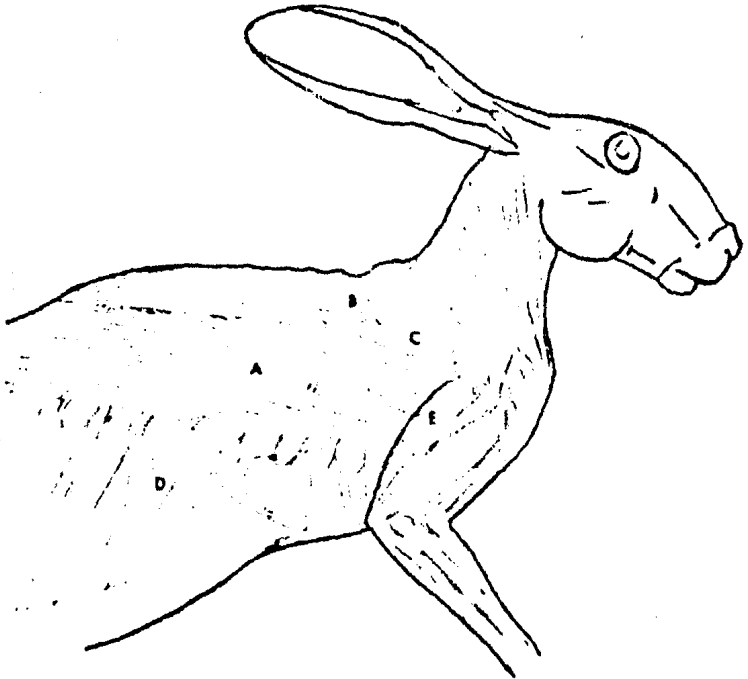
4.- MATERIAL Y METODO.

a) Organismos de experimentación y musculatura utilizada.

Mamífero: Lepus cuniculus

Músculo: Latissimus dorsi

A continuación se muestra el músculo seccionado y la relación que guarda con otros músculos cercanos. Se muestra también la disposición del corte.



A) Latissimus dorsi

C) Deltoides.

E) Tríceps.

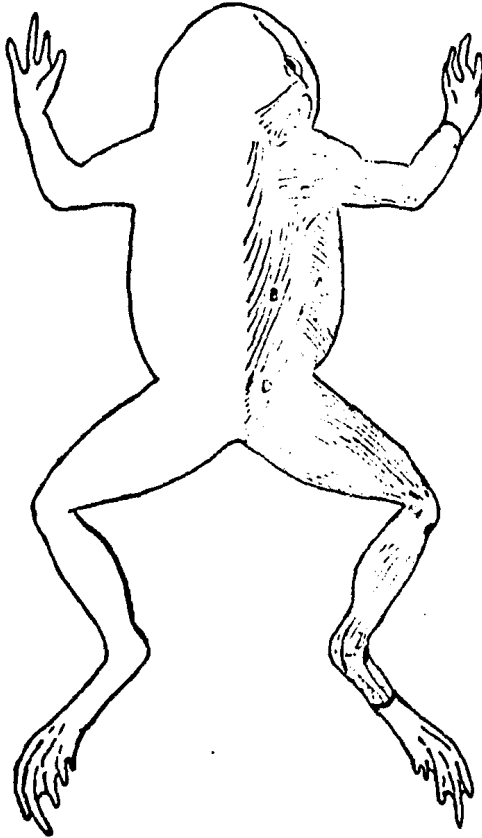
B) Trapecio

D) Músculos Intercostales.

Anfibio: Rana sp.

Músculo: Oblicuo externo

Vista ventral. Relación de la musculatura y disposición del corte.



A] Oblicuo externo.

C] Dorsal ancho.

E] Recto anterior del muslo.

B] Dorsal largo.

D] Ileooccigeo.

F] Glúteos.

b] Procedimiento de cirugía.

Sobre el músculo elegido se efectuaron cortes de 0.5 cm. de largo por 3 o 4 mm. de espesor aproximadamente, perpendiculares a la dirección de las fibras. Para el caso, se eligieron músculos de gran extensión en relación a la talla del animal, para no afectar su dinámica de forma considerable.

Se colocaron puntos de sutura exclusivamente a nivel del tegumento, utilizando catgut crómico calibre (00).

El material para la cirugía fué esterilizado en autoclave y consto de: bisturí, pinzas de dientes de ratón y tijeras de Mayo.

Para los conejos, la anestesia utilizada fué clorhidrato de xilazina a razón de 6 mg./Kg., y clorhidrato de ketamina, a una dosis también de 6 mg./Kg. de peso corporal.

En el caso de la rana, se utilizó como anestésico éter dosificado por medio de un vaporizador.

Para la limpieza local en general se utilizaron -cuaternarios de amonio. Para evitar infecciones ocasionales se aplicó a los conejos penicilina G sodica y --procaina a razón de 30,000 u.i./Kg. de peso, así como nitrofurazona sobre la superficie de la piel incidida.

Las ranas fueron colocadas en una solución 2% de eritromicina soluble y unas gotas de azul de metileno.

c] Disección del músculo.

Una vez efectuada la cirugía a cuatro conejos y -cuatro ranas la disección del músculo se realizó a los 2, 4, 8 y 15 días.

El primer conejo y la primera rana se sacrificaron a los 2 días después de producida la lesión y el área de la incisión en el músculo se aisló y se colocó

directamente en el fijador. El mismo procedimiento se siguió a los 4,8 y 15 días.

d) Fijación, inclusión y corte.

Fijación. En todos los casos se utilizó formol al 10% - durante 24 h.; en las coloraciones con Giemsa y Mallory es necesario mordentar con fluido de Zenker.

Inclusión en parafina.

Deshidratación: después de fijar el músculo, se depositó unos minutos en alcohol 70% para retirar el fijador y se continuó:

alcohol 80%	1 hora.
alcohol 95%	1 hora.
alcohol 100%	tres o cuatro cambios de 1 hora cada uno.

Aclaramiento:

xileno	1 hora
--------	--------

Infiltración:

Parafina fundida (57°C)	dos cambios de 1.5 horas cada uno.
-------------------------	------------------------------------

Inclusión definitiva

Corte. El espesor de los cortes fué de 4 micra y se realizaron en un microtómo de rotación.

e) Técnicas de coloración.

Coloración con hematoxilina y eosina.

Indicaciones: tinción general de rutina.

Fijación: Formalina 10%

Técnica: parafina.

Procedimiento: Desparafinizar (ver apéndice).

- Teñir con hematoxilina de Harris de 1 a 5 min. para colorear el núcleo.
- Enjuagar con agua común para retirar el exceso de colorante.

- Hacer 2 o 3 inmersiones en alcohol ácido para decolorar las secciones.
- Enjuagar con agua común a chorro durante 1 min. para detener la acción del ácido.
- Colocar las secciones en carbonato de litio de 30 a 60 seg. para aclarar el núcleo.
- Enjuagar en agua común a chorro para retirar la solución alcalina que puede inhibir la tinción ácida con eosina.
- Contrastar con eosina mediante algunas inmersiones pa-colorear el citoplasma.
- Deshidratar las secciones con alcohol 95%, alcohol 100 %, 1 min. cada una.
- Aclarar con xileno durante algunos min.
- Montar en bálsamo de Canada.

Referencia: [Preece, 1972].

Coloración de Giemsa [modificación de Wolbach].

Indicaciones: coloración para detalles del núcleo.-  
Diferenciación de células.

Fijación: formalina 10%. Las preparaciones son mordentadas con el reactivo de Zenker, 1 h.a temperatura ambiente.

Técnica: parafina.

Procedimiento:

- Desparafinizar las secciones como señala el apéndice.
- Remover cristales de cloruro mercuríco (ver apéndice).
- Colocar los cortes en agua destilada.
- Colocar los cortes en la solución de trabajo de Giemsa y dejarlos durante toda la noche.
- Retirar los cortes del colorante y colocarlos en agua destilada. Las secciones deben tener color obscuro.
- Diferenciar cada corte individualmente en alcohol 95% al cual se ha añadido de 10 a 25 ml. de colofonia 10%. Se mantienen las laminillas en constante movimiento pa-



- ra que la decoloración sea uniforme.
- Controlar la diferenciación enjuagando las preparaciones con alcohol 95% y observandolas al microscopio. De tener la decoloración cuando el núcleo aparesca azul brillante y el citoplasma rosa pálido.
  - Deshidratar en 2 o 3 cambios de alcohol absoluto.
  - Aclarar en 2 o 3 cambios de xileno.
  - Montar en bálsamo.

Referencia:[Mallory, 1938].

Coloración tricómica de Masson (Modificación de -- Goldner-Foot).

Indicaciones: tejido conectivo.

Fijación: formalina 10%.

Técnica: parafina.

Procedimiento:

- Desparafinizar las secciones como señala el apéndice.
- Remover cristales de cloruro mercuríco.
- Colocar los cortes en agua destilada.
- Teñir con hematoxilina de Weigert por 3 a 5 min.
- Enjuagar con agua destilada y checar bajo el microscopio. El núcleo se observa ligeramente obscuro.
- Enjuagar con agua destilada.
- Teñir con la solución de trabajo fuchsina-cromotropo-orange G. de 5 a 30 min.
- Enjuagar en ácido acético 0.2%
- Colocar en ácido fosfotungstico 5%.de 3 a 5 min.
- Enjuagar en solución de ácido acético 0.2% por algunos min. para eliminar el ácido fosfotungstico y diferenciar los tonos de color.
- Teñir con la solución de verde brillante 0.1% de 5 a 20 min. (en otros casos se puede contrastar con azul de anilina).
- Tratar con la solución de ácido acético 0.2% durante 5 min.

-Deshidratar en 2 cambios de alcohol 95% seguidos de 2 cambios de alcohol 100%.

-Aclarar en 3 cambios de xileno y montar en bálsamo

Referencia:[Jones, 1950].

Coloración rápida de hematoxilina-ácido fosfotungstíco (P.T.A.H. rápida. Modificación de S.P. Hicks).

Indicaciones: Músculo estriado, núcleos, fibrina, - colágena.

Fijación: formalina 10%. Tratamiento con fijador de Bouin por 30min.

Técnica: parafina.

Procedimiento:

-Desparafinizar las secciones.

-Mordentar las secciones en la solución Bouin por 30 min.

-Lavar en agua común a flujo por 3 min. para remover el exceso de Bouin.

-Transferir las secciones a la solución alumbre de hierro 5% y dejarlas ahí por 15 min.

-Dejar escurrir las secciones y colocarlas en la solución de ácido oxálico 5% de 5 a 10 min.

-Lavar en agua común a flujo y colocar en agua destilada unos seg.

-Colocar las secciones en la solución P.T.A.H. rápida de 30 min. a 3 h. a 58°C.

-Revisar al microscopio y al tiempo de encontrar los núcleos azul brillante y claramente definidos colocar las secciones directamente en alcohol étílico 95%.

-Deshidratar rápidamente en algunos cambios de alcohol - 95% seguidos de alcohol absoluto.

-Aclarar en varios cambios de xileno.

-Montar en bálsamo.

Referencia:[Mallory,1938].

f) Identificación de los elementos celulares y extracelu

lares bajo el microscopio.

Un panorama general, que delimita perfectamente núcleo y citoplasma es conseguido con la técnica de hematoxilina y eosina. Sin embargo, para detalles más precisos del núcleo, específicamente para la diferenciación de elementos celulares de la sangre resulta ser más útil la tinción con Giemsa, con la que se obtiene mayor detalle en los contornos del núcleo.

Los elementos extracelulares como puede ser la fibrina, las fibras colágenas y la musina del tejido conectivo son bien delimitados de los elementos celulares con las técnicas tricrómicas; con la técnica tricrómica de Masson es posible distinguir perfectamente las fibras colágenas, que se tiñen de color azul o verde ya sea si se utiliza como contraste azul de anilina o verde brillante.

La técnica de hematoxilina-ácido fosfotungstico de Mallory (P.T.A.H) ofrece una observación bastante detallada del tejido conectivo, además de que es posible distinguir el músculo estriado y al mismo tiempo apreciar bien los núcleos de las fibras.

Las afinidades tintoreas de los elementos celulares y extracelulares con las técnicas utilizadas se describen a continuación.

#### Tinción tricrómica de Masson.

Núcleos: negros

citoplasma: rojo

colágena: verde o azul

musina: verde o azul

eritrocitos: amarillos o naranja

#### Coloración de Giemsa.

Núcleos: distintos tonos de azul

citoplasma: rosado

cuerpos de inclusión: azul o lavanda

Coloración con hematoxilina-ácido fosfotungstico (P.T.  
A.H).

Núcleos: azul

citoplasma: amarillo-rosa, café-rojo

colágena: café

fibrina: azul

fibras elásticas: púrpura

músculo estriado: azul

Coloración con hematoxilina y eosina.

Núcleo: azul claro brillante

citoplasma: rosa.

## 5.- RESULTADOS.

## a] Cronología comparada del proceso de reparación del músculo

Conejo 2 días después de la lesión.

Aspecto del músculo. En esta etapa lo más notable en el músculo afectado es la degeneración de las fibras musculares, que han perdido su aspecto común y se han convertido en pequeños cúmulos de material amorfo e hialino (fig 11). A esta condición se le da el nombre de degeneración de Zenker o simplemente degeneración hialina.

Los paquetes de fibras musculares cercanos también han sufrido cambios y se aprecian desgregados y teñidos más intensamente, además de haber tomado un aspecto ondulante o tortuoso, lo que sugiere que sufrieron una fuerte contracción.

Actividad Celular. Las células que se encuentran en mayor número en esta etapa son fibroblastos que se observan emitiendo numerosas prolongaciones tenues, formando una extensa maya de tejido conectivo muy laxo. Estos fibroblastos son más numerosos en las zonas terminales del músculo seccionado y su aspecto señala que se encuentran en un estadio temprano de plena proliferación.

Las células que siguen a los fibroblastos en abundancia son eritrocitos, que se encuentran concentrados en gran número en la región terminal y entre las fibras reticulares de tejido conectivo (fig. 12).

Otras células menos abundantes e íntimamente asociadas al músculo en proceso de regeneración son los macrófagos, que se aprecian con dificultad por encontrarse confundidos entre la masa del músculo hialinizado.

Es posible apreciar también leucocitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, en grupos de 2 o 3 células distribuidas heterogéneamente.

Neoformación vasculas. En ésta etapa aun no se aprecian vasos de nueva formación. Los que se observan son grandes y de paredes gruesas.

Depósito de sustancia intercelular y fibras. La zona de discontinuidad del músculo seccionado se aprecia considerablemente sustituida por tramas tenues de fibras reticulares que parecen poco a poco tomar el lugar de las masas musculares en proceso de degeneración. En algunas regiones también es posible observar depósito de sustancia que es más evidente en algunas preparaciones teñidas con P.T.A.H., donde se observa debilmente teñido de café, color del tejido conectivo con ésta técnica (fig. 12)

#### Rana 2 días después de la lesión.

Aspecto del músculo. Las fibras musculares en el área de la lesión se encuentran en pleno estado de degeneración, tomando el aspecto hialino típico de la degeneración de Zenker. La fragmentación de los paquetes de fibras musculares es más notable y extensa que en el caso del músculo del conejo y en lugar de la contracción, las fibras parecen haber sufrido un plegamiento sobre sí mismas, por lo que también han adquirido una tonalidad más intensa apreciada con claridad con la coloración de Masson (fig. 13).

Actividad celular. En ésta etapa los fibroblastos son comparativamente menos abundantes que para el con-

jo. Se encuentran sin embargo agrupadas en cúmulos compactos y en pleno estado de proliferación, por lo que se observan redondeadas y sus núcleos, aunque grandes, tiñen debilmente. Se localizan inscritos en una matriz de sustancia y escasas fibras, músculo hialinizado y - fibras emitidas por uno que otro fibroblasto maduro, - fusiforme y de núcleo bien pigmentado.

Otras células muy numerosas son las blastemias, - que asemejan mesenquimáticas. También se observan macrófagos en número considerable, de gran tamaño, con - núcleos grandes y ligeramente excéntricos; algunos parecen contener gránulos en su citoplasma, lo que podría estar relacionado con su actividad de fagocitosis - de los debris tisulares. También se observan leucocitos polimorfonucleares, principalmente neutrofilos de gran tamaño (fig. 14).

Neoformación vascular. Existen realmente pocos va - sos de nueva formación en esta etapa, aunque son de -- gran calibre y las células que se observan en ellos, - principalmente eritrocitos y células endoteliales ind - can que ya han adquirido circulación.

Depósito de sustancia intercelular y fibras. Es - posible observar numerosas fibras de colágena de gran - longitud, bien organizadas y que envuelven los bordes de la herida. Son fibras muy gruesas y ondulantes, -- que parecen ser continuas con el tejido conectivo que rodea al músculo y que es propio de éste. En coloracio - nes como la de Masson se pueden observar algunas fi -- bras compactas rodeando el músculo en degeneración.

La cantidad de tejido conectivo es comparativamen - te menor que para el músculo del conejo.

Conejo 4 días después de la lesión.

**Aspecto del músculo.** La región del músculo cercana a la herida y antes teñida intensamente ahora aparece pálida. La razón es que gran parte del músculo fué sustituida por fibras de tejido conectivo y el que queda se observa intensamente vacuolado, es decir, los fragmentos del músculo en degeneración exhiben huecos en su interior, lo que representa posiblemente una etapa más avanzada en el proceso de hialinización de las fibras musculares, que poco a poco serán sustituidas (fig. 15).

**Actividad celular.** Los fibroblastos son las células que aparecen en mayor número. Poseen forma alargada o irregular y emiten prolongaciones tenues que se anastomosan unas con otras. Su núcleo es pálido y por su aspecto se considera que se encuentran en una etapa de intensa proliferación y síntesis.

Otras células en número considerable son los macrófagos, que poseen un aspecto poco usual, intensamente coloreados y granuloso, lo que puede ser el resultado de la presencia de vesículas en su citoplasma, --conteniendo músculo fagocitado. Esta condición los hace difíciles de distinguir. No se observaron leucocitos polimorfonucleares.

**Neoformación vascular.** Se aprecian varios estadios en la formación de capilares. Los más tempranos formados por escasas células endoteliales y sin células en su interior presentan escaso soporte de tejido conectivo. Otros capilares se encuentran plenamente constituidos y con células en su interior.

**Deposito de sustancia intercelular y fibras.** Gran cantidad de sustancia y tenues fibras producidas por fibroblastos en plena síntesis se observan rodeando -



los bordes de la herida, en donde han tomado el lugar de las fibras musculares en degeneración (las fibras de colágena son tenues y no han adquirido independencia de los fibroblastos que las forman; por ello se reconoce que son inmaduras y que los fibroblastos se encuentran en estado de síntesis.

Algunas fibras de colágena maduras se pueden observar rodeando los pequeños capilares neoformados.

#### Rana 4 días después de la lesión.

Aspecto del músculo. Se pueden observar gran cantidad de fragmentos de músculo que presentan entre ellos espacios vacíos. En otras regiones y presumiblemente representando un estadio más avanzado en el proceso de degeneración, fibras musculares de aspecto hialino se encuentran debilmente coloreadas.

El proceso de desintegración del músculo no es homogéneo y algunas fibras aun cercanas al lugar preciso de la lesión aparecen menos afectadas que otras más lejanas.

No se observa una vacuolización de la masa hialina como en el caso del músculo del conejo (fig. 17):

Actividad celular. En esta etapa existe un aumento notable en la cantidad y tipos de células cerca de la lesión. Es particularmente notable la presencia de células blastémicas formando una prominencia semejante a una blastema de regeneración de miembros amputados en otras especies de anfibios epimórficos.

Muy asociadas al músculo en degeneración se aprecian macrófagos en gran número, algunos de los cuales muestran restos de material basófilo en su citoplasma.

Se observan también gran cantidad de neutrófilos y basófilos, que se aprecian claramente en la técnica

con H.E.

Los fibroblastos son aun células que colorean debilmente y su citoplasma parece continuo con algunas -- prolongaciones fibrosas; es evidente gran actividad de fibroplasia (fig.18).

Neoformación vascular. Además de los grandes vasos observados en el estadio anterior, pueden distinguirse algunos de pequeño calibre, en los cuales se aprecia un incremento notable en las células endoteliales que los forman.

Depósito de sustancia intercelular y fibras. Se aprecia gran cantidad de sustancia intercelular y fibras muy delgadas sobre la superficie de la herida, la cuál adquiere una coloración violeta con la técnica de Masson-azul de anilina. Hacia adentro las fibras asociadas al músculo en degeneración son más gruesas y ondulantes que representan fibras de colágena maduras, por lo que colorean de azul

#### Conejo 8 días después de la lesión.

Aspecto del músculo. Solo algunos cúmulos pequeños de material muscular se aprecian entre los haces de fibras colágenas distribuidas extensamente. Se trata de material hialino coloreado debilmente y extremadamente irregular. El músculo cercano a la herida se distingue también comparativamente pálido.

Actividad celular. La cantidad de células ha disminuido notablemente. Principalmente se observan fibroblastos, muchos de los cuales, completamente maduros son pequeños y se colorean fuertemente, además de encontrar

se separados de las fibras de colágena. Muchos aun son células grandes y de color pálido, cuyo citoplasma parece continuo con las fibras de tejido conectivo (fig.19). Se observan también eritrocitos en el interior de los vasos neoformados y algunos macrófagos.

Neoformación vascular. La cantidad de vasos neoformados ha aumentado. Se encuentran distribuidos ampliamente, rodeados de alguna cantidad de fibras de colágena. Su tamaño es variable, aunque en su mayoría son muy pequeños y en su interior solo se observan algunas células.

Depósito de sustancia intercelular y fibras. Pueden observarse gran número de fibras de colágena maduras que han adquirido independencia de los fibroblastos, son extensas, gruesas y ondulantes, generalmente asociadas a otras que van paralelas. Algunas otras fibras son muy cortas y su disposición y dirección son muy irregulares, no han adquirido total independencia de los fibroblastos que las forman, los cuales también se encuentran desordenadamente.

#### Rana 8 días después de la lesión.

Aspecto del músculo. Se distingue el músculo en estado de degeneración avanzada.(fig. 21).

Actividad celular. En esta etapa por primera vez es posible observar células epiteliales dispuestas en la superficie de la herida, agrupadas formando un estrato (de)ligeramente estratificado; en algunos lugares el numero de celulas aumenta mientras en otros disminuye, siendo en su mayoría irregular.

Por debajo del epitelio, continúan predominando en gran número células blastémicas inmersas en un soporte de fibras reticulares muy laxas, formando una prominencia aun mayor que en el estadio anterior.

La cantidad de macrófagos ha aumentado notablemente, mientras que neutrófilos, basófilos y células polimorfonucleares casi han desaparecido del área.

Algunos linfocitos pequeños se alcanzan a distinguir distribuidos aisladamente.

Neoformación vascular. La cantidad de capilares ha aumentado considerablemente, aunque no en la proporción que para el mismo caso en el conejo, pero sí siempre de mayor calibre.

Es particularmente notable la irregularidad en la forma de los capilares neoformados, que además ostentan en su interior una gran cantidad de células, la mayoría eritrocitos.

Depósito de sustancia intercelular y fibras. Las fibras de color violeta observadas con la técnica de Masson en el estadio anterior han comenzado a tomar el color azul característico de las fibras colágenas, además de que se han vuelto más conspicuas.

Una fina maya de fibras reticulares sirve de soporte a las células blastémicas, cerca del borde de la herida donde también se encuentran en contacto con el epitelio que cubre la herida. Alguna sustancia amorfa se puede observar también en el área.

#### Conejo 15 días después de la lesión.

Aspecto del músculo. El músculo ha desaparecido casi por completo del área lesionada y ha sido sustituida

por gruesas fibras colágenas.

Los bordes de las fibras musculares cercanas se encuentran aun asociadas a macrófagos activos, sin embargo en terminos generales el músculo contiguo a la lesión ha recuperado su aspecto normal.

En el borde de la herida donde existe más cantidad de tejido conectivo ya no se aprecian fibras musculares ni músculo hialinizado.

Actividad celular. Las células predominantes son fibroblastos maduros que han adquirido independencia de las fibras colágenas, se notan extremadamente alargados e intensamente teñidos; en algunos casos se puede apreciar exclusivamente su núcleo entre una gran cantidad de tejido conectivo, condición que representa el último estado de la actividad fibroblastica, en la cuál las células sufren un proceso de involución.

Otras células que es posible distinguir son macrófagos distribuidos más extensamente cerca de los bordes de la herida.

No se observa ningún otro tipo de célula, a excepción de algunos eritrocitos dentro de los vasos capilares. (fig. 24).

Neoformación vascular. Los vasos capilares son escasos en el lugar donde predomina el tejido conectivo denso, sin embargo en otras áreas donde es más laxo se pueden apreciar algunos vasos en la vecindad de los últimos restos de músculo en degeneración. Todos se encuentran completamente constituidos y la presencia de células en su interior demuestra que ya han adquirido circulación.

Depósito de sustancia intercelular y fibras. La -

cantidad de tejido conectivo ha proliferado a tal grado que constituye una prominencia o cayo dispuesto sobre la superficie de la herida. La mayoría de las fibras -- que lo forman han adquirido independencia de los fibroblastos y se muestran gruesas y compactas; ésta condición es la que predomina en la mayor parte del área.

Cercanas a los bordes del músculo seccionado las fibras son más laxas y no están dispuestas ordenadamente, por lo que dejan notar espacios vacíos en los que puede observarse alguna cantidad de sustancia amorfa.

#### Rana 15 días después de la lesión.

Aspecto del músculo. Las partes terminales del músculo seccionado han recuperado su aspecto normal y contiguas a ellos se observan numerosas células blastemáticas. En otras partes algunas fibras musculares aparecen contiguas con el citoplasma de numerosos mioblastos.

Las fibras musculares se distinguen de las de colágena por el color del contraste en las técnicas de Masson y P.T.A.H.

Actividad celular. La cantidad y tipos de células ha seguido en aumento son especialmente notables las células epiteliales, dispuestas en un estrato que ha aumentado en grosor. Las células que le siguen en abundancia son los mioblastos, fusiformes y continuos con fibras que tiñen con las coloraciones del músculo esquelético. Se encuentran dispuestas en cúmulos de varias células cuyo citoplasma se anastomosa. Las células blastemáticas han disminuido en proporción y se observan estrechamente unidas en las zonas terminales del músculo lesionado. Otras células como fibroblastos y macrófagos -- también se observan, aunque en poca cantidad y sin arre

glo definido. No se observan células polimorfonucleares

Neoformación vascular. Cerca del estrato epitelial se pueden distinguir numerosos vasos de gran calibre, - que son notables sobre todo por la cantidad de células endoteliales que los constituyen.

Depósito de sustancia intercelular y fibras. Alguna cantidad de fibras de colágena se distinguen en las partes terminales del músculo al igual que en el estrato de células epiteliales.

b] Cambios observados en las poblaciones celulares en - cada estadio.

A continuación se muestran las graficas con las -- proporciones de nueve tipos de células a los 2,4,8 y 15 días.

Se cuantifican las células de 10 campos utilizando el objetivo seco fuerte (40x). El total de células representa el 100% de cada estadio y la cifra para cada - tipo de célula representa el porcentaje correspondiente.

Se utilizan las siguientes abreviaturas.

- FIBLS - FIBROBLASTOS
- MACGS - MACROFAGOS
- C.PN. - CELULAS POLIMORFONUCLEARES
- NEOCPS - NEOCAPILARES
- C. ENDTLS - CELULAS ENDOTELIALES
- C. EPITLS - CELULAS EPITELIALES
- ERITS - ERITROCITOS
- C. BLAST - CELULAS BLASTEMICAS
- MIOBLS - MIOBLASTOS

Figura 1. Proporción de células en la lesión del músculo de conejo 2 días después de producida.

100% = 685 células. 10 campos (objetivo 40x).

FIBLS MACGS C. PN. NEOCPS C.ENDOTLS C.EPITLS ERITS C.BLAST MIOBLS

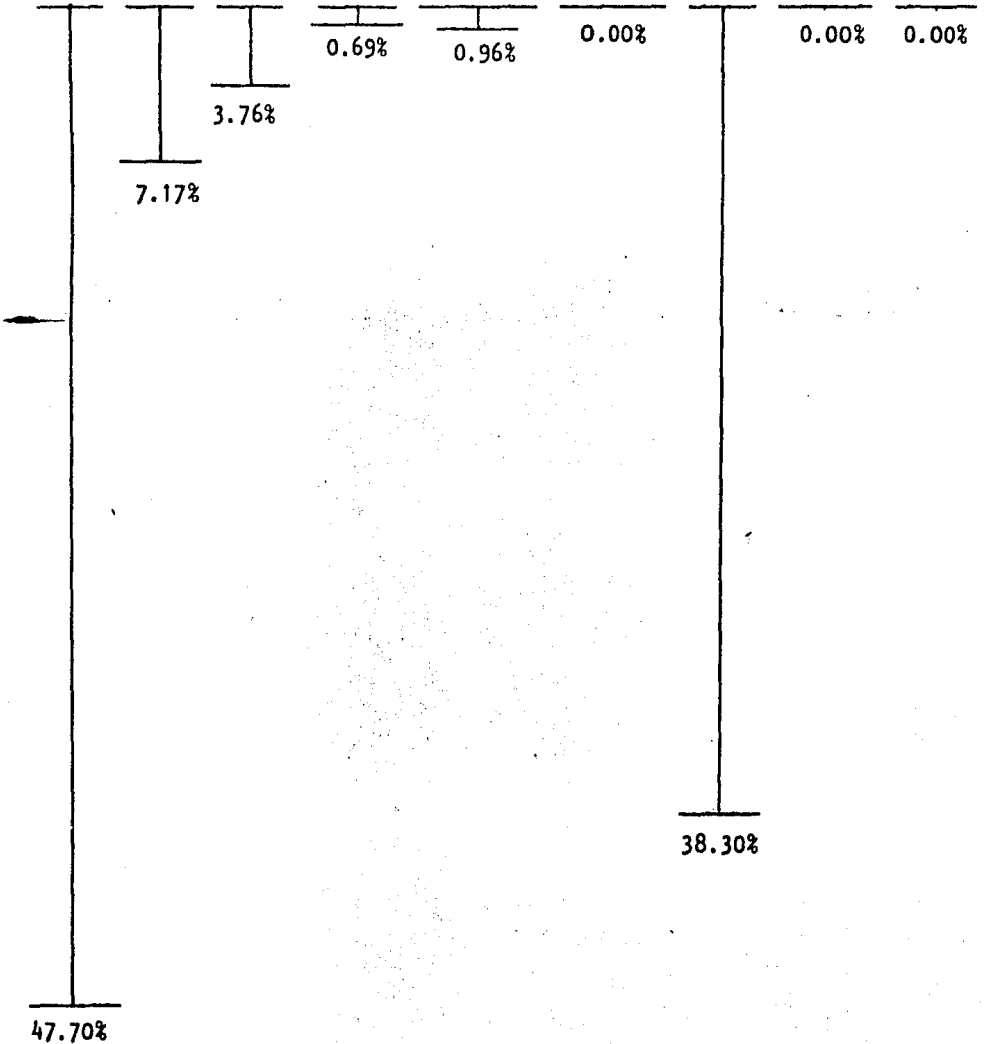




Figura 2. Proporción de células en la lesión del músculo de rana 2 días después de producida.

100% = 214 células. 10 campos (objetivo 40x).

FIBLS MACGS C. PN. NEOCPS C.ENDOTLS C.EPITLS ERITS C.BLASTS MIOBLS

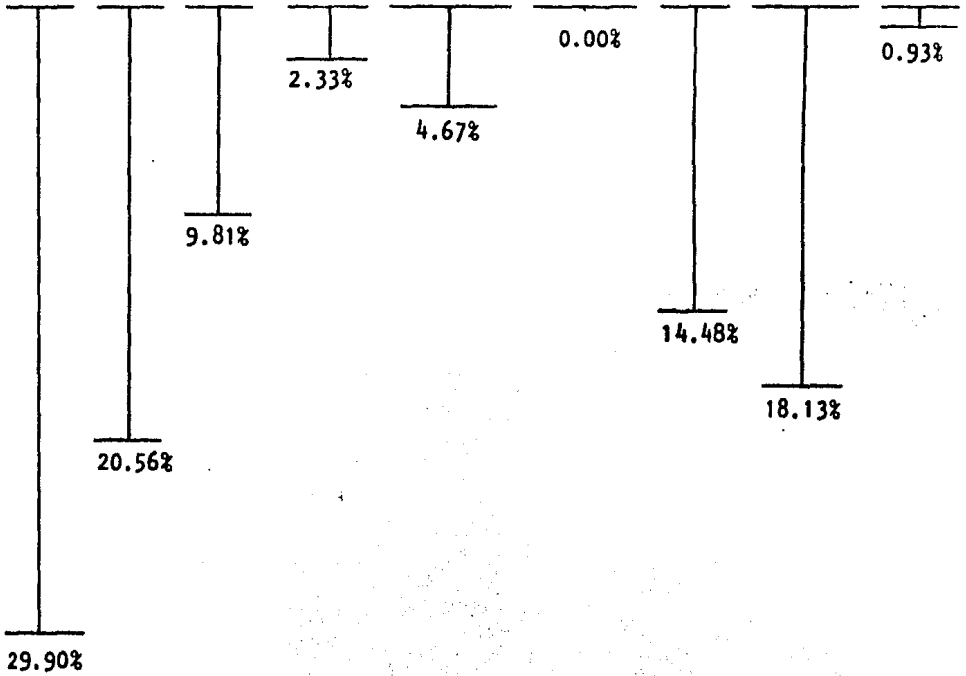


Figura.3. Proporción de células en la lesión del músculo de conejo 4 días después de producida.  
100% = 650 células. 10 campos (objetivo 40x).

FIBLS MACGS C. PN. NEOCPS C.ENDOTLS C.EPITLS ERITS C.BLAST MIOBLS

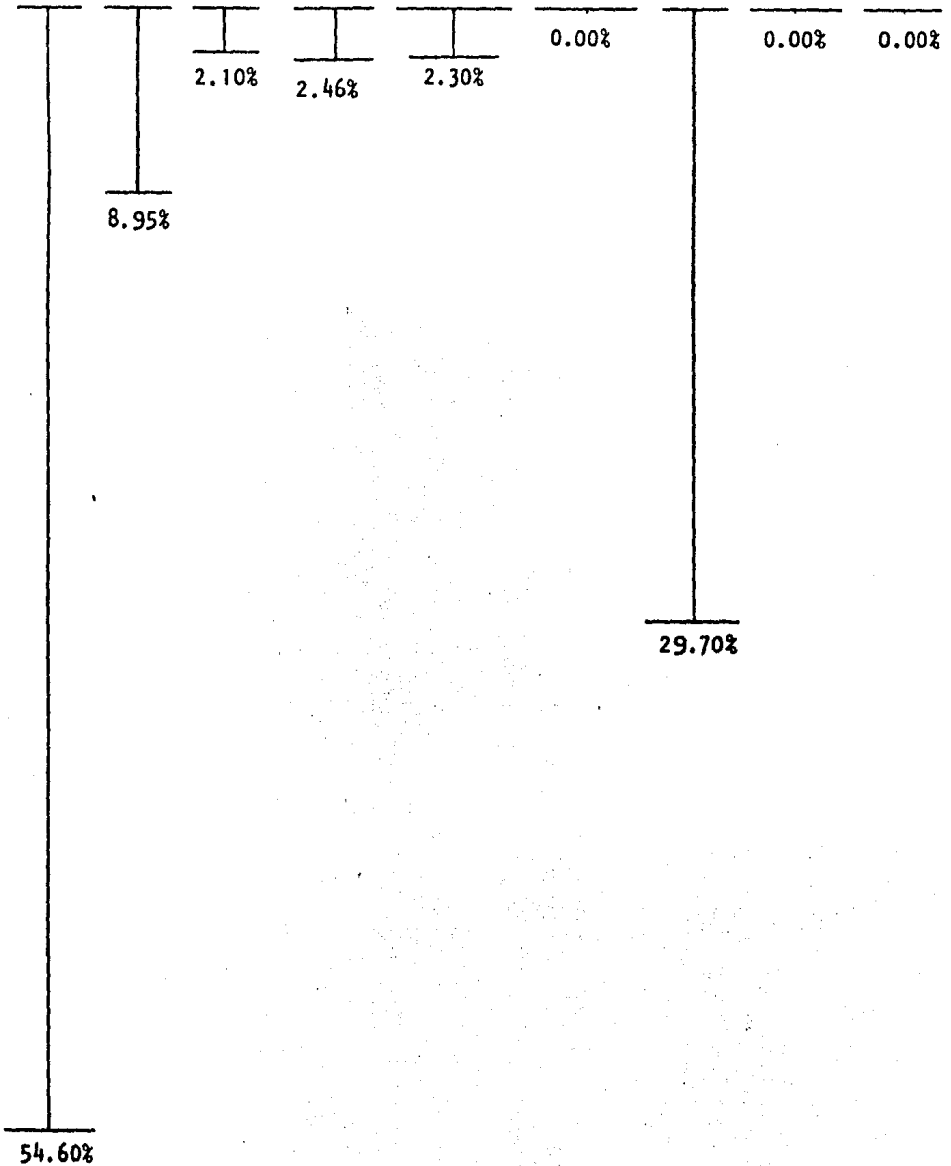


Figura 4. Proporción de células en la lesión del músculo de rana 4 días después de producida

100% = 414 células. 10 campos (objetivo 40x)

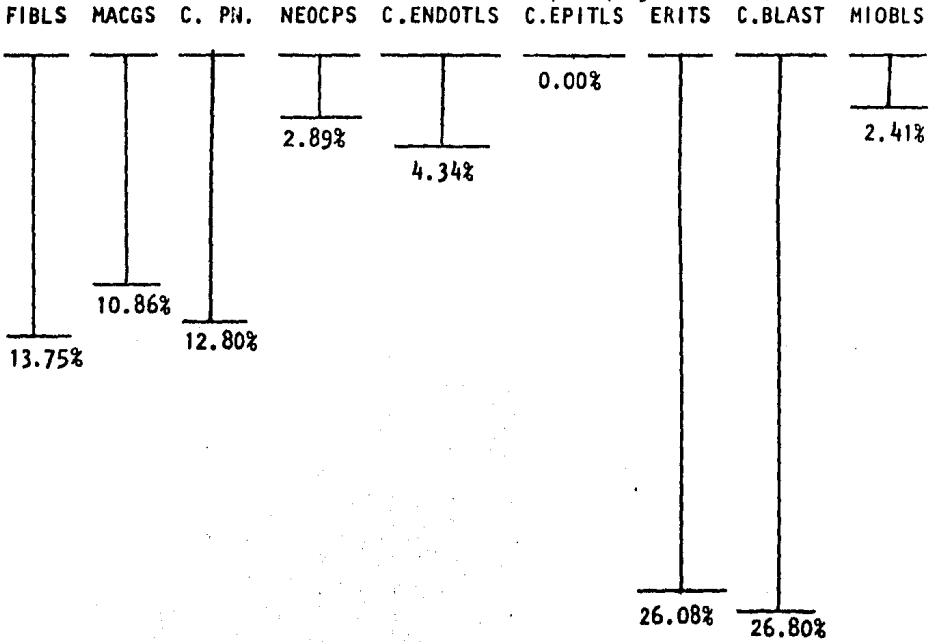


Figura 5. Proporción de células en la lesión del músculo de conejo 8 días después de producida.  
 100% = 1014 células. 10 campos (objetivo 40x).

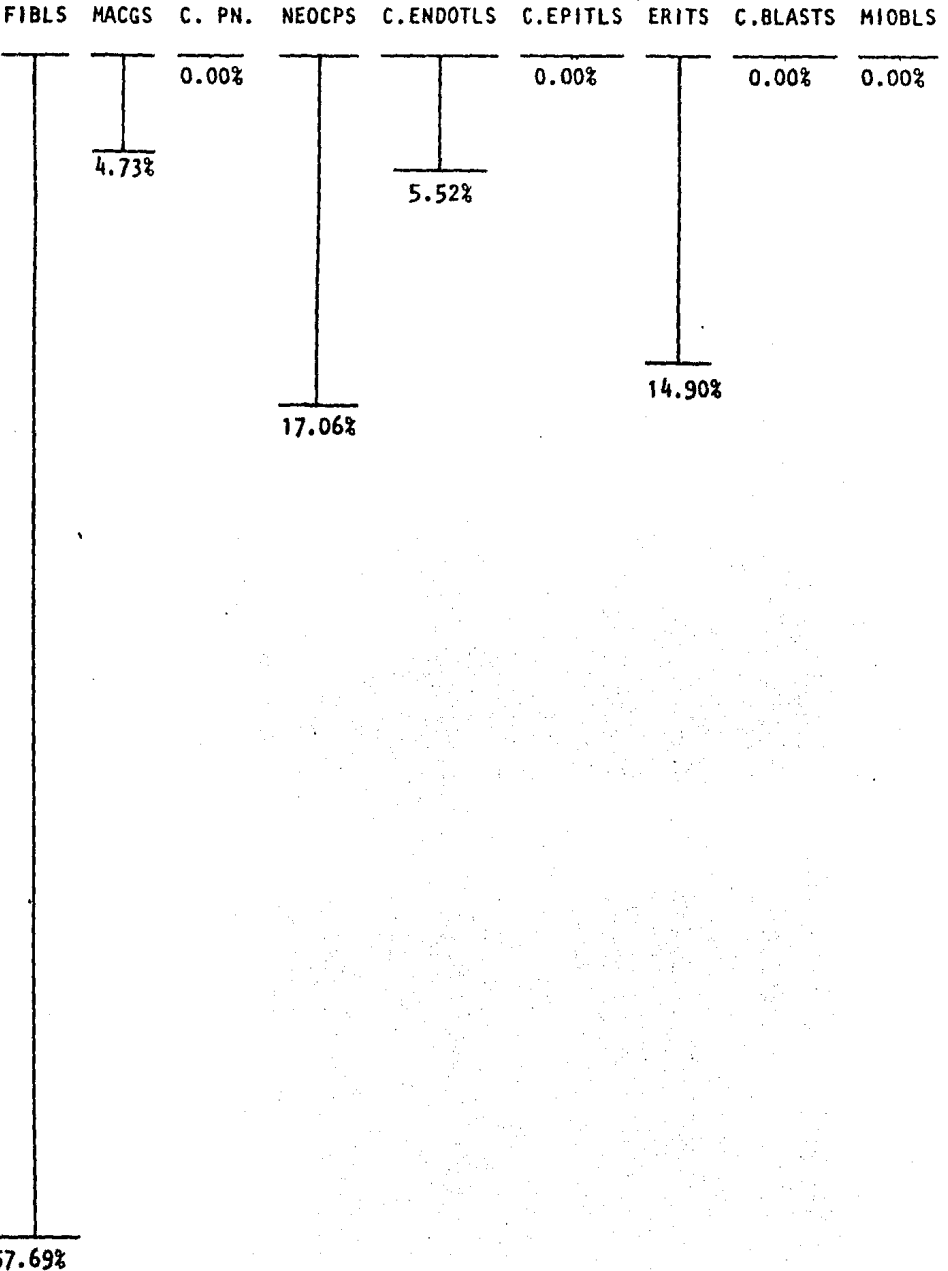


Figura 6. Proporción de células en la lesión del músculo de rana 8 días después de producida.

100% = 934 células, 10 campos (objetivo 40x).

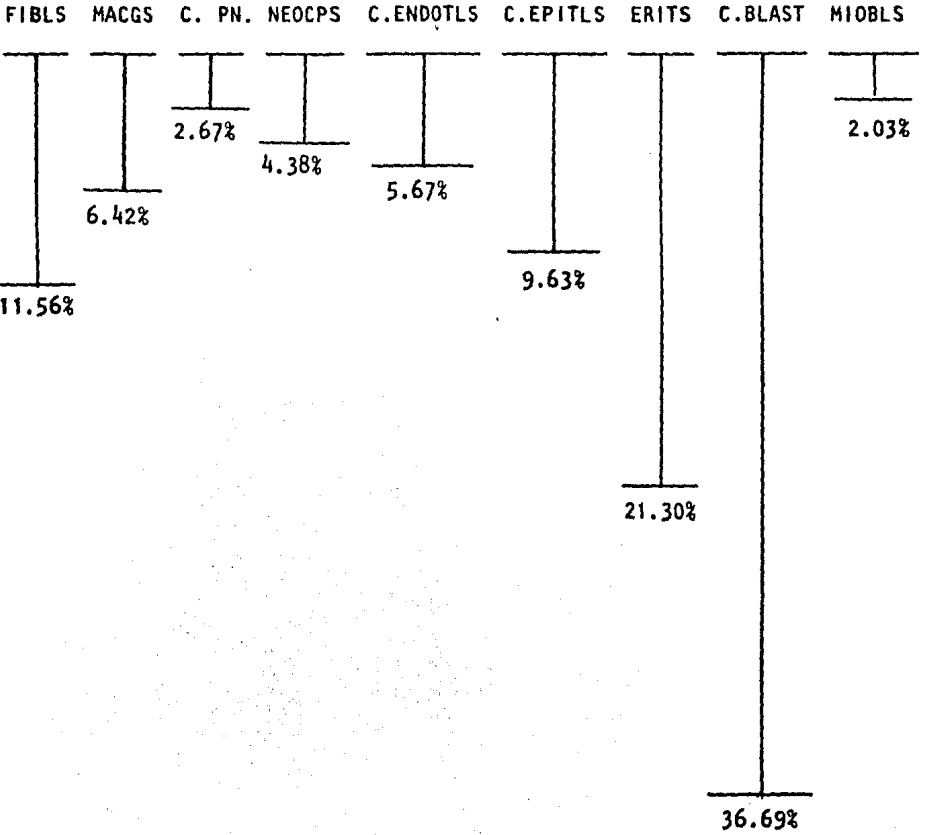


Figura 7. Proporción de células en la lesión del músculo de conejo 15 días después de producida.  
 100% = 482 células. 10 campos (objetivo 40x).

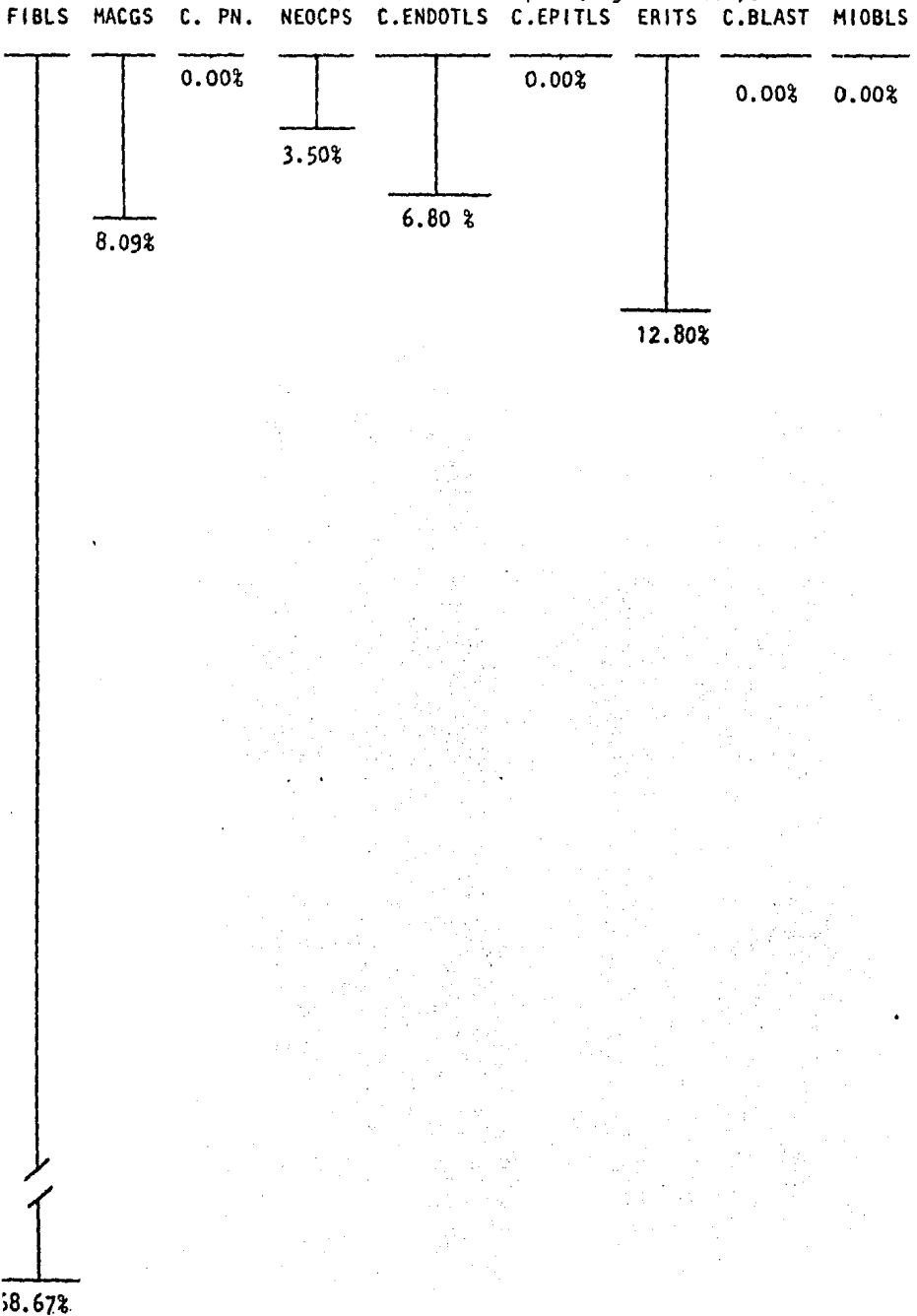
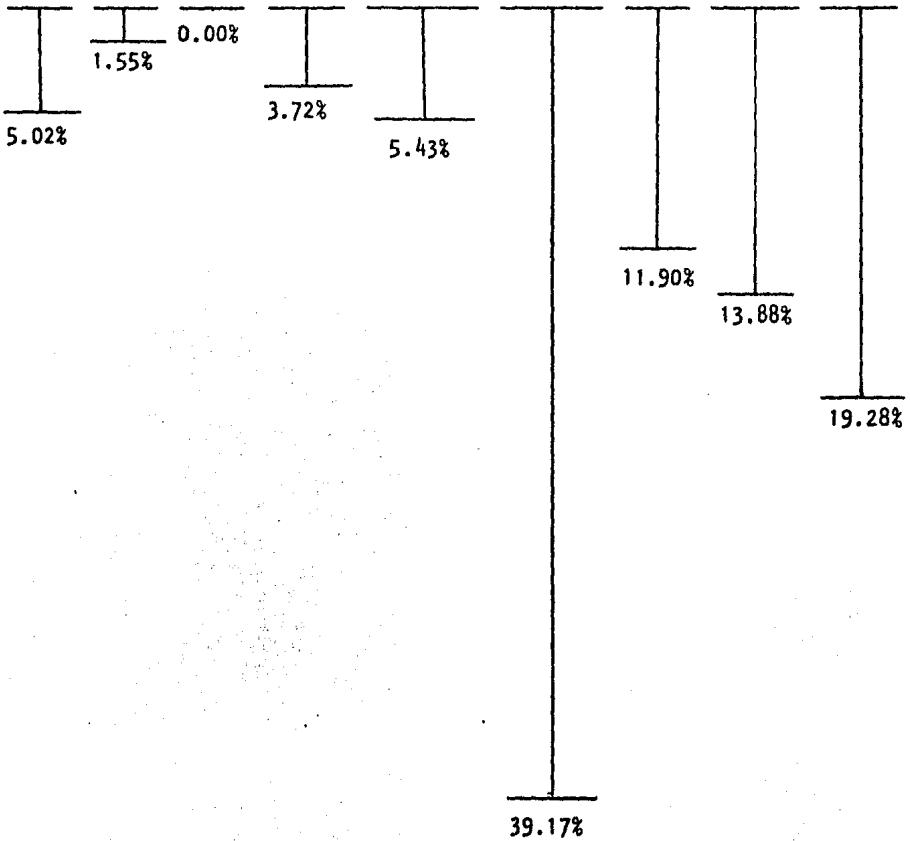


Figura 8. Proporción de células en la lesión del músculo de rana 15 días después de producida.

100% = 2626 células. 10 campos (objetivo 40x).

FIBLS MACGS C. PN. NEOCPS E.ENDOTLS C.EPITLS ERITS C.BLAST MIOBLS







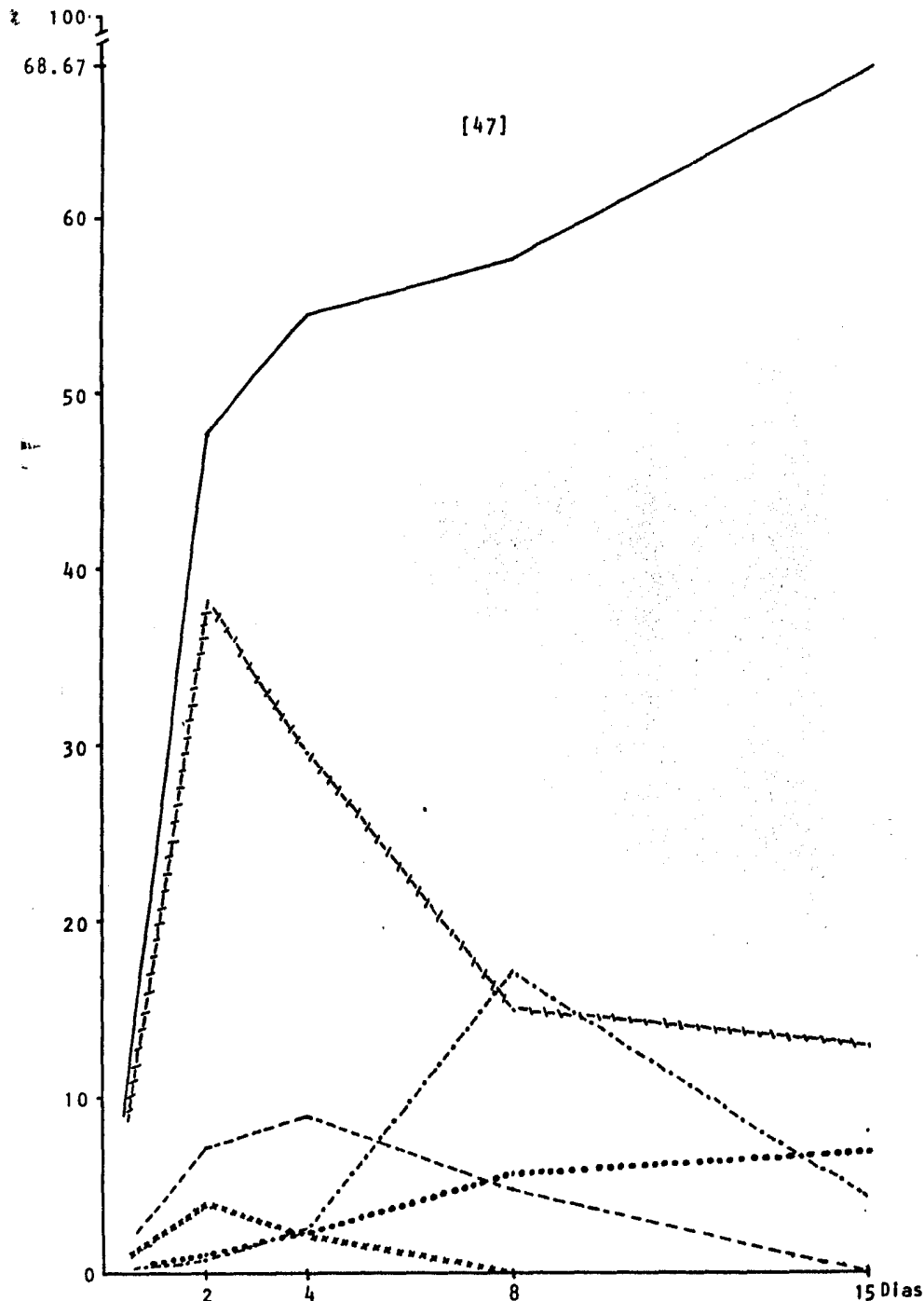


Fig.9 Variación temporal de la proporción de células durante el proceso restaurativo en conejo.

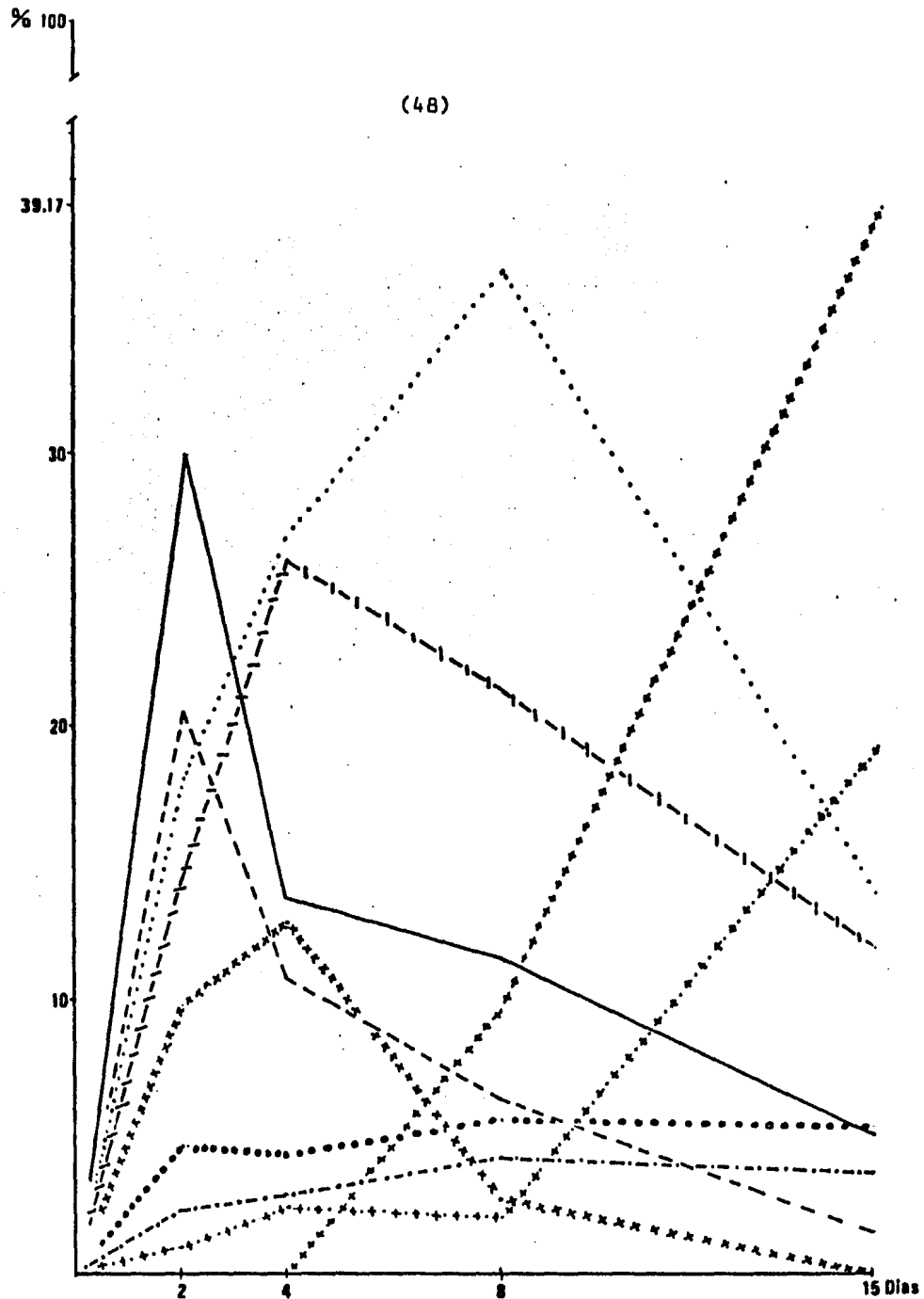


Fig. 10 Variación temporal de la proporción de células durante el proceso restaurativo en rana.

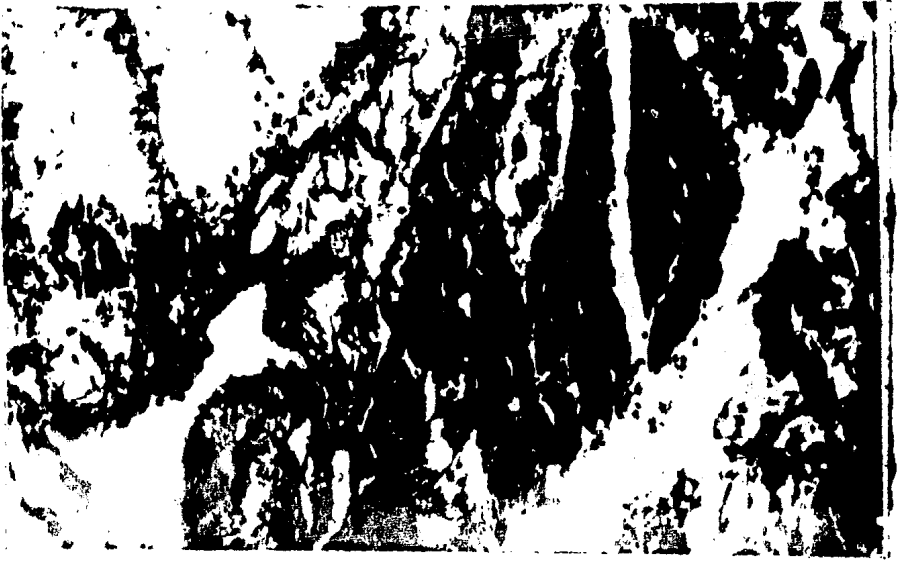


Fig. 11 Microfotografía (150x) del área de la lesión en el músculo de conejo 2 días después de producida. Algunas fibras se encuentran disgregadas, mientras otras están en pleno estado de degeneración hialina. (técnica: Masson).

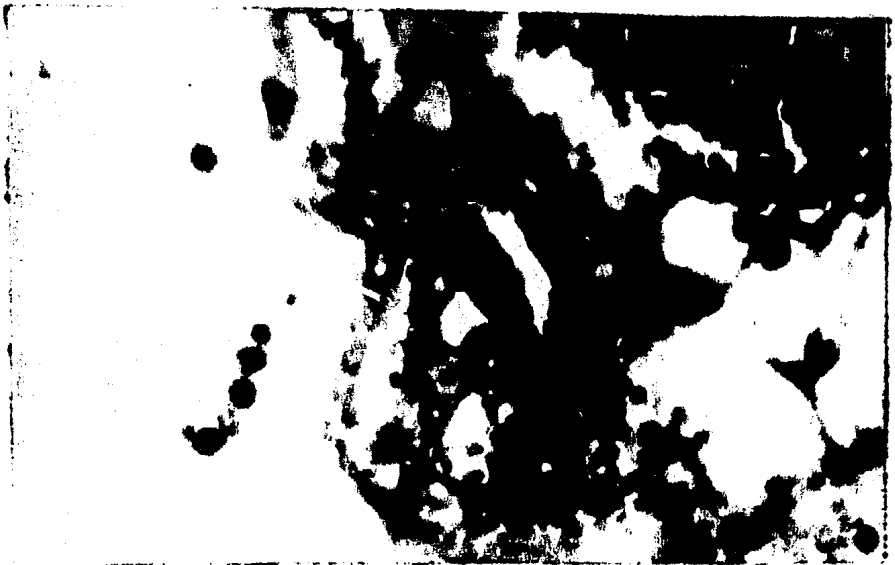


Fig. 12 Microfotografía (1600x) del músculo de conejo 2 días después de producida la lesión. Se observan macrófagos asociados al músculo en degeneración, algunos fibroblastos emitiendo fibras laxas y numerosos eritrocitos. (técnica: Masson).

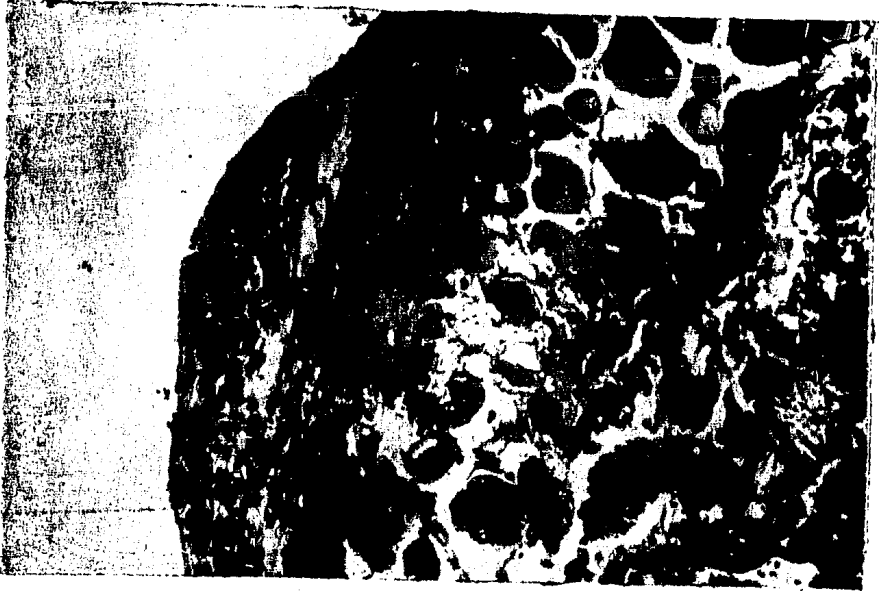


Fig. 13 Microfotografía (150x) de la lesión del músculo de rana 2 días después de producida. Al centro se aprecian las fibras musculares algo contraídas y plegadas sobre sí mismas en la zona terminal. (técnica: Masson).

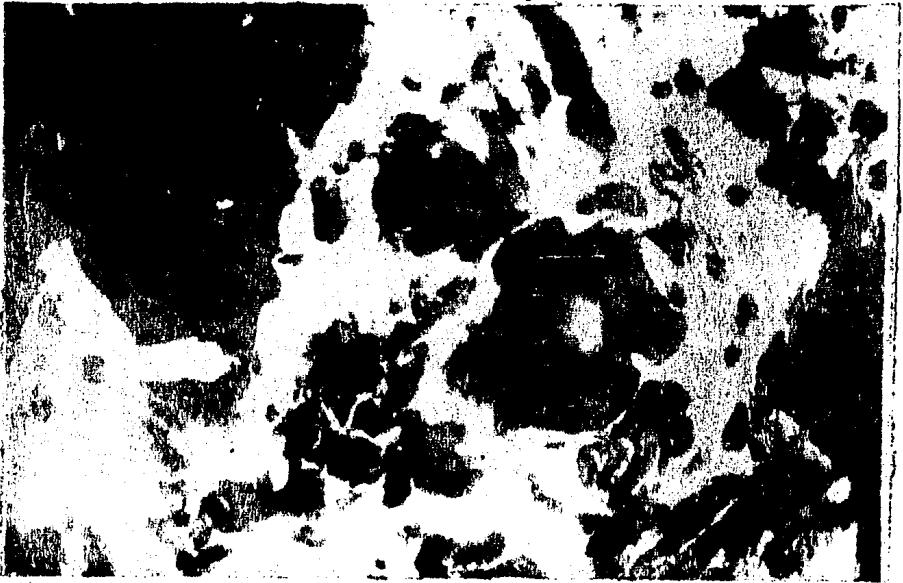


Fig. 14 Microfotografía (1600x) del área de la lesión en músculo de rana 2 días después de producida. Se observan numerosas células polimorfonucleares y macrófagos. Algunas fibras aisladas de tejido conectivo se pueden apreciar (técnica: P.T.A.H.).



Fig. 15 Microfotografía (150x) del borde de la herida en músculo de conejo 4 días después de producida. El músculo ha tomado aspecto vacuolado y ésta siendo sustituido por tejido conectivo (técnica: Masson).

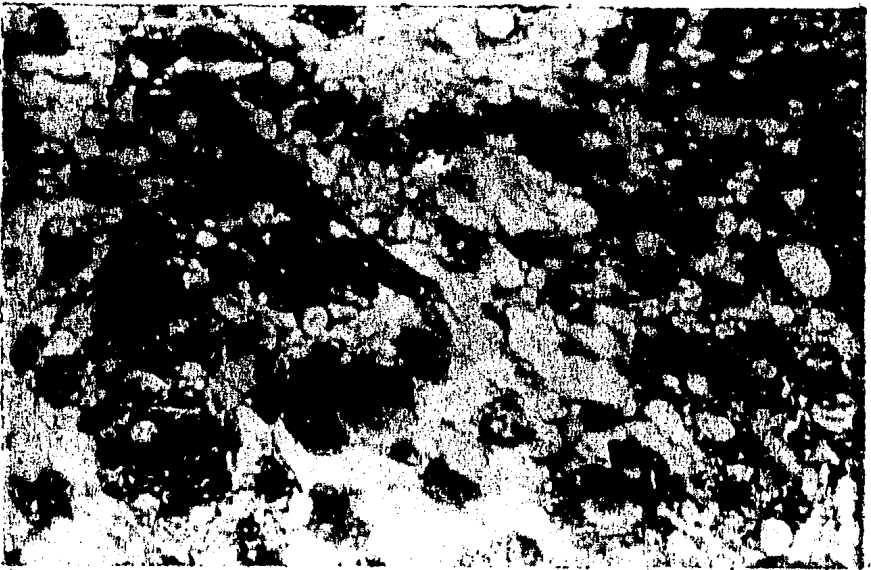


Fig. 16 Microfotografía (1600x) de la zona lesionada en músculo de conejo a los 4 días. Se puede observar una intensa vacuolización del músculo en un estado avanzado de la degeneración hialina. Se aprecia gran cantidad de fibroblastos en estado de fibroplasia. (técnica: Masson).



Fig. 17 Microfotografía (150x) de la lesión de músculo de rana 4 días después de producida. Se aprecia a la izquierda el borde formado por células blastémicas. A la derecha el músculo continúa en estado de degeneración. (técnica: P.T. H.).



Fig. 18 Microfotografía (150x) de la lesión en músculo de rana 4 días después de producida. Se observa el músculo en degeneración y numerosas células fagocitarias. (técnica: P.T. H.).

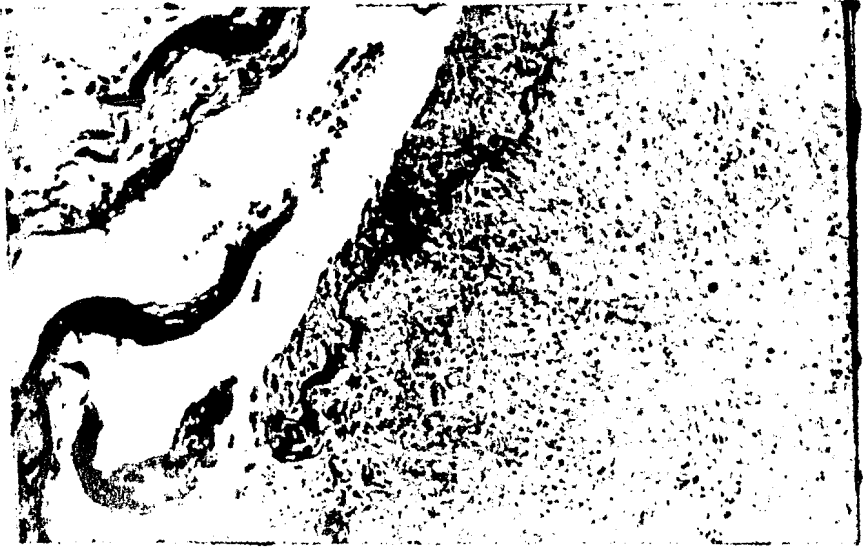


Fig. 19 Microfotografía (150x) del área de la lesión en músculo de conejo 8 días después de producida. Se observan gran cantidad de tejido conectivo y fibroblastos, así como numerosos vasos capilares. (técnica: Masson).

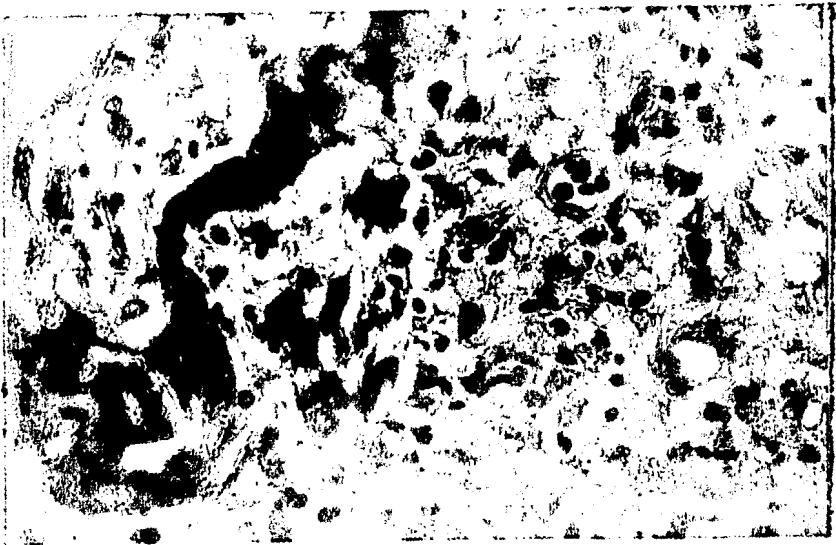


Fig. 20 Microfotografía (1600x) de la lesión en músculo de conejo 8 días después de producida. Son evidentes gran cantidad de capilares, escaso músculo y numerosas fibras de tejido conectivo. (técnica: Masson).

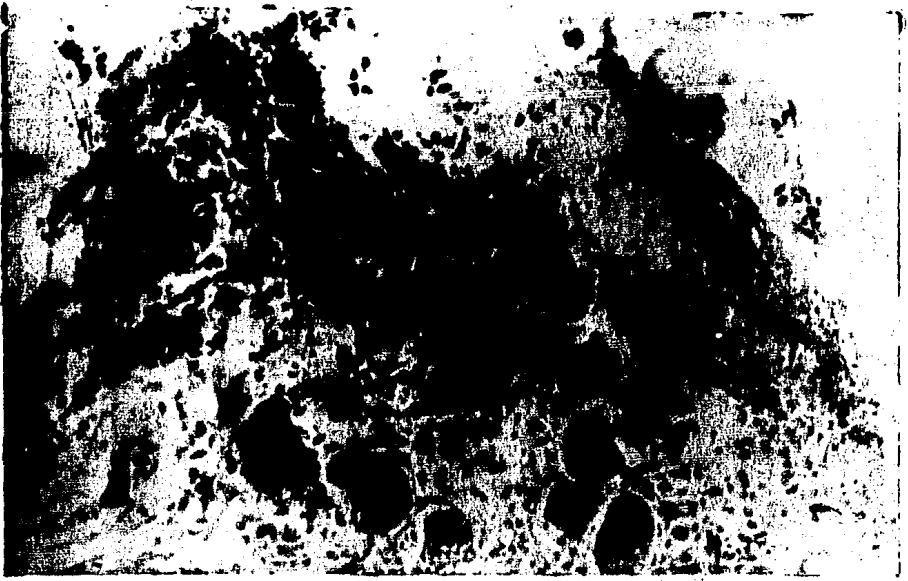


Fig. 21 Microfotografía (150x) de la lesión en músculo de rana 10 días después de producida. Las células blastémicas han aumentado en número y por encima del borde se empiezan a distinguir células epiteliales (derecha arriba) (técnica: Giemsa).

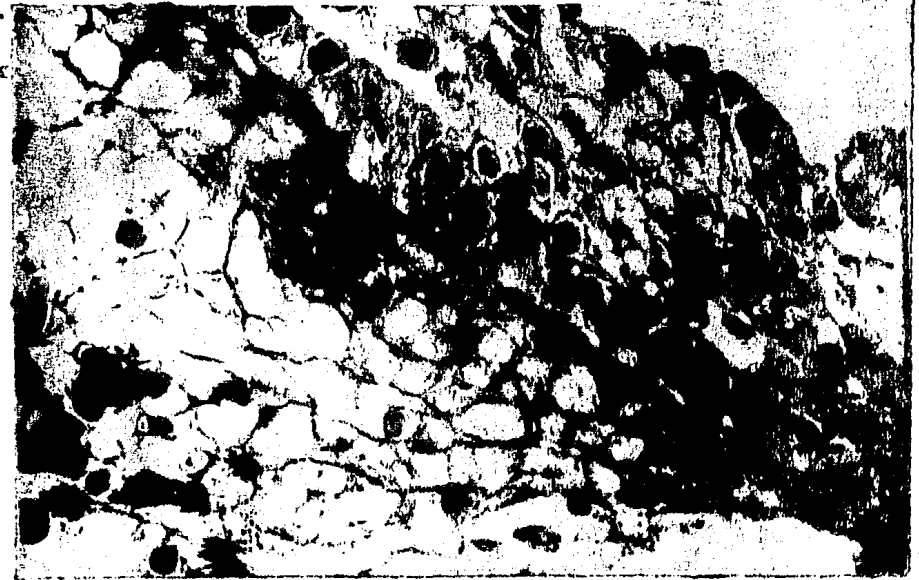


Fig. 22 Microfotografía (1600x) de la lesión en músculo de rana 10 días después de producida. Se aprecia un estrato de células epiteliales por encima de la blastema de regeneración separadas por una lámina basal teñida más intensamente. A la izquierda pueden distinguirse algunas células blastémicas. (técnica: P.T.A.H.).





**Fig. 23** Microfotografía de poco aumento (10x) del área en la lesión de músculo de conejo 15 días después de producida. Se aprecia el "cayo" de tejido conectivo que hace saliente en el lugar de la lesión. (técnica: P.T.A.H.).



**Fig. 24** Microfotografía (1600x) del área de la lesión en músculo de conejo 15 días después de producida. Se observan numerosos fibroblastos maduros (fibrocitos), algunos capilares y gran cantidad de fibras colágenas.



Fig. 25 Microfotografía de poco aumento (10x) de la lesión en músculo de rana, 15 días después de producida. El epitelio se ha extendido hasta formar un collar sobre el borde de la herida, a la vez que ha aumentado su espesor. (técnica: T.A.H.).



Fig. 26 Microfotografía (150x) del epitelio de la herida y anexos de la lesión en músculo de rana 15 días después de producida. Se observa por debajo del epitelio, numerosos vasos capilares, mioblastos y fibras musculares de nueva formación. (técnica: Giemsa).



Fig. 27 Microfotografía (1600x) de un grupo de mioblastos en la lesión del músculo de rana 15 días después de producida (técnica: Hematoxilina-eosina).

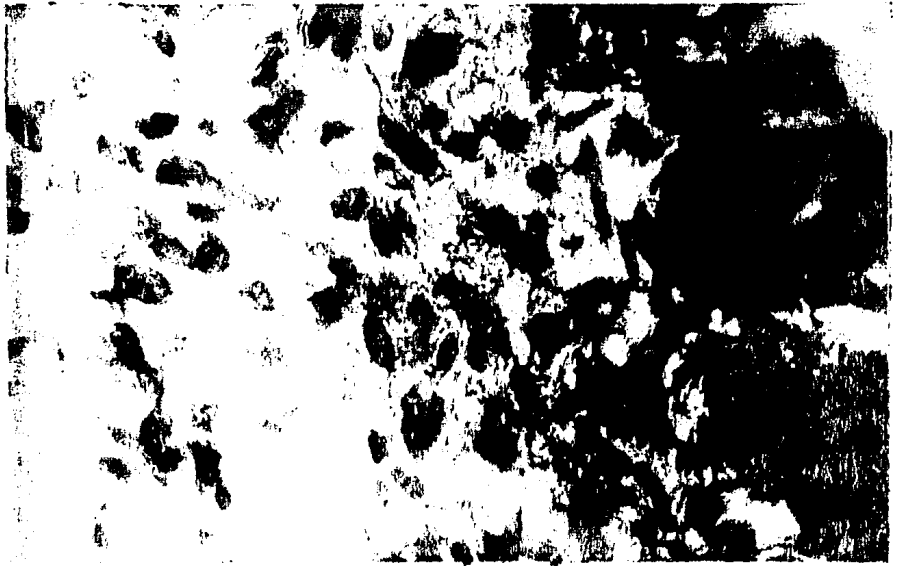


Fig. 28 Microfotografía (1600x) de la lesión del músculo de rana 15 días después de producida. A la izquierda se advierten células blastémicas, estrechamente asociadas a los bordes terminales del músculo seccionado (derecha) (técnica: Masson).

## 6.- DISCUSION.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el fenómeno conocido como reparación por cicatrización y que tiene una duración aproximada de 15 días, se lleva a cabo en el músculo de conejo de forma similar que para otros tejidos en los cuales existe tejido conectivo, y en el cuál pudieron distinguirse 4 fases más o menos bien definidas que son: inflamación, fibroplasia, granulación y sustitución de tejido original por una cicatriz fibrosa.

Estas fases se encuentran relacionadas causal y cronológicamente, y pueden delinearse a partir de la observación en la variación y proporción de células a lo largo del proceso de cicatrización.

La fase inflamatoria, la que se presenta en los primeros días de producida la lesión, está caracterizada por la presencia de células polimorfonucleares y macrófagos (fig. 1). La permanencia de las células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos es relativamente corta, por tratarse de una herida aséptica, poco traumática y porque estas células no participan activamente en el cierre de la herida (Simpson & Ross, 1971). Después del segundo día en donde fueron más numerosos - descienden hasta desaparecer alrededor del octavo día. Los macrófagos tuvieron una respuesta más fuerte a la fase inflamatoria y persistieron a lo largo de todo el proceso. Su número llega al máximo a los 4 días de producida la lesión, participando activamente en la fase inflamatoria y de intensa fagocitosis de los debris tisulares. A partir del cuarto día su número desciende y permanece más o menos estable hasta la cicatrización. La razón de ésta permanencia obedece posiblemente a dos factores: primero, los macrófagos están adaptados para

hacer fagocitosis de desechos celulares que quedan en la región aun cuando desaparesca la fase inflamatoria [Ham, 1975], y segundo, su presencia es necesaria en la inducción de fibroplasia y proliferación de la población de fibroblastos en ascenso [Diegelman, et.al., 1981].

La fase inflamatoria desaparece completamente a los 8 días de iniciado el proceso y en éste tiempo, el aspecto microscópico de la herida revela la presencia del tejido de granulación, al aparecer el área enrojecida. De ésta forma se inicia la fase vascular o de granulación, representada por los capilares de nueva formación y las células endoteliales (fig. 5), los cuales tienen en ése estadio su número máximo. Su presencia se encuentra asociada a la necesidad de un aporte sustancial de nutrientes y oxígeno al área, para satisfacer los requerimientos de los fibroblastos en síntesis activa. Sin embargo las causas de su rápida aparición y desaparición no se han definido satisfactoriamente [Correa, et.al., 1973].

La fase de fibroplasia, representada por los fibroblastos de la herida, no parece tener un punto temporal característico, sino más bien un continuo ascenso desde los primeros días de producida la lesión (fig. 9). En el segundo día, la mayor proporción de fibroblastos es evidente y de ahí en adelante su número siempre irá en aumento. Al cuarto día es cuando inician su función de síntesis de fibrillas intersticiales y se inicia en sí la fase de fibroplasia que alcanza su máximo a los 8 días de iniciado el proceso, coincidiendo con el predomnio del tejido de granulación.

Casi concluida la cicatrización, la proporción de fibroplasia ha concluido y las fibras colágenas plenamente constituidas han adquirido independencia. Los fi-

broblastos transformados ahora en fibroцитos han cesado su actividad de síntesis y han adquirido aspecto fusiforme (fig. 24).

Sobre la lesión en el músculo y representando la última fase en la cicatrización, el tejido conectivo formado constituye un cayo o saliente que ha llenado el hueco de la herida y sustituido al tejido original (fig. 23).

A pesar de que se reconoce ampliamente el poder regenerativo del músculo esquelético en mamíferos, se acepta que se encuentra limitada a lesiones pequeñas en las cuales no prolifera el tejido conectivo de forma considerable y que el proceso puede durar varios meses o aun años [Vorontzova, 1960].

Es común encontrar en la literatura autores que niegan la presencia de capacidad de regeneración de las fibras musculares [Robbins, 1973].

En el tiempo que duró la cicatrización de la herida en el presente trabajo, no se observó evidencia de regeneración en el músculo esquelético de conejo.

Una apreciación general de la variación y cantidad de células involucradas en la restauración de la herida sobre músculo de rana, evidencia profundas diferencias para el caso de el conejo y en contraste, una marcada semejanza con la regeneración de miembros perdidos de otras especies de anfibios epimórficos. De hecho, 3 tipos celulares plenamente identificados demuestran la presencia de poder regenerativo en la musculatura lesionada de rana, y son: las células epiteliales, las células blastémicas y los mioblastos; elementos celulares no encontrados en la reparación de músculo de conejo.

La relevancia de estos tipos celulares, radica en que han sido descritos anteriormente como los elementos clave en la regeneración de miembros amputados de anfi-

bios como el ajolote y salamandra [Thornton, 1968; --- Schmidt, 1868],

En el presente trabajo fueron identificadas las células anteriormente descritas. Las células epiteliales formaron un estrato de escasas células sobre la superficie en que se produjo la lesión muscular en rana desde los 8 días (fig. 21 y 22).

El número de células epiteliales se incremento a tal grado hacia los 15 días del proceso restaurativo que constituyeron la especie celular predominante (fig. 8), constituyendo un collar de epitelio sobre la superficie de la herida (fig. 25).

Al igual que en la regeneración de miembros perdidos de salamandra y ajolote, por debajo de las células epiteliales observadas se formó una prominencia de células blastémicas, equivalente a la blastema de regeneración (fig. 21). El número de células blastémicas llegó a su máximo a los 8 días del proceso (fig. 9), coincidiendo con la fase de granulación en la cicatrización de músculo en conejo.

Las células blastémicas pueden tener su origen en diversos tejidos del organismo, sin embargo, células mesenquimatosas de reserva pueden ser sus precursoras [Brookbank, 1978], o bien todos los tejidos encontrados en el miembro de anfibio en regeneración, bajo el estímulo de la amputación [Thornton, 1942; Hay & Fishman, 1961].

Es importante mencionar, que en el último estadio de la reparación en la rana, se observaron células blastémicas asociadas a las partes terminales del músculo seccionado (fig. 28), lo que coincide con el posible doble origen del músculo propuesto por Schmidt, es to es, a partir de células blastémicas y a su vez de mioblastos.

Los mioblastos se observaron en el presente trabajo desde los primeros estadios de la restauración de -- músculo de rana, y su número se incremento progresivamente hasta constituir las células predominantes junto con las epiteliales hacia el final del proceso.

Dentro de los demás elementos celulares involucrados en el proceso restaurativo en músculo de rana, los fibroblastos tuvieron un comportamiento opuesto a el -- del caso del conejo. A partir de una cantidad relativamente alta a los 2 días (fig. 2), su número desciende e constantemente hasta el final del proceso (fig. 10). Es te descenso, que a su vez corresponde a una menor deposición de tejido conectivo, resulta finalmente en la ausencia de una cicatriz fibrosa, y por lo tanto en la carencia de cicatrización de la herida en los terminos en la que ésta suele entenderse. Por otra parte, las cé lulas endoteliales y los neocapilares que formaron el - tejido de granulación en el conejo hacia los 8 días de iniciado el proceso de cicatrización no fueron representativos en el caso de la rana para el mismo tiempo, en el cuál lo predominante fueron las células blastemicas.

Por último, células polimorfonucleares y macrófagos a los cuales en algún momento se les ha atribuido - un papel importante en la regeneración de anfibios [Sicard, 1983], se observaron representando una fase infla matoria semejante que la descrita para el conejo, si -- bien un tanto más aguda y prolongada.

Una posible explicación para la similitud entre la regeneración de miembros perdidos en anfibios epimórficos y la regeneración de músculo esquelético en rana.

En el muñón de amputación de una especie de anfi-- bio epimórfico, quedan los remanentes de los tejidos en contrados normalmente en el miembro intacto: cartilago, hueso, músculo, etc. Estos tejidos contienen una canti-



dad determinada de células blastemáticas específicas, ya que los neoblastos son específicos para cada tejido. Al formarse la blastema de regeneración, existe una población de las células blastemáticas correspondientes a cada tipo de tejido, que interactúan unas con otras en un fenómeno similar a la inducción que se lleva a cabo en el embrión en desarrollo. Así, la diferenciación y la reorganización de las células blastemáticas que formarán los nuevos tejidos, se lleva a cabo por la interacción entre capas blastemáticas, que modulan su vía de diferenciación y crecimiento.

Al faltar una capa blastemática determinada, la inducción no se produce, no hay crecimiento de células blastemáticas y la regeneración no se lleva a cabo, como en el caso de la amputación en anuros postmetamórficos.

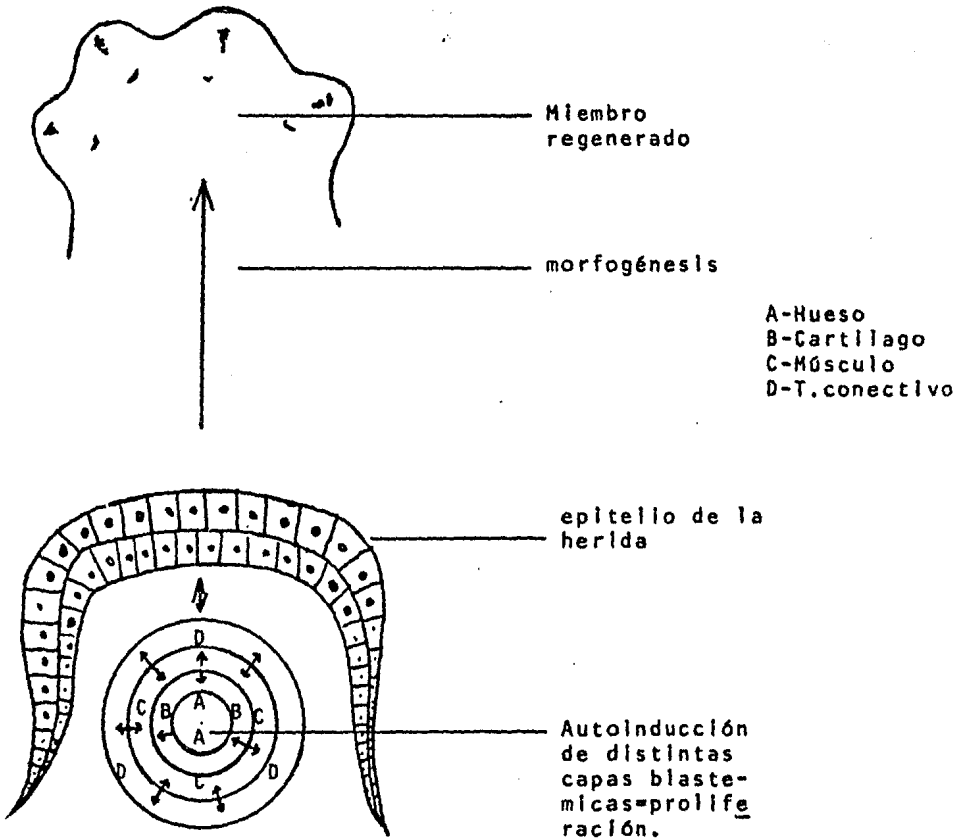
La falta de una población blastemática específica, puede obedecer a la utilización de células blastemáticas en la formación de nuevos tejidos, resultado del aumento en la complejidad y los cambios inherentes a la metamorfosis.

Esto plantea la existencia de un mosaico de células indiferenciadas, que son utilizadas durante el desarrollo de los organismos, de modo que las formas más especializadas han agotado por completo o casi por completo sus poblaciones celulares indiferenciadas.

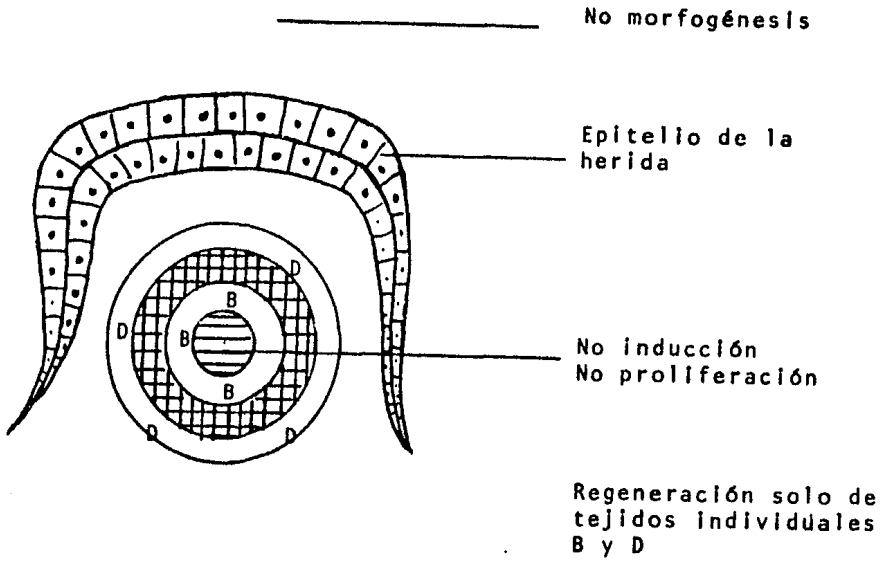
En la lesión sobre músculo esquelético de rana, se forma una blastema de regeneración, pero formada únicamente por células indiferenciadas específicas para músculo. Estas no son inducidas a proliferar por otras capas o poblaciones blastemáticas de otros tejidos y la regeneración solo podrá conducir a la formación de nuevo músculo a partir de las células blastemáticas preexistentes.

El epitelio de la herida, que dirige la morfogéne-

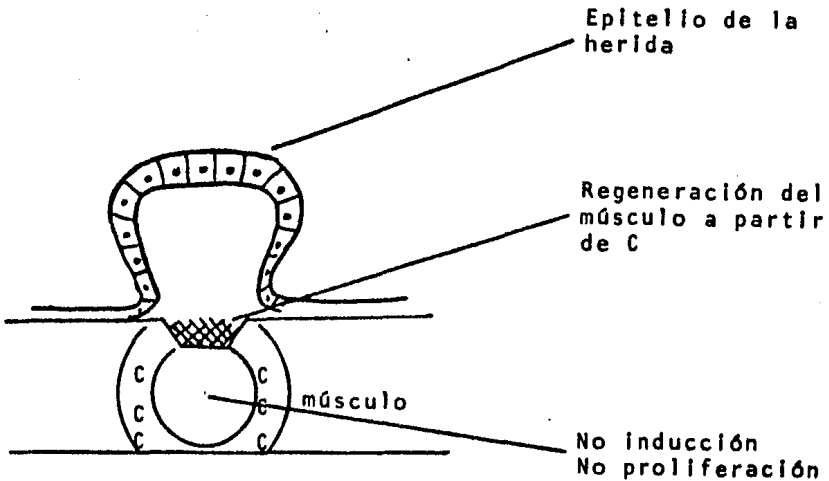
sis en la regeneración de miembros amputados, se ve influenciado por la presencia de una blastema de células musculares y crece y se multiplica de forma similar a - como si existiera una blastema normal; de ahí el crecimiento en "collar" observado en las últimas etapas de - la restauración de músculo esquelético de rana.



Regeneración de un miembro perdido en una especie de anfibio epimórfico.



Regeneración en anfibio no epimórfico.



Restauración de músculo esquelético de rana.

## 7.- CONCLUSIONES.

I.- El mecanismo por medio del cuál se restaura una lesión sobre músculo esquelético de conejo, es distinto a aquél por medio del cuál se restaura una lesión similar sobre músculo esquelético de rana.

II.- La restauración del músculo esquelético de conejo se efectúa a través del proceso de reparación por cicatrización, cuyo objetivo es restablecer la continuidad del tejido a través de la depositación de un gran número de fibras que daran finalmente lugar a la formación de una cicatriz.

III.- El músculo esquelético de rana se restaura por medio del fenómeno de regeneración, y la continuidad del tejido afectado se restablece por la formación de nuevas fibras musculares que tendran su origen en una progresiva y modulada diferenciación de otros 2 tipos celulares menos diferenciados, las células blastémicas y los mioblastos; esto implica un posible doble origen para el nuevo músculo.

Por lo tanto, la rana, un anfibio anuro que con la metamórfosis ha perdido la capacidad de regenerar miembros perdidos, conserva el poder para regenerar individualmente fibras musculares.

Además de la formación de nuevas fibras musculares el proceso de reparación del músculo de rana posee 2 importantes semejanzas con los rasgos que determinan la regeneración de miembros perdidos de especies de anfibios epimórficos como el ajolote y la salamandra, y aun los estadios larvarios de los mismos anuros, éstos es, la formación de un epitello sobre la superficie de la -

herida, y la acumulación de células blastémicas.

## 8.- APENDICE

Acido fosfotungstico 5%	
Acido fosfotungstico-----	5 gm.
Agua destilada-----	100 ml.
Acido oxálico 5%	
Acido oxálico-----	5 gm.
Agua destilada-----	100 ml.
Alcohol ácido 0.5%	
Alcohol etílico 70%-----	1000 ml.
Acido clorhídrico concentrado-----	5 ml.
Alumbre de fierro 5%	
Sulfato férrico amónico-----	5 gm.
Agua destilada-----	100 ml.
Carbonato de litio (solución saturada)	
Alcohol etílico-----	6 gm.
Agua destilada-----	500 ml.
Colofonia 10%	
Colofonia-----	50 g.
Alcohol absoluto-----	500 ml.
Desparafinización	
3 cambios de xileno de 2.5 min. cada uno para remover parafina; 3 cambios de alcohol 100% - de 2.5 min. cada uno para remover xileno; algunas inmersiones en alcohol 95% para hidratar; proceder con la técnica de tinción.	
Fijador de Bouin	
Acido pícrico en sol. acuosa saturada---	75 partes
Formol 40%-----	25 partes
Acido acético glacial-----	5 partes
Hematoxilina de Harris	
Hematoxilina-----	5.0 gm.
Alcohol absoluto-----	50.0 ml.
Sulfato de aluminio y amonio-----	100.0 gm.

Agua destilada-----1000 ml.  
 Oxido mercúrico-----2.5 gm.

Hematoxilina de Weigert

Solución A

Hematoxilina-----1 gm.  
 Alcohol etílico 95%-----100 ml.

Solución B

Cloruro férrico (29% sol. acuosa)-----4 ml.  
 Agua destilada-----95 ml.  
 Acido clorhídrico concentrado-----1 ml..

Mezclar las soluciones A y B en el momento

Remoción de cristales de cloruro mercúrico

Desparafinización por medio de xileno, alcohol absoluto y alcohol 95%.

Colocar en solución alcohólica yodada (yodo 0.5% en alcohol 80%).

Solución alcohólica yodada 0.5%

Cristales de yodo-----5 gr.  
 Alcohol 80%-----1000 ml.

Mantener en esta solución de 5 a 10 min.

Lavar en agua o enjuagar en alcohol 80%

Colocar en solución de tiosulfato de sodio 5% de 2 a 5 min. para expulsar el yodo.

Lavar por medio de agua corriente para remover - el tiosulfato. Proceder con la técnica de tinción.

Solución azul de anilina 0.1%

Azul de anilina-----0.1 gr.  
 Acido acético-----0.2 gr.

Solución ácido acético 0.2%

Acido acético glacial-----2 ml.  
 Agua destilada-----1000 ml.

Solución de trabajo fuchsina-cromatropo-orange G

Sol. patrón Masson fuchsina-cromotropo-orange G  
 Sol. de ácido acético 0.2%

## Solución de trabajo de Giemsa

Solución patrón de Giemsa-----2.5 ml.  
 Alcohol metílico-----3.0 ml.  
 Agua destilada en la cuál se añade 3 o 4 gotas  
 de sol. 0.5% de bicarbonato de sodio----100 ml.

## Solución patrón de Giemsa

Esta solución patrón puede prepararse o ser con-  
 seguida ya preparada

## Solución patrón Masson fuchsina-cromotropo-orange G.

Cromotropo 2 R-----2 gm  
 Fuchsina ácida-----1 gm.  
 Orange G.-----2 gm.  
 Acido acético 0.2%-----300 ml.

## Solución P.T.A.H. Rápida

Disolver 20 gm. de ácido fosfotungstico en 90 ml. de agua  
 destilada caliente.

Disolver 1.0 gm. de hemaxilina en 10 ml. de alcohol ab-  
 soluto y mezclarla con la solución de ácido fosfotungsti-  
 co.

Añadir 100 ml. de permanganato de potásio 0.25% y mezclar

## Solución verde brillante 0.1%

Verde brillante-----0.1 gm  
 Acido acético 0.2%-----100 ml.



9.- BIBLIOGRAFIA.

Alexander, S.A. 1980. "Patterns of cell polarity in healing open wounds". J. oral, surgery. 38: 736-739.

Alexander, S.A. 1981. "Patterns of epidermal cell polarity in healing open wounds". J. of surgical research. 31: 456-462.

Brookbank, J.W. 1978. "Developmental biology embryos plants and regeneration". 1a Ed. Harper and Row, New York, Harvers--  
ton, S.F. London. pp: 377-400.

Bullough, W.S. and Rytomas, T. 1965. "Mitotic homeostasis". Nature. 205, 4971: 573-578.

Carrel, A., and Du Nouy L.P. Sc. D. 1921. "Cicatrizacion of wounds". J. exper. med. 34: 339-348.

Carrel, A., and Ebeling, A.H. 1926. "The fundamental properties of the fibroblast and macrophage". J. exper. med. 44: 285-306.

Correa, P.J., Arias-Stella, J., Pérez, T.R., Carbonell, M.L.--  
1973. "Texto de Patología". 1a Ed. La prensa médica mexicana, México. pp: 899-911.

Diegelman, R.F., Cohen, and Kaplan, A.M. 1981. "The role of macrophages in wound repair: a review". Plast. rec. surg. 68- (1): 107-113.

Ellenberger, W., Baum, H., and Dittrich, H. 1956. "An atlas of animal anatomy for artists". 1a Ed. Lewis S. Brown Dover Publications, Ind., New York. pp: 139, 142.

Garza, M.A. 1981. "Manual de Técnicas de Investigación". 3a Ed. El colegio de México, México. pp: 287.

Glynn, J.E., Hoock, J.C., and Weismann, G. 1967. "Handbook of inflammation. 3.- Tissue repair and regeneration". John, C. Hoock and Weismann editors, London. pp: 22-30 263-274.

Ham, W.A. 1975. "Tratado de histología". 7a Ed. Interamericana, México. pp: 245.

Jones, R. Mc. 1950. "Handbook of microscopical technique". 3a Ed. Paul B. Hoeber, New York. pp: 249.

Keeton, W.T. 1967. "Biological science". 2a Ed. Norton and company, New York. pp: 563-567.

Langman, J. 1969. "Embríología médica". 2a Ed. Interamericana, México. pp: 100-109.

Mallory, F.B. 1983. "Pathological technique". Philadelphia. -  
Saunders. pp: 195.

Maximou, A.A. 1957. "A. textbook of histology". 7a Ed. William  
Bloom, Philadelphia, W.B. pp: 628.

Minguetti, G., and Mair, W.G.P. 1980. "The developing human -  
muscle: ultrastructural differences between myoblasts and fi-  
broblasts". Rev. bras. de pesquisas med. e biol., 13 (1-3) 1-  
8.

Olea, F.P., Sánchez, C.F. 1976. "Manual de técnicas de inves-  
tigación documental". 5a Ed. Esfinge, México. pp: 185-187.

Peacock, E.E. 1981. "Control of wound healing and scar forma-  
tion in surgical patients". Arch. surg., 116: 1325-1329.

Preece, H.T. "A manual for histologic technicians". 3a Ed. Li-  
ttle Brown and company, Boston. pp: 226-234.

Reפש, L.A. and Oberpriller, J.C. 1980. "Ultrastructural stu-  
dies on migrating epidermal cells during the wound healing -  
stage of regeneration in the adult newt, Notophthalmus viri-  
descens". The american journal of anatomy 159: 187-208.

Rezmik, M. 1969. "Origin of myoblasts during skeletal muscle regeneration" (electron microscopic observations). Laboratory investigation, 20 (4): 353-363.

Robbins, A. 1973. "Patología básica". 1a Ed. Interamericana, México, pp: 53-54.

Rose, M.S. 1970. "Regeneration: key to understanding normal and abnormal growth and development". Appleton-Century-Crofts, New York. pp: 13-18, 25-39, 40-42.

Ross, R. 1969. "Human physiology and the environment in health and disease: wound healing". Reading from. Scientific american. W.H. Freeman and company, San Francisco. pp: 188-198.

Runnells, A.R. 1975. "Principios de patología veterinaria". 1a Ed. CECSA, México. pp: 267.

Schmidt, A.J. 1968. "Cellular biology of vertebrate regeneration and repair". 1a Ed. Chicago Press, Chicago. pp: 17-106, 305-308.

Shoshan, S. 1981. "Wound healing". International review of connective tissue research. 9: 1-27.

Sicard, E.R. 1983. "Blood cells and their role in regeneration": I. Changes in circulating blood cell count during forelimb regeneration. Expt. cell. biol. 51: 51-59.

Simpson, D.M. and Ross, R. 1971. "Effects of heterologous antineurophil serum in guinea pigs". American journal of pathology. 65 (1): 79-97.

Simpson, D.M. and Ross, R. 1972. "The neutrophilic leukocyte in wound repair". J. of clinical invest. 51: 2009-2023.

Stewart, R.J. 1981. "The wound fibroblast and macrophage". I: wound cell population change observed in tissue culture. Br. J. surg. 68: 125-128.

Thornton, CH. S. 1968. "Amphibian limb regeneration". Advances in morphogen, 7: 205-249.

Uzunian, A. 1979. "Electron microscopy of collagen resorption by fibroblasts in wound repair of the albino rat skin". Rev. bras. de pesquisas med. biol. 12: 347-350.

Villee, C.A. 1968. "Biología" 5a Ed. Interamericana, México. pp: 254.

Vorontzova, M.A. 1976. "Asexual propagation and regeneration".  
1a Ed. F. Billet, London Pergamon Press. pp: 292-333, 338-383,  
401-409.

Wigglesworth, V.B. 1959. "Metamorphosis and differentiation".  
Scientific American. sobretiro # 63.