

155
2Ej.

"EVALUACION COMPARATIVA DE LA CICATRIZACION
CON LUZ POLARIZADA LASER"

MONICA OCHOA DEL VALLE

Asesores: M.V.Z. Héctor Sumano Lopez.

M.V.Z. Luis Ocampo Camberos.

1987



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.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
HIPOTESIS.....	4
OBJETIVO.....	5
MATERIAL Y METODO.....	5
RESULTADOS.....	10
DISCUSION.....	14
LITERATURA CITADA.....	17

R E S U M E N

OCHOA DEL VALLE MONICA. Evaluación comparativa de la cicatrización con luz polarizada laser. (bajo la dirección de: Héctor Sumano López y Luis Ocampo Camberos).

Dados los beneficios de la electroestimulación y la aplicación de laser en la cicatrización de heridas y considerando que la densidad de colágena en una cicatriz determina la calidad de la misma, se utilizarón 100 ratas divididas en 5 grupos para evaluar la calidad cicatrizante de varios procedimientos y sustancias. Bajo anestesia se produjeron quemaduras de tercer grado en 20 ratas por grupo y se les trató diariamente con: (A) electroacupuntura, (B) nitrofurazona, (C) zábila, (D) luz laser polarizada, (E) testigo no tratado. La densidad de colágena se determino mediante análisis de hidroxiprolina y se determino que los grupos A y C tuvieron la máxima concentración de colágena ($p < 0.05$) seguido de D y B, finalmente el grupo E. Solo el grupo B mostró una menor densidad de colágena que el grupo testigo ($p < 0.05$). Se propone que la determinación de hidroxiprolina puede servir de indicador de la calidad de la cicatrización y que la electroestimulación puede incorporarse a la práctica clínica dados sus evidentes efectos promotores de la cicatrización.

INTRODUCCION

Existen algunas evidencias experimentales que apoyan la idea de que la aplicación de alguna forma de electricidad a tejidos lesionados puede acelerar o incluso regenerar la reparación de los mismos (1). En especial se ha informado de que la aplicación de impulsos electricos a 60 Htz de frecuencia y 7 Voltios de intensidad, induce una notable regeneración de estructuras de procesos cicatrizales de primera y segunda intención (23). Aún más, se conocen desde hace tiempo la capacidad antibacteriana de corrientes electricas (13) y los efectos inmoestimulantes de la aplicación de electricidad a puntos de acupuntura (20). Incluso, existen aparatos comercialmente disponibles para aplicar alguna forma de electricidad (2). La manera en que se aplica la electricidad varía de acuerdo con el aparato; se han aplicado campos electromagnéticos (2), campos electricos (1), rayos Laser (15) y en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Zootecnia (UNAM) se obtuvieron notables efectos regenerativos con impulsos electricos derivados de un electroestimulador para acupuntura.

Dentro de las técnicas anteriormente mencionadas, quizá la más práctica e indudablemente una de las que mejores resultados ha brindado es la utilización de rayos Laser (15). Al respecto se desarrolló en Hungría una lámpara de luz Laser polarizada (EBOLITE)⁺ y con la aplicación directa de la luz de esta lámpara en heridas de difícil cicatrización se logró un magnífico proceso de reparación tisular (15). Entre los resultados logrados de este nuevo método destaca el tratamiento de:

- Deficiencias epiteliales.
- Ulceras decubitales

+ M.C.D. Metrimpex. Budapest, Hungría y Galaxia Int. de Com. S.A. México.

- Úlceras causadas por insuficiencia arterial.
- Úlceras post-trombóticas.
- Gangrena diabética.
- Quemaduras.
- Preparación para injertos de piel.
- Fístulas persistentes.
- Aumenta la formación de costras.
- Reducción de la formación keloides.

Debido a que la cicatrización lograda con electroestimulación (23) y con zábila (24) fué calificada como sobresaliente, se considera conveniente evaluar comparativamente estos 4 métodos de cicatrización (electroestimulación, zábila, nitrofurazona y luz laser polarizada) en quemaduras de tercer grado, donde debido a la lesión de la capa germinal se presupone que el proceso cicatrizal será por segunda intención y con desarrollo de fibrosis (11). En especial se eligió a la quemadura de tercer grado como desafío a los métodos de cicatrización mencionados, debido a que la aplicación de productos convencionales (V.G., nitrofurazona) ofrecen resultados muy pobres en lo que respecta a regeneración tisular (5) y obligan a la búsqueda de alternativas que eviten la fibrosis y la contracción tisular con la evidente pérdida de la función del area afectada.

Uno de los puntos más importantes en el proceso de cicatrización, es el de la densidad de colágena entre 5 y 10 días. Después de los 10 días hay un proceso de colagenolisis, por lo cual dicha estimación carece de relevancia. En este momento, a partir de los 10 días es más importante para calificar la calidad de un proceso cicatrizal, evaluar el tipo de colágena que típicamente se ha establecido en:

Tipo	Tejido
I	Hueso, dermis, tendón, cornea, dentina.
II	Cartílagos

- III Dermis del feto y lactante, sistema cardiovascular.
- IV Membranas basales.

La colágena esta formada por 3 cadenas de polipéptidos unidos en forma de una hélice triple. Contiene gran cantidad de prolina y lisina, gran parte de estos se encuentran hidroxilados. La colágena se sintetiza de un precursor denominado protocolágena que al perder sus péptidos terminales se convierte en tropocolágena que al polimerizarse se convierte en colágena (9).

Como se puede notar de la clasificación de colágena en el tejido cicatrizal se sintetizan colágena del tipo I y II, en las cuales existe un arreglo espacial distinto caracterizado por.

- Los haces de colágena son mucho más delgados.
- Existe una desorganización generalizada.
- La colágena es un material sin birrefringencia que nos indica que es una estructura relativamente desorganizada a nivel molecular.

En virtud de que se considera que la densidad de colágena de un proceso cicatrizal refleja en relación directa su fuerza de cohesión y la calidad del proceso regenerativo (7), la calidad promotora de cicatrización de los métodos en evaluación se determinó en función de la densidad de colágena al día 10 y dicha densidad se determinó a su vez mediante la concentración de la hidroxiprolina.

HIPOTESIS.

La aplicación diaria de luz laser polarizada a quemaduras de tercer grado en ratas, contaminadas con Staphylococcus aureus ofrece una mejor cicatrización que la aplicación de campos electricos, de zábila y de nitrofurazona, evaluandola mediante la densidad de colágena cicatrizal.

OBJETIVO

Evaluar si la aplicación diaria de luz laser polarizada a quemaduras de tercer grado en ratas, contaminadas con Staphylococcus aureus ofrece una mejor cicatrización que la aplicación de campos eléctricos, de zábila y de nitrofurazona, mediante la evaluación de la densidad de colágena del proceso cicatrizal por el método de la hidroxiprolina.

MATERIAL Y METODO.

Se utilizaron 100 ratas de la cepa Long-Evans, machos y hembras de aproximadamente 250-300 g de peso, divididos en 5 grupos de 20 cada uno de la siguiente manera:

- Grupo A: Tratado con electroestimulación: 7-10 voltios y 60 Htz durante 15 minutos diariamente, durante 7 días, con un electroestimulador Akupunter 71-6⁺.
- Grupo B: Tratado con nitrofurazona (Furacin)⁺⁺ aplicando diariamente 2 g a cubrir la herida durante 7 días.
- Grupo C: Tratado con extracto de zábila fresco, aplicando diariamente 2 g a cubrir la herida durante 7 días.
- Grupo D: Tratado con luz laser polarizada, aplicando diariamente 5 minutos sobre la herida, durante 7 días.
- Grupo E: Testigo no tratado.

Las quemaduras se indujeron bajo anestesia con pentobarbital de acuerdo con la técnica de Harrel y Mason (8), como se esquematiza en la figura # 1.

Los animales recibieron un inóculo equivalente a 10^8 bacterias de acuerdo con lo descrito por Davis y Dulbecco (6). Los tratamientos se iniciaron a las 12 horas de haberse provocado y contaminado la quemadura.

Al cabo de 7 días se obtuvieron 2 g del centro del proceso cicatrizal del animal sacrificado y se sometieron al análisis cuantitativo de hidroxiprolina de acuerdo con lo descrito por Zika y Klein (27) y Neuman y Logan (19), que se resume a continuación:

+ ACK Laboratorios Inc. New York.

++ Norwich Pharmacal Co. de México S.A de C.V.

La muestra de piel molida (2g) se calienta en 10-15 ml de ácido clorhídrico 6 M sobre un baño de vapor durante 30 minutos y se mezclan antes de comenzar la hidrólisis a 120°C durante 3 horas.

Se toman alicuotas de 0.2 a 1 ml de hidrolizado con las diluciones apropiadas y se analizan por duplicado para la determinación de hidroxiprolina que se resume de la siguiente manera:

La cantidad de hidroxiprolina por muestra se convierte a colágena utilizando un factor de 7.46 (19).

La determinación de hidroxiprolina se realiza a travez de su reacción con para-dimetilaminobenzaldehido que produce un intenso color rojo con la hidroxiprolina oxidada.

Los reactivos para el método son los siguientes:

- 1.- Solución estandar de L-hidroxiprolina conteniendo 15 microgramos.
- 2.- Solución de sulfato de cobre 0.01 M.
- 3.- Hidroxido de sodio 2.5 N.
- 4.- Peróxido de hidrógeno al 6 %.
- 5.- Acido sulfúrico 3 N.
- 6.- Para-dimetilaminobenzaldehido al 5% en propanol.

La curva estandar debe incluir concentraciones de hidroxiprolina entre 5-15 mg/ml.

En cada tubo de ensayo se colocan las cantidades crecientes de hidroxiprolina en un volumen de 1 ml y a cada tubo se le agregan sucesivamente 1 ml de cada una de las siguientes soluciones:

- Sulfato de cobre 0.01 M.
- Hidroxido de sodio 2.5 N.
- Peróxido de hidrógeno al 6 %.

Las soluciones se mezclan y se agitan ocasionalmente durante un periodo de 5 minutos y se colocan en un baño de agua por 5 minutos con agitación. Los tubos se enfrían en un baño de hielo y se añaden 4 ml de ácido sulfúrico 3 N con agitación.

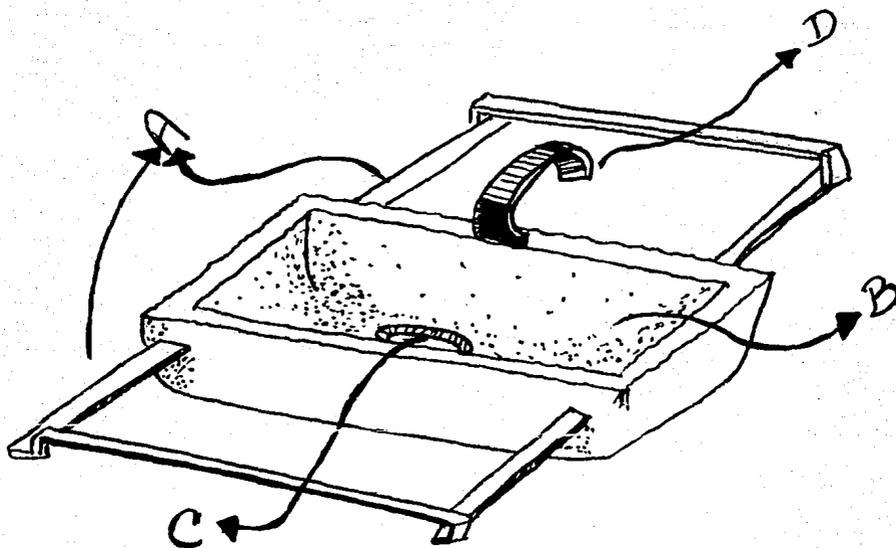


Fig. 1 Representación esquemática del aparato para inducir quemaduras estandarizadas de segundo y tercer grado.

- A.- Barras para asegurar el aparato en los bordes de un dispositivo de agua a 95°C.
- B.- Sitio donde se sitúa a la rata anestesiada con el dorso hacia el orificio.
- C.- Orificio que permite el contacto de piel y agua a 95°C.
- D.- Banda de metal para presionar a la rata dentro de la cámara.

Los tubos se colocan en un baño de agua a 70°C durante 16 minutos y después se enfrían bajo el chorro de la llave de agua.

Las soluciones se leen en un espectrofotómetro a 540 nanómetros (13), situando en una curva estándar los valores de las muestras experimentales. La curva estándar o de recuperación se establecerá con réplicas de 5 muestras por valor, para establecer los límites de confiabilidad del procedimiento que, de acuerdo con lo descrito por Neuman y Logan (13) fluctúa entre los 100 y 150 mg.

El tratamiento de los resultados se llevo a cabo conforme el siguiente diagrama de flujo.

OBJETIVO

Probar hipótesis.

$H_a S^2_a = S^2_b = S^2_c = S^2_d = S^2_e.$

$H_o S^2_a \neq S^2_b \neq S^2_c \neq S^2_d \neq S^2_e.$

5 muestras de 10 unidades cada una

Independientes.

Escala de intervalo g/100

Un solo factor: Tratamiento.

Análisis de Varianza de un solo camino.

Con ello demostramos si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre los grupos debidos al tratamiento.

Una vez probado que hay diferencias, se debe ver cual o cuales son los tratamientos que la determinan.

OBJETIVO

Contrastar medias.

H_a $X_a = X$ control; $X_b = X$ control; $X_c = X$ control; $X_d = X$ control

H_0 $X_a = X$ control; $X_b = X$ control; $X_c = X$ control; $X_d = X$ control

5 muestras

4 de control

T de Dunnet

Con ello determinamos cuales tratamientos definen la diferencia estadísticamente significativa contra el control.

Si existen 2 tratamientos que difieren significativamente del control se hace:

OBJETIVO

Contraste de medias

$H_a = X_a = X_b$

$H_0 = X_a = X_b$

2 muestras de 10 unidades cada una.

Independientes.

Escala de intervalo g/100

Un solo factor Tratamiento

t de Student.

Esto nos permite diferenciar los mejores tratamientos.

RESULTADOS.

En la figura # 2 y en el cuadro # 1 se presentan la curva de recuperación de hidroxiprolina y los datos correspondientes utilizados como base para la determinación de las muestras. La curva tiene una confiabilidad de más del 95% en su regresión lineal.

En el cuadro # 2 se presentan los datos del contenido de hidroxiprolina, expresados en gramos por cada 100 g de proteína. Cada una de las muestras fué corrida para formación de color conforme a la prueba de Neuman y Logan (19) 5 veces.

Las pruebas estadísticas indican que el mayor contenido en hidroxiprolina lo presentó el grupo tratado con electroacupuntura y en segundo término el tratado con zábila; y que los valores fueron estadísticamente diferentes que los del grupo control ($P < 0.05$).

En cuanto a la luz laser de rayos polarizados y la nitrofurazona, se observó que sus valores en hidroxiprolina no difieren significativamente de aquellos del grupo control.

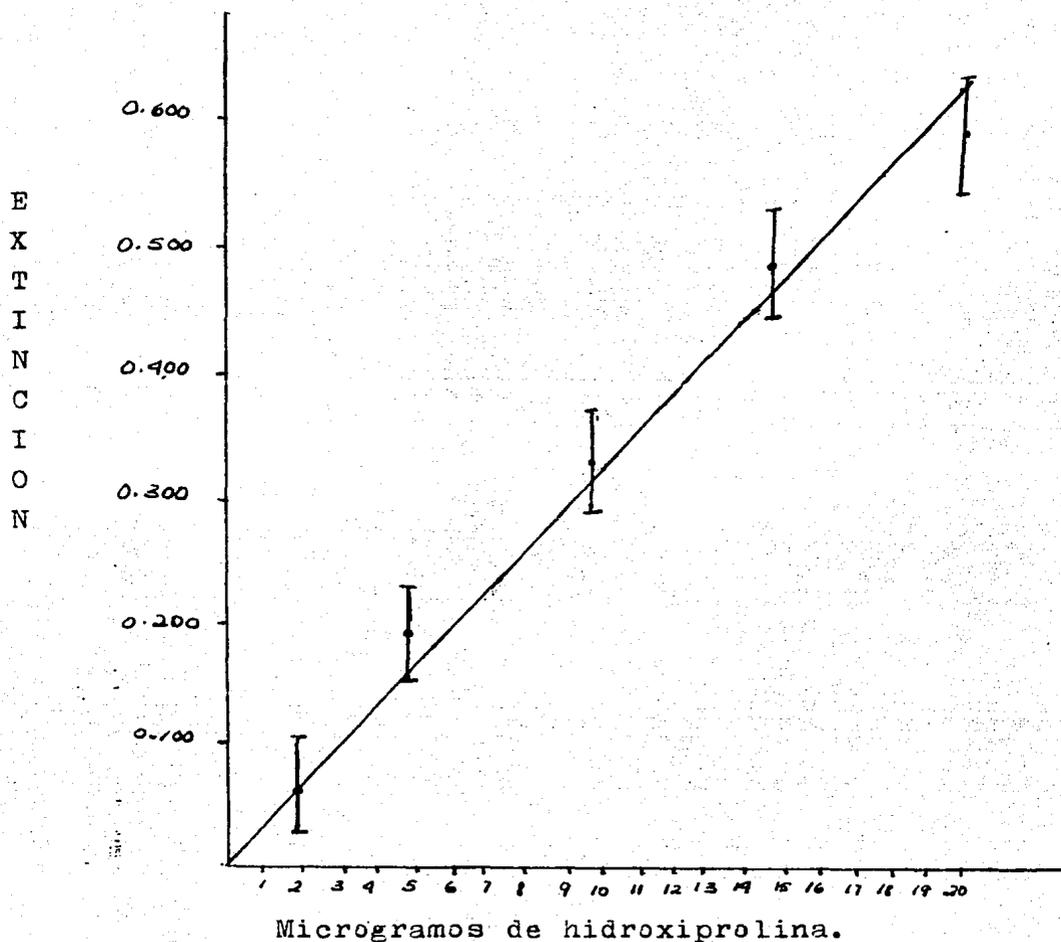


Fig. 2 Curva de recuperación de hidroxiprolina. Formación de color con hidroxiprolina. $E = 2 - \log$ del porcentaje de la transmisión de la luz con filtro del No. 540.

<i>µg</i> de hidroxiprolina	Extinción X y DE.
2	70 ± 20
5	180 ± 28
10	325 ± 30
15	485 ± 30
20	600 ± 45

Cuadro 1. Valores medios y desviaciones estandar de la curva de recuperación de hidroxiprolina mediante el método de Neuman y Logan (19). Cada punto representa la media de 5 determinaciones.

Muestra No.	Electroacupuntura	Sábila	Ebolite	Nitrofurazona	Control
1	13.0	10.0	9.5	9.0	8.6
2	14.1	11.6	9.8	8.6	9.0
3	13.6	12.8	10.0	8.3	9.3
4	13.7	12.9	10.3	8.4	9.2
5	14.3	11.9	9.6	8.3	9.8
6	13.3	12.1	10.1	9.1	8.7
7	14.2	11.8	9.8	8.7	9.0
8	13.7	12.0	10.2	9.0	9.5
9	14.2	11.8	10.0	8.8	9.2
10	14.3	12.6	9.4	8.7	9.6

Cuadro # 2. Contenido de hidroxiprolina, expresado en gramos por cada 100 gramos de proteína.

DISCUSION.

En la metodología utilizada se considera que se obtuvieron quemaduras de caracter homogéneo. Dadas las características de las lesiones se puede considerar con seguridad como quemaduras de tercer grado de acuerdo con la clasificación clásica (16) o bien, de grosor total conforme a la nueva clasificación (14).

Por otro lado, destaca también la homogeneidad de las concentraciones de hidroxiprolina en los diferentes grupos. Esta característica puede en los días 5 al 10 del proceso de reparación de una herida, considerarse como confiable para la estimación de la calidad cicatrizal de diversos productos y considerando que existe una correlación adecuada entre los hallazgos histopatológicos y de tensión de herida encontrados en otros ensayos (9) con la densidad de colágena, se sugiere aquí que la prueba de densidad de hidroxiprolina se utilice rutinariamente en la evaluación de cicatrizantes.

La aplicación de luz laser de rayos polarizados arrojó resultados ligeramente inferiores a la electroestimulación y a la zábila pero superiores a los obtenidos en el grupo testigo aun que no estadísticamente. Esto indica que existe una acción definida de este procedimiento en la síntesis de colágena y por lo tanto puede recomendarse para promover la cicatrización, especialmente en pacientes difíciles de manejar o en áreas donde la sensibilidad a la inserción de agujas (necesarias para administrar electroestimulación) es muy grande. Sin embargo, se sugiere que se lleven a cabo nuevos ensayos en los que se determine con mayor precisión la frecuencia y la duración del estímulo laser polarizado en animales domésticos ya que, el tiempo de exposición y la frecuencia de los tratamientos adoptados en este ensayo fueron tomados de la experiencias en seres humanos (15). Es posible y quizá probable que la aplicación de luz laser de rayos polarizados por más tiempo y con más

frecuencia puede generar mejores resultados en terminos de colágena.

Por otro lado, se ha informado que la aplicación de luz laser no polarizada a dado magníficos resultados en lesiones cutáneas de naturaleza variable (18). Y se ha postulado que dicho procedimiento tiene multiples aplicaciones clínicas (17, 25). Sin embargo, de los estudios de aplicación del rayo laser para regeneración de estructuras (4, 12, 17, 18, 25) destaca el hecho de que las características exactas del estímulo laser estan vagamente definidas. Incluso, existen marcadas controversias en los resultados con modificaciones de la aplicación de laser. Así, se consideran "exclusivamente superiores": la estimu de laser CO₂ (12), laser de baja densidad (4) y Laser de luz polarizada (15). De cualquier forma, existe evidencia suficiente en la literatura como para sustentar que la aplicación de luz laser es capaz de inducir alteraciones notables en la subestructura de la colágena, mismos que de alguna manera favorecen la consolidación de heridas (21).

Por la sencillez con la que se aplica la luz laser de rayos polarizados y la evidente modificación del comportamiento de la colágena, se podría sugerir que este método puede tener cabida en la clínica diaria; aunque aún resta por definirse la forma exacta de dosificación de este método, así como determinar las características subestructurales de la modificación inducida en la colágena cicatrizal, ya que la tendencia de las investigaciones en el campo estan dirigidas a la modificación de la sintesis de colágena cicatrizal, con especial énfasis en evitar la polimerización de las fibras y fomentar un arreglo espacial similar al presentado por la colágena tipe I (9).

Aunque se ha postulado en forma general que la luz laser estimula la mitosis celular (15), no se ha postulado un mecanismo preciso de acción para longitudes de onda de 904nm que generan luz fría. Sin embargo, la aplicación de electrici-

dad en diversas formas (corriente alterna, campos electromagnéticos, ionizaciones y rayos laser), es una area de investigación con notable expansión y por ello, resulta procedente sugerir la continuación en el area (3,22,26).

LITERATURA CITADA.

- 1.- Abolafia, J.J.A.: Evaluación del efecto cicatrizante de la acupuntura. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. (1984).
- 2.- Allen, K., Spacuchus, A. and Lowry, M.: Laminitis treatment with electrotherapy. Equine Practice-Medicine 8 (4): 28-31 (1986).
- 3.- Brighton, Black, Pollack,: Electrical properties of bone and cartilage. Grune&Stratton, Inc. New York. (1986).
- 4.-Brunner, R.: Applications of laser light of low power density. Curr. Probl. Dermatol., 15: 94-170 (1986).
- 5.- Chvapil, M.: Zinc y otros factores farmacológicos que intervienen en la cicatrización. Cicatrización e Infección de las Heridas. Teoría y Practica Quirurgica. Editado por Hunt, T.K 81-96. El Manual Moderno, México, D.F., (1983).
- 6.- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.M., Ginsberg, H.S., Wood, W.B. and Mc Carty, N.: Microbiology, 2d. Ed. Harper and Row, Publisher. Inc. U.S.A. (1973).
- 7.- Ferrester, J.C.: Morfología de la colágena en el tejido normal y en las heridas. Teoría y Práctica Quirurgica. Editado por Hunt, T.K., El Manual Moderno, México, D.F., (1983).
- 8.- Harrel, L., Walker, M.S. and Mason, A.D.: A standard animal burn. J. Taum., 8 (6): 1049-1051 (1968)
- 9.- Hunt, T.K.: Cicatrización e infección de las heridas. El Manual Moderno S.A. de C.V., México, D.F. (1983).
- 10.- Illadez, R.M.: Evaluación del efecto de la electroestimulación en la cicatrización de piel con quemaduras de tercer grado en ratas. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F (1985).
- 11.- Jubb, K.V.F. y Kennedy, C.P.: Patología de los animales domesticos. Ediciones U.PO.ME.
- 12.- Kamat. B.R. Cutaneous tissue repair following CO₂ laser irradiation. J. Invest. Dermatol. 87 (2): 268-71 (1986).

- 13.- Khoe, W.: Acupuncture in the tratment of infectious diseas es. American Journal of Acupuncture 9 (4): 245-51(1976).
- 14.- KirK.R.W., Muller, G.H. and Scott, W. Small animal derma- tology. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia,(1983)
- 15.-Koabner, H. Aplicación de laser para aumentar la curación de las heridas. Publicación Wiley-Interciencia (1980).
- 16.- Krupp, M.A., Chatton M.J.: Diagnóstico clínico y tratamien- to. Ed. El Manual Moderno,S.A. de C.V., México, D.F. (1983).
- 17.- Langthaler, M. As-year experience with laser therapy in dermatology. Curr. Probl. Dermatol. 15: 94-110 (1986).
- 18.- Mc. Burney E.I. The use of laser in trating cutaneous lesions. J La State Med.Soc. 138:(2) 38-43 (1986).
- 19.- Neuman, R.E. and Logan, M.A.: The determination of hydroxi- prolina. J. Biol. Chem., 184: 299-306 (1951).
- 20.- Rowley, B.A., Mokena, J.M., Chase, G.R. and Wollot, L.E.: The influence of electrical current on an infecting microor- ganism in wounds. The Veterinary Bulletin 50 (8): 633-40 (1980).
- 21.- Schober, R. Laser- induce alteration of collagen substruc- ture allows Et. Al. Sience 13 232. (1986)
- 22.- Shiber, W.J.: A manual of electrotherapy. Henry Kimpton Publishers, London, (1975).
- 23.- Sumano, L.H.? Casaubon, E.T., y López, B.G.: Effects of electroacupuncture on second intention wound healing. Can. J. of Surgery., (in presa) (1987).
- 24.- Sumano, L.H., Ocampo, C.L., Gaytoan, C.B. y González de la V M.: Efecacia cicatrizante de varios medicamentos de paten- te, la zábila y el propolio. Rev. Vet. Mex. 18: 33-37(1987).
- 25.- Walsh, J. Laser-Tissue interactions and their clinical applications. Curr. Probl. Dermatol. 15 94-110 (1986)
- 26.- Wolf, Lampe, Manheimer, Gersh, Howsen. Mc Kelvy, Kutner, Hamer.: Transcuteneus electrical nerve stimulator. Ameri- can Physical Therapy Assoc. Washington, D.C., (1979).
- 27.- Zika, J.M. and Klein. L.: Relative and absolute changes in skin collagen mass in the rat. Biochim. Biophys. Acta. 223; 509-14 (1971).