



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LAS ZEOLITAS ENRIQUECIDAS CON
CALCIO Y ZINC COMO RECONSTITUYENTES DE
PIEL EN HERIDAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
MIGUEL ANGEL REGALADO HERNANDEZ



DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. CRISTINA PIÑA B.

MEXICO, D.F.

2000

277521



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Efecto de las Zeolitas enriquecidas con calcio y zinc como reconstituyentes de piel en heridas.

realizado por: Miguel Angel Regalado Hernández

con número de cuenta: 9455594-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. María Cristina Piña Barba

Propietario

Dra. María del Carmen Uribe Aranzabala *Ma del Carmen Uribe*

Propietario

M. en C. Claudia Karina Torres Villaseñor *Claudia Torres*

Suplente

Dr. Salvador Martín Mandujano *Salvador Martín*

Suplente

Biol. Alfonso José Vilchis Peluyera *Alfonso Vilchis*

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz
Coordinador de Licenciatura.

*A mis padres
por su apoyo para que
tuviera una formación profesional
y por sus valiosos consejos.*

*A mis hermanos
José Luis, Juan Carlos y Fernando.*

*A Isabel por su amistad, cariño
y amor incondicional*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. **Cristina Piña B.** Por todo su apoyo, paciencia, consejos y por compartir parte de su tiempo para la realización de este trabajo.

A los Honorables Miembros del Jurado. Dra. **M. del Carmen Uribe.**, M en C. **C. Karina Torres V.**, DR. **Salvador Martín M.** y Biol. **Alfonso J. Vilchis P.** A quienes les agradezco por sus buenos y valiosos comentarios para enriquecer la realización de este trabajo.

A **Benjamín León**, Don **Jorge**, M.V.Z. **Andrés**, Dr. **César Montalvo**, Biol. **Ivonne Naufal** por su tiempo y servicios prestados.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias y del Laboratorio de Biomateriales por compartir sus experiencias.

Agradezco a la coordinación del programa de becas de tesis de licenciatura en proyecto de investigación (**PROBETEL**), por su apoyo económico para la realización de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, por las facilidades proporcionadas para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Capítulo 1. Antecedentes	
Generalidades de la piel	
1.1. Epidermis.....	2
1.2. Dermis.....	4
1.3. Matriz extracelular.....	5
1.4. Hipodermis.....	6
1.5. Anexos de la piel.....	7
Capítulo 2. Proceso de cicatrización de la piel	
2.1. Proceso inflamatorio.....	8
2.2. Proliferación.....	11
2.2.1. Fibroblastos.....	11
2.2.2. Contracción.....	13
2.2.3. Epitelización.....	13
2.2.4. Angiogénesis.....	16
2.3. Reparación y Remodelación.....	17
2.3.1. Remodelación.....	18
2.3.2. Reparación.....	20
2.4. Influencia de factores que afectan el proceso de cicatrización.....	22
2.5. Importancia del calcio y zinc en el proceso de cicatrización.....	23
2.5.1. Calcio.....	23
2.5.2. Zinc.....	23
2.6. Generalidades de zeolitas.....	24
2.6.1. Características de las cerámicas zeolitas Ca^{2+} (0.5%), zeolita Ca^{2+} (1.1%) y Furacín (Nitrofurazona).....	25
2.7. Hipótesis y Objetivos de trabajo.....	26

Capítulo 3. Materiales y metodología

3.1. Materiales y Método.....	27
3.1.1. Realización de la incisión.....	27
3.1.2. Estudio clínico.....	28
3.1.3. Sacrificio y toma de la muestra.....	29
3.2. Estudio histopatológico.....	30
3.3. Prueba estadística.....	30

Capítulo 4. Resultados

Observaciones clínicas.....	31
Estudio histológico.....	34
Descripción histológica.....	36
Poblaciones celulares.....	42

Capítulo 5. Discusión y conclusiones

Discusiones.....	45
Conclusiones.....	48

Glosario.....	50
---------------	----

Referencias.....	52
------------------	----

Apéndice	57
----------------	----

INTRODUCCIÓN

La piel cubre la superficie corporal del cuerpo e incluye anexos cutáneos como uñas, pelo y varios tipos de glándulas. Protege al organismo de sustancias e influencias nocivas; proporciona una barrera a la invasión por microorganismos; ayuda a regular la temperatura corporal; por el sudor excreta agua, grasa y varios productos de desecho; es el órgano sensitivo más extenso del cuerpo para la recepción de estímulos táctiles, térmicos y dolorosos.

La piel está compuesta de dos capas: epidermis, epitelio especializado derivado del ectodermo; y por abajo del mismo, la dermis de tejido conectivo denso, derivado del mesodermo.

Debido a la cantidad de procesos en donde la piel está sujeta a diferentes tipos de heridas o alteraciones de su integridad, como quemaduras, abrasiones, contusiones, laceraciones, punciones, etcétera, ha sido de gran importancia el estudio de medicamentos o materiales que ayuden a su reparación (1).

Las heridas superficiales de la piel pueden sanar con el tiempo y sin necesidad de administrar un medicamento, pero si no se cuidan adecuadamente se pueden presentar infecciones que pueden llegar a ser problemáticas y complicar el proceso de cicatrización de la herida. Si hace falta una gran superficie de tejido epitelial, se emplean materiales que asemejan las propiedades más importantes del tejido epitelial y ayudan en su reparación (2), o piel obtenida de otro lugar del cuerpo o bien por la proliferación acelerada de piel *in vitro* compatible con el paciente y que pueda colocarse en el lugar de la piel faltante, evitando así posibles infecciones al organismo.

El uso de medicamentos en lesiones de la piel, tiene como objetivo evitar posibles infecciones y ayudar a su proceso de reparación.

En los últimos años se han generado toda una serie de investigaciones con el objeto de encontrar y/o desarrollar agentes que aceleren y mejoren el proceso de cicatrización, ya que la importancia radica en que éste debe de ser rápido y eficaz, para evitar una posible contaminación y deshidratación del tejido.

En este trabajo, se presenta una evaluación clínica y un estudio histológico sobre la cicatrización de heridas en piel, utilizando como modelo experimental la rata Wistar. Se describe, mediante un análisis histológico, que las zeolitas AIPO enriquecidas con calcio y zinc, tienen un efecto evidente en la rápida epitelización, diferenciación de folículos pilosos y reparación del tejido, proporcionando un proceso de cicatrización más rápido y eficiente.

CAPITULO 1 ANTECEDENTES

GENERALIDADES DE LA PIEL

La piel es una estructura compleja que se encuentra dividida en dos capas: la epidermis y la dermis.

La epidermis es una capa delgada que se localiza en la parte externa de la piel, proporciona la protección contra infecciones y la pérdida de humedad corporal al organismo; está formada por un epitelio de tipo estratificado queratinizado, dividido en cinco estratos característicos, melanocitos, terminaciones nerviosas, células de Langerhans, células de Merkel y células dendríticas. (3, 4)

La dermis es una capa gruesa que se localiza en la parte interna de la piel, provee la elasticidad y fuerza mecánica a la piel (2), se encuentra dividida en dos zonas. La dermis papilar y la dermis reticular, las dos formadas por una matriz de fibras elásticas, colágena, fibroblastos, vasos sanguíneos, glándulas sebáceas, sudoríparas y folículos pilosos. Las dos capas, epidermis y dermis están íntimamente unidas. El conjunto tiene un espesor que varía entre 0.5 y 1.1mm en el caso de la rata Wistar. (5)

1.1. EPIDERMIS

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado que conforma la cubierta protectora de la piel (6), está formada por cinco estratos, que son morfológicamente distintos (Figura 1). (2)

- a) **Estrato germinativo (SG).** Está formado por una capa única de células cilíndricas, que descansan sobre la lámina basal y cada una de ellas tiene prolongaciones citoplásmicas delgadas y cortas en su superficie basal. Estas extensiones dentadas corresponden a invaginaciones de la lámina basal y parecen fijar el epitelio a la dermis subyacente. La membrana plasmática en relación con la lámina basal presenta gran número de hemidesmosomas. En este estrato se observan con frecuencia mitosis celulares, mecanismo por el que se producen nuevas células que son desalojadas a la capa superior, además de sintetizar DNA. (6,7)

La epidermis sufre por sí misma una constante renovación y proliferación de los queratinocitos, estas células predominantes están confinadas al estrato basal y se mueven por estratos sucesivos hacia la superficie, estos sufren un proceso de diferenciación terminal que da como resultado células anucleadas, planas y muertas que llevan queratina al estrato córneo, y que cuando llegan a la superficie son continuamente reemplazadas por diferenciación de células internas de la superficie de la epidermis. El proceso entero de renovación para la epidermis toma aproximadamente 30 días en general. (2,6)

- b) **Estrato espinoso (SS).** Este estrato es más grueso y está integrado por células poliédricas irregulares separadas entre sí. Las células en este estrato son más grandes que las del estrato basal, presentando abundantes prolongaciones citoplásmicas, que le confieren el nombre al estrato. Las prolongaciones de estas células se unen mediante desmosomas a prolongaciones similares de las células vecinas. A medida que las células maduran y avanzan hacia la superficie,

aumentan de tamaño y se hacen más planas y paralelas a la superficie (8). La superficie de estas células (espinosas o queratinocitos) está cubierta de espinas citoplásmicas cortas o proyecciones que se ponen en contacto con otras semejantes de células adyacentes para formar los llamados puentes intercelulares. (7)

- c) **Estrato granuloso (SGR).** Es el estrato más superficial de la porción no queratinizada de la epidermis, varía en su espesor de tres a cinco células alargadas dispuestas en forma paralela a la superficie. Las células contienen abundantes gránulos de queratohialina, que le dan el nombre a la capa. (8,9)
- d) **Estrato lúcido (LS).** Es un estrato claro, transparente, con espesor de tres a cinco células aplanadas y unidas entre sí que carecen de núcleo, su citoplasma contiene una sustancia líquida, la queratohialina, producto de los gránulos presentes en las capas adyacentes y que está distribuida entre las tonofibrillas, dispuestas de forma paralela a la superficie de la piel. (7)
- e) **Estrato córneo (SC).** Es una barrera impermeable, formada por una densa capa de escamas de células planas, anucleadas y exfoliadas llenas de queratina, que se aplanan progresivamente y son fusionadas. (7, 9)



Figura 1. La epidermis es la capa más superficial de la piel y provee la primera barrera de protección contra la invasión de sustancias ajenas al cuerpo. La célula principal de la epidermis es el queratinocito. La epidermis está subdividida en cinco estratos: estrato germinativo (SG), estrato espinoso (SS), estrato granuloso (SGR), estrato lúcido (SL) que no se distingue en la fotografía y el estrato córneo (SC) en el que los queratinocitos migran en forma gradual sufriendo el proceso de descamación.

1.2. DERMIS

La dermis está compuesta básicamente de fibras de tejido conectivo denso, laxo y sustancia fundamental. La dermis está dividida dentro de dos zonas: la papilar o superficial y la reticular o profunda. (Figura 2) (9,10)

- a) **Dermis papilar:** El área papilar se denomina así por que tiene elevaciones sobre el epitelio formando las papilas dérmicas. Consiste de tejido conectivo laxo aerolar ubicado inmediatamente por debajo de la epidermis. Dentro de la dermis papilar se encuentran fibras de colágena de diámetro pequeño, con un alto contenido de colágena tipo III y fibras de elastina filiformes formando una red (8). Esta red es sintetizada por los fibroblastos en toda la dermis papilar y nutrida por capilares desde el plexus vascular superficial (2). La capa papilar es relativamente fina e incluye la sustancia de las papilas y las crestas dérmicas, contiene vasos sanguíneos sin penetrar la epidermis. También contiene prolongaciones nerviosas, algunas de las cuales finalizan en la mismas dermis y otras perforan la lámina basal penetrando el compartimento epitelial. (8)
- b) **Dermis reticular:** Está constituida por tejido conectivo denso irregular y está colocada inmediatamente por debajo de la dermis papilar (9), se compone de una red de fibras de colágena y fibras de elastina, estas son proteínas altamente solubles presentes como una red en el tejido conectivo y son las responsables de la elasticidad del tejido (11). Ambas, colágena y elastina, son de un diámetro mayor en comparación a la dermis papilar. Las fibras de colágena tipo I son proporcionalmente mayoritarias. Las fibras de colágena y de elastina no tienen una orientación aleatoria, forman líneas regulares de tensión en la piel, denominadas **líneas de Langer**. Las incisiones cutáneas paralelas a estas líneas cicatrizan con tamaños mínimos. La dermis reticular es alimentada por capilares del plexus vascular profundo. (8)

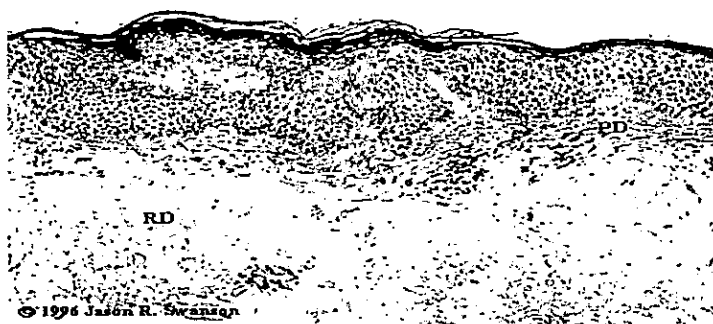


Figura 2. La dermis se hace cargo de funciones importantes como la termorregulación y soporta la red vascular que abastece con nutrientes a la epidermis avascular. La dermis se divide en dos zonas, dermis papilar (PD) y dermis reticular (RD). La dermis contiene un gran número de fibroblastos los cuales son responsables de secretar colágena, elastina y sustancia fundamental proporcionando el soporte y la elasticidad de la piel.

Dispersa por toda la red de fibras de la dermis, se localiza la sustancia fundamental que está compuesta de proteínas (predominantemente fibronectina) y glicosaminoglicanos; ácido hialurónico, condroitín sulfato, dermatán sulfato, agua, electrolitos y nutrientes. (2,9)

1.3. MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular es un complejo estable de macromoléculas que se encuentran debajo del epitelio rodeando a las células del tejido conectivo, se encuentra como matriz intersticial (ej. tejido conectivo) y como membrana basal (ej. epitelio y endotelio). Está formada por cinco componentes principales; colágena, membrana basal, fibras elásticas, fibronectina y proteoglicanos. (12,13)

Las macromoléculas que constituyen las matrices extracelulares se caracterizan por su escasa variedad entre ellas, y tienen como común denominador el ser polímeros lineales aniónicos, siendo estas:

- a) *Glicosaminoglicanos* (ácido hialurónico)
- b) *Proteoglicanos* (ácido condroitín sulfato, heparán sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato, heparina).
- c) *Glicoproteínas* (colágena tipo I, II, III, IV, etc., fibronectina, laminina, condroitina, anclaina, etc.)
- d) *Proteínas* (elastina)

Los glicosaminoglicanos son un grupo heterogéneo de polímeros lineales aniónicos constituidos por secuencias repetitivas de disacáridos formados por un aminoazúcar. Su alta capacidad hidrofílica les permite formar geles hidratados muy porosos que ocupan un gran volumen, y cuando estos se encuentran unidos covalentemente a una proteína se conocen con el nombre de proteoglicanos.

Las colágenas son una familia de proteínas emparentadas íntimamente entre sí, que poseen propiedades comunes. La función más conocida de las colágenas es el sostén fisiológico, ya que se fijan a las superficies celulares y modulan la morfogénesis, quimiotaxis, adhesión y agregación plaquetaria, unión celular y fenotipo celular (13). Además de la colágena y elastina, la matriz extracelular contiene varias otras glucoproteínas, de las cuales la mejor caracterizada es la fibronectina. Mediante la acción de transglutaminasas (Factor XIII de la cascada de la coagulación) la fibronectina entabla enlaces covalentes cruzados con ella misma, el fibrinógeno, la fibrina o la colágena. Esta forma de enlaces cruzados es muy importante en las fases iniciales de la reparación de las heridas.

La piel y los vasos sanguíneos requieren de una elasticidad, y de fuerza tensional para cumplir sus funciones. Mientras que la fuerza tensional es provista por miembros de la familia de las colágenas, la capacidad para retroceder después del estiramiento se debe a la elasticidad de las fibras. (13)

Las membranas basales son estructuras delicadas de la matriz extracelular que se encuentran en la interfase entre las células y el estroma que contiene colágena tipo IV y laminina. Son una estructura compleja que se forma por interacción de varias macromoléculas como; la colágena tipo IV, laminina, entactina y el proteoglicano heparán sulfato. Estos componentes mediante asociación mutua tienen el potencial para regenerar una diversidad

de estructuras que son requeridas por diferentes tejidos (14). Las membranas basales poseen una considerable fuerza tensional y prestan sostén físico a las estructuras que descansan sobre ellas o son rodeadas por ellas. Así mismo, funcionan como sitio para la fijación celular. (13)

Las funciones de la matriz extracelular son; da el soporte mecánico para el anclaje celular, determina la orientación celular, controla el crecimiento celular, mantiene la diferenciación celular, proporciona un soporte para el tejido nuevo, establece un microambiente para el tejido (12); entre otras cumple una función crucial en la curación de las heridas por sus propiedades quimiotácticas y adherentes. La fuerza de oposición a la herida y las propiedades de la cicatriz dependen en última instancia del depósito de una matriz extracelular adecuada. (13)

1.4 HIPODERMIS

Esta capa, también llamada tejido subcutáneo, está formada por tejido laxo aerolar que suele contener tejido adiposo (panículo adiposo), linfocitos, vasos sanguíneos, fibras nerviosas y tejido conectivo. Sus principales funciones son; almacenamiento de grasa, termoregulación y soporte de la capa dérmica y epidérmica. Estrictamente no se considera como parte constitutiva de la piel. (13)

1.5. ANEXOS DE LA PIEL

Las células que componen la epidermis y la dermis, participan en una compleja interacción para formar los apéndices de la piel. La dermis contiene una variedad de unidades funcionales que incluye folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas, nervios y capilares. Además en la zona del tejido adiposo se localizan venas, arterias y músculo inmediatamente debajo de esta capa. Entre esos apéndices, las glándulas sudoríparas apócrinas secretan lípidos y agua, estas se encuentran establecidas sólo en áreas específicas (15). Las glándulas sudoríparas, tienen la función de secretar agua y sales para realizar la termoregulación. Las glándulas sebáceas, secretan una mezcla de lípidos que ayudan a la permeabilidad de la epidermis. (2)

Los folículos pilosos se originan bajo la dermis, pasan a través de ella y de la epidermis. Están soportados por fibras de elastina y colágena, más abajo sus raíces están soportadas por una red de músculo liso (Figura 3). El pelo de la rata Wistar mide aproximadamente 1cm de longitud en la región dorsal. (5)

Las glándulas sebáceas secretan sobre la epidermis un fluido seroso que pasa a través de un conducto. Las terminaciones nerviosas se localizan en la epidermis y dermis para proveer las sensaciones de tacto, dolor y temperatura. Las terminaciones nerviosas libres están localizadas en la epidermis y alrededor de los folículos pilosos.

Los vasos sanguíneos proveen la nutrición así como asistencia en la presión y regulación térmica. Una serie de vasos sanguíneos en el tejido cutáneo, suministran sangre a la porción inferior de los folículos pilosos. Las ramas de esos vasos sanguíneos nutren el plexus subcapilar que está localizado entre la dermis papilar y la reticular. Los capilares derivados de esos vasos alimentan a las glándulas sebáceas y sudoríparas.

La estructura glandular y vasos sanguíneos en la piel son frecuentemente dañados como resultado de quemaduras, úlceras etc. No siempre los componentes del tejido conectivo son reparados durante la cicatrización de la herida, lo que se debe a un proceso de cicatrización deficiente. Los medicamentos que ayudan en la regeneración de esas estructuras son muy utilizados especialmente por los resultados estéticos. (15)



Figura 3. Piel normal del dorso de la rata Wistar. (e) epidermis, (d) dermis, (fp) folículo piloso, (ta) tejido adiposo Y (tl) tejido laxo. (foto original del trabajo)

CAPITULO 2

PROCESO DE CICATRIZACIÓN EN LA PIEL

Cuando ocurre una herida en la piel se desencadena una serie de fenómenos complejos interrelacionados, que implican tanto la dermis como la epidermis. El tipo y tiempo de cicatrización están dados por el tipo y profundidad de la herida. Sin embargo, el proceso es esencialmente similar para todos los casos. (16, 17)

Después de ocurrida una herida, el proceso de cicatrización sigue su curso dando lugar a que algunas características del tejido en reparación cambien con el tiempo. Por ello para evaluar el efecto realizado por un medicamento o algún material en el proceso de cicatrización de la piel, se debe de llevar un registro de las características relacionadas con estos efectos durante un periodo prolongado, ya que es fundamental para definir lo mejor posible el efecto del material empleado sobre el tejido dañado.

El proceso de cicatrización comprende el reemplazo de tejido muerto por tejido vivo. Las células muertas y otros detritos causados por la lesión se eliminan por un proceso de limpieza de la herida. Las células fagocitarias de la respuesta inflamatoria se ocupan de cumplir esta limpieza. Después de la fase inflamatoria otros mecanismos como; contracción, formación de la matriz extracelular, epitelización, remodelación y reparación completan el proceso de cicatrización.

2.1. PROCESO INFLAMATORIO

Cuando la piel sufre un daño en su integridad como es el caso de una herida, la pérdida de continuidad de la piel origina una hemorragia, muerte celular local y contaminación con microorganismos. Por lo tanto, el proceso inflamatorio ocurre de manera inevitable siguiendo un orden determinado para llevar a cabo el restablecimiento hemostático de la piel. La coagulación sanguínea es el primer proceso que se presenta y comprende dos respuestas: la humoral y la celular (Figura 4).

La respuesta celular tiene que ver con la interacción de plaquetas con la trombina y colágena (18), mientras que en la humoral intervienen elementos contenidos en el plasma. En el momento en que la integridad del endotelio es dañada en el sitio de la herida, ocurre una constricción de los vasos sanguíneos. La oclusión vascular ocurrida en el sitio de daño es importante para ayudar a controlar la hemorragia. Esta oclusión sucede de 5 a 10 minutos después de ocurrida la herida y es seguida por una vasodilatación activa que involucra a todos los elementos de la vasculatura local. Esta vasodilatación se lleva a cabo con los mismos elementos contenidos en el plasma como son; las enzimas, proteínas, anticuerpos, etc. (19)

Los vasos sanguíneos rotos durante la herida, conducen a una extravasación de los constituyentes sanguíneos con agregación de plaquetas y la coagulación de la sangre.

La formación del coágulo se lleva a cabo en el vaso dañado, afectando la hemostasis alrededor del tejido. La fibrina depositada intersticialmente en la zona dañada por los fibroblastos cumple una función importante en las primeras etapas de reparación de las heridas. Las plaquetas, células encargadas de la coagulación de la sangre, inducen hemostasis principalmente por la vía de agregación cuando es aumentada por adenosin trifosfato (ADP) y tromboxanos, seguida por una vaso- constricción mediada por ADP y

serotonina, y por último vía fosfolípido facilitando la unión del factor V de la coagulación con la subsecuente estimulación de la cascada de coagulación. La cascada de coagulación produce por sí misma mediadores tales como trombina y calicreina los cuales son quimioatrayentes para la circulación de leucocitos.

La adhesión y agregación plaquetaria son fundamentales para la hemostasis estimulando un número de componentes generados o expresados en el sitio de la herida, incluyendo trombina y fibras de colágena (20). La trombina generada por el proceso de coagulación, tiene la función de llevar a cabo la congregación de las plaquetas cuando es liberada la fibronectina, fibrina y trombospondina. La liberación de plaquetas de tipo granulo alfa de las citocinas y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), facilita subsecuentemente la quimiotaxis celular (fenómeno por el cual son atraídas otras células al sitio de la herida), proliferación y producción de una matriz extracelular.

El fibrinógeno una vez convertido a fibrina por la trombina forma el coágulo. Este coágulo de fibrina y fibronectina actúa como una matriz provisional para la afluencia de neutrófilos, macrófagos y fibroblastos al sitio en reparación (20). A medida que la superficie del coágulo se va deshidratando forma una costra que brinda una protección limitada contra la contaminación externa manteniendo así la homeostasis interna y proporcionando una superficie por debajo de la cual se da la migración de las células epiteliales. (21)

Una vez terminado el proceso de coagulación, llegan a la herida los diferentes tipos de leucocitos en una secuencia ordenada (Figura 5). Las primeras células en aparecer son los neutrófilos, seguidos de los monocitos. Los neutrófilos hacen su presencia en las primeras horas después de ocurrida la herida, permaneciendo en grandes cantidades por un día o más y finalmente disminuyen su número rápidamente siempre que no haya infección. La primera función de los neutrófilos es la de destruir bacterias.

Los monocitos se originan a partir de células precursoras que se encuentran establecidas en la médula del hueso, al entrar en la región de la herida estas células se transforman en macrófagos cumpliendo con el desbridamiento (limpieza) de la herida mediante la fagocitosis del material necrosado y detritus, estimulando a los linfocitos para que sintetizen anticuerpos. (22)

Los macrófagos también elaboran ciertos factores que promueven la síntesis de DNA, la proliferación de fibroblastos y células endoteliales. La principal acción de los neutrófilos y macrófagos es la fagocitosis de organismos contaminantes y detritus en la herida. Estos últimos alcanzando su mayor número aproximadamente 24 horas después de los neutrófilos y disminuyendo poco después. Un número importante de macrófagos permanece durante varias semanas en las heridas que cierran por primera intención, es decir, heridas que cierran inmediatamente y, más tiempo en heridas abiertas o de segunda intención, que es la cicatrización espontánea con intervención quirúrgica nula, o mínima, dependiendo del grado de daño. (1)

Los macrófagos además producen citocinas como son: el factor de crecimiento transformante TGF- α , TGF- β y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El PDGF es el mitógeno más potente en un suero de células de origen mesenquimático, el cual influye en la proliferación de fibroblastos, neutrófilos y monocitos.

En ocasiones los macrófagos se pueden fusionar entre ellos para la formación de células gigantes multinucleadas las cuales también son fagocíticas. La progresión ordenada de los neutrófilos y macrófagos está correlacionada con la concentración requerida del factor de crecimiento derivado de plaquetas, requerido para llevar a cabo la quimiotaxis máxima. (22)

Siguiendo la entrada de los macrófagos dentro del sitio de la herida, los linfocitos también se establecen en el sitio de inflamación. La presencia de los linfocitos en reacciones inflamatorias indica la presencia de una respuesta inmune a material extraño (22). La interacción entre célula-célula leucocitaria es la responsable de que los leucocitos rodeen el sitio de la herida, cuando se realiza una incisión lineal en ratas conduce al incremento de la producción de colágeno e infiltración de los fibroblastos. (23)

La interacción entre las linfocinas determina el eventual resultado en la cicatrización de las heridas. En las etapas tempranas de cicatrización de la herida, las células T- ayudadoras promueven la actividad de los macrófagos. Esta estimulación, es rápidamente suprimida por las células T- supresoras, dando como resultado la regulación del sistema. Si esto no ocurriera, podría conducir a una inflamación crónica (24). La duración y la intensidad del proceso inflamatorio está determinado en la severidad del trauma sufrido por el tejido.

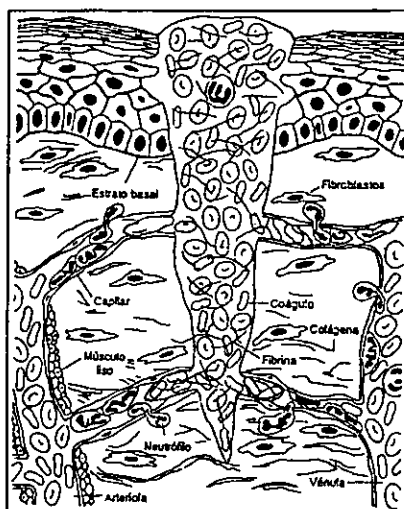


Figura 4. Fenómenos iniciales en la reparación de la piel. La formación del coágulo ha ocurrido y el espacio de la herida se ha llenado. Los capilares se han obstruido y se logra la hemostasia. (Tomado de Banks J. William. Histología veterinaria aplicada, Ed. Manual moderno, 1996 457p).

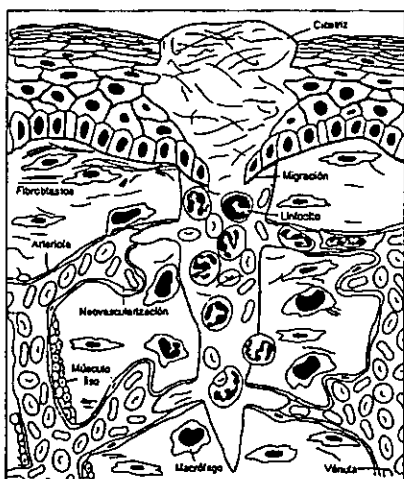


Figura 5. Etapas de inducción e iniciación de la inflamación. Las células inflamatorias han invadido el sitio de la herida. Se inicia la neovascularización y la migración celular epidérmica. (Tomado de Banks J. William. Histología veterinaria aplicada, Ed. Manual moderno, México. 1996. 458p).

2.2 PROLIFERACIÓN

Esta fase de reparación de la herida, está caracterizada por la formación de tejido de granulación, con la migración y proliferación de fibroblastos, la formación de la barrera epitelial, neovascularización y la producción y depósito de moléculas de la matriz extracelular particularmente la colágena (Figura 6).

2.2.1 Fase fibroblástica

Los fibroblastos son los responsables de la formación de los componentes del tejido conectivo, específicamente la colágena (Figura 7) y los glicosaminoglicanos (mucopolisacáridos), y en un estadio más tardío son los responsables de la formación de las fibras elásticas. (18)

Aproximadamente 72 horas después de producida la herida, los fibroblastos y capilares se infiltran en el sitio de la herida poco después de los leucocitos en respuesta al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β). La matriz provisional rica en fibronectina y fibrina, sirve como guía para la migración celular funcionando como una base para el movimiento celular. (25)

Los fibroblastos sufren un proceso de proliferación, asociada con la entrada de las células a G0 (quiescentes) dentro de la fase temprana G1 del ciclo celular y es controlado por el PDGF, FGF-2 y fosfato de calcio.

La producción de colágena por los fibroblastos es regulada primeramente por TGF- β (26), y FGF-2 en reparación de heridas normales (27). El PDGF indirectamente estimula la síntesis de colágena mediante la estimulación de los fibroblastos para producir TGF- β (28). Grandes cantidades de fibronectina, ácido hialurónico y colágena tipo I y tipo III, son depositadas inicialmente para formar el tejido de granulación inmaduro. En especial, la fibronectina cumple un papel importante en la adhesión celular y está involucrada en la remodelación de la matriz extracelular, debido a la fagocitosis de partículas extrañas en el área de la herida por macrófagos y fibroblastos. (29)

Además de la función de producir la matriz extracelular, los fibroblastos están involucrados en el proceso de contracción de la herida, estos sufren un cambio en su fenotipo con largos paquetes de actina arreglados paralelamente a lo largo del eje de la célula; a medida que aumenta el contenido de colágena en el sitio de la herida, decrece la cantidad de glucoproteínas y mucopolisacáridos, así como también el número de fibroblastos. La disminución de estas células marca el final del estadio de reparación y el comienzo del de maduración. Con la reducción del número de fibroblastos, decrece la síntesis total de colágena y por último se equilibra la tasa de destrucción del mismo. Esta destrucción puede ser el resultado de la liberación de colagenasas, por parte de las células epiteliales y fibroblastos en proliferación, que toman contacto con el nuevo epitelio. (21)

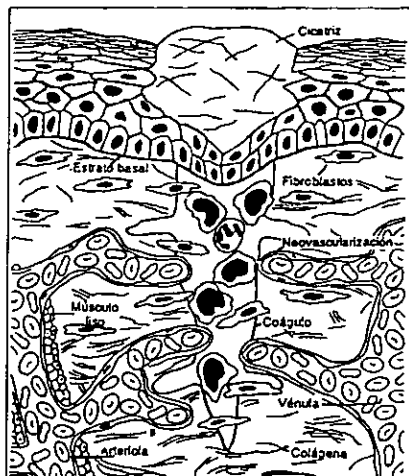


Figura 6. Etapa proliferativa de la reparación de una herida. Persiste la inflamación y las células epidérmicas migran sobre la herida por debajo de la costra. Continúa la neovascularización y los fibroblastos invaden el coágulo con nuevos vasos sanguíneos (Tomado de Banks J. William. Histología veterinaria aplicada, Ed. Manual moderno, México. 1996. 458p).

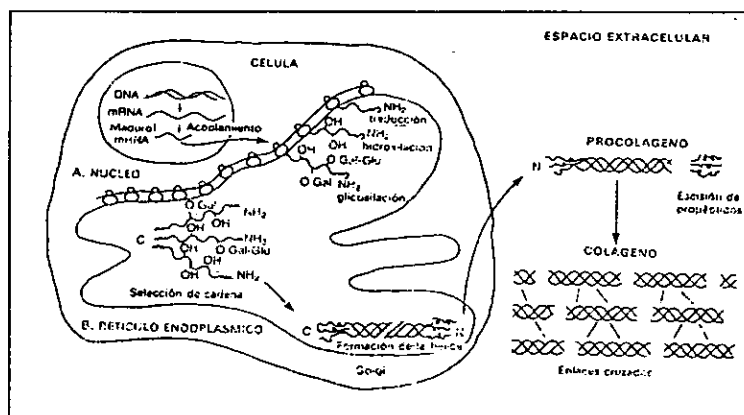


Figura 7. Fases de la síntesis de la colágena. (Tomado de Stanley L. R. Patología estructural y funcional, Ed. Interamericana, México 1988. 81p).

2.2.2 Fase de contracción

La contracción de la herida es importante en el proceso de reparación del tejido y es modulada por los fibroblastos. La contracción es la reducción mecánica del tamaño de la herida por acción de los fibroblastos llamados miofibroblastos en este caso por realizar la función de contracción en la reparación de tejido. En algunas circunstancias la retracción reduce el tamaño del defecto original hasta en un 70%, y si se impide esta retracción puede dar como resultado la formación de cicatrices grandes y antiestéticas en la piel. Los miofibroblastos aparecen en la zona de la herida a los 2 ó 3 días de haberse producido la lesión y migran hacia la herida para su contracción activa.

La cicatrización de la piel implica tanto a la dermis como la epidermis, involucra procesos complejos que llevan a la formación de nuevo tejido. Los miofibroblastos responden a factores de crecimiento, siguiendo diferentes rutas como por ejemplo el TGF- β -1 que aumenta la contracción de células del tejido de granulación con un efecto mayor en los fibroblastos en estados tardíos de la reparación y el TGF-2 a bajas dosis tiene un efecto moderado, pero a altas dosis el TGF-2 es un inhibidor para todas las células. (13)

2.2.3 Fase de Epitelización

Cuando la piel sufre un daño en su integridad anatómica, y en especial la capa epidérmica, se ve en la necesidad de aumentar la actividad mitótica de sus células epidérmicas para iniciar su proceso de regeneración. Las células del estrato basal a lo largo de los bordes de la herida migran a través del defecto. El resultado de esta migración y proliferación de las células epidérmicas es el establecimiento de una barrera epidérmica (Figura 8). Inicialmente la capa epidérmica aumenta en grosor considerablemente debido a la alta tasa de proliferación de los queratinocitos en la zona y conforme avanza el tiempo de cicatrización, esta capa va disminuyendo en su grosor hasta establecerse en un grosor definido.

El proceso de reepitelización es esencial para llevar a cabo la reconstitución de la barrera cutánea. Estudios realizados sobre el proceso de reepitelización en heridas de piel en modelos como la rata, cobayo etc, establecen que la migración y proliferación en una herida comienza de 16 a 24 horas después de haberse producido la herida (30), mediante el movimiento de las células epiteliales desde la orilla del tejido libre no dañado hasta la zona defectuosa. Las células de la capa epidérmica semejan hojas o láminas de epitelio estratificado que se mueven una sobre la otra. Todas las células epiteliales sufren una alteración evidente en su fenotipo, lo que incluye una retracción de tonofilamentos intracelulares, disolución de los desmosomas (estructuras que unen a las células epiteliales), y de este modo proporcionan resistencia al epitelio, y formación de filamentos representados en la periferia del citoplasma. La alteración del fenotipo de la célula epitelial es importante para poder dar movilidad a la célula.

Algunos estudios revelan cambios en la arquitectura de los queratinocitos localizados en el borde de la herida. Esos cambios incluyen una hipertrofia celular, una fragmentación de filamentos de queratina y su retracción desde el borde de la periferia del citoplasma y alteraciones en el número y estructura de desmosomas. (30)

Durante 1 ó 2 días, las células epiteliales del borde de la herida comienzan a proliferar, generando una población adicional de células migratorias. Las células epiteliales migran sobre una matriz provisional, si es que la membrana basal no ha sido destruida en su totalidad. Los hemidesmosomas que enlazan las células epiteliales y la membrana basal son

temporalmente rotos durante la migración (20). La migración celular en general se da en una forma de una lámina epitelial estratificada y en fases tempranas del proceso, estas no son afectadas por inhibidores de la actividad mitótica de las células. Sin embargo, tener una alta actividad mitótica es de vital importancia para suplir el requerimiento de células para sostener la reepitelización.

La reepitelización es llevada en forma independiente a la contracción de la herida y en general ofrece una cobertura temporal mientras la herida se contrae.

En heridas abiertas por lo general transcurre un periodo de latencia de 4 a 5 días antes de que el epitelio comience a migrar desde los bordes de la misma a través del tejido de granulación desarrollado. El epitelio adyacente a los bordes de la herida, presenta varios estratos celulares de espesor con diferenciación celular, queratinización y mitosis en los estadios profundos. Cerca del centro de la herida el espesor se reduce a un sólo estrato de células aplanadas. Al principio el proceso de reepitelización es rápido, pero a medida que la cobertura celular se va alejando del borde de la herida y tiende al monoestrato, el progreso se hace más lento. Antes de que la epitelización sea completada pueden pasar días o semanas. Si hay costra, el epitelio en migración se mueve por debajo de ella hasta contactar con el lecho de tejido de granulación subyacente. Durante esta fase, el tejido de granulación es removido por un proceso, el cual involucra la fagocitosis de fibras de colágena.

Las células epiteliales producen una colagenasa que disuelve la base de la costra de forma tal que esta se pueda desprender. Un posible mecanismo para remover a las fibras de colágena involucra la liberación de interleucina --1 secretada por los macrófagos, los cuales estimulan a los fibroblastos para que sinteticen la colagenasa ayudando a las células epiteliales a remover el tejido para llevar acabo su migración sobre el espacio ocupado por el tejido dañado. (31)

La superficie inferior del epitelio recién formado presenta un predominante desarrollo hacia la profundidad, invadiendo al tejido conectivo subyacente, dando lugar a los clavos interpapilares o espuelas epiteliales. Estas pueden involucionar dejando una superficie epitelial relativamente lisa o separarse del epitelio. La superficie lisa profunda del epitelio es la responsable de que se desprenda con facilidad.

La fibronectina juega un papel importante en la fase temprana de la cicatrización de la herida. La expresión alta de esta proteína es sobre regulada después de producida la herida. Conjuntamente la fibronectina y fibrina actúan como una matriz provisional y promueve la migración de los queratinocitos.

La laminina es importante para la atracción y mantenimiento de la diferenciación de los estratos epiteliales que están íntimamente unidos con la membrana basal. (32, 33)

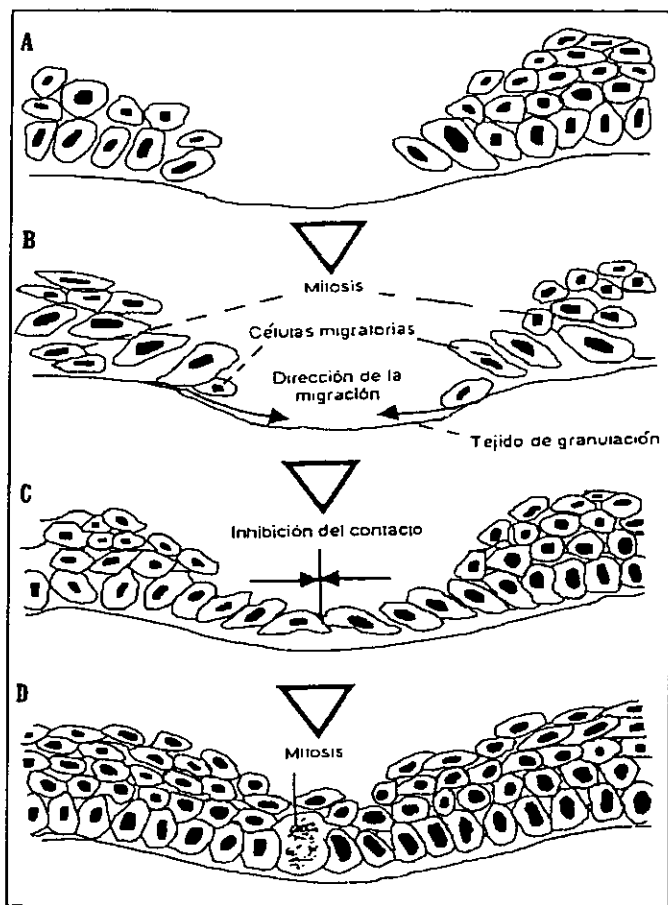


Figura 8. Epitelización de una herida abierta. **A,** Las células epidérmicas basales del borde de la herida se aflojan de su inserción en la dermis. **B,** Las células epidérmicas del borde de la herida se extienden hacia la profundidad y exterior del borde cutáneo, sobre la dermis. **C,** La migración de las células epiteliales se detiene por medio de la inhibición por contacto. **D,** Las células epiteliales proliferan y se diferencian (Tomado de Steven F. S., Ralph A. H and Rhoda S. P. Small animal wound management, Ed. Lea & Fibiger, Philadelphia London. 1990. 6 p).

2.2.4 Angiogénesis

La cicatrización de las heridas no puede llevarse a cabo sin el proceso angiogénico. La angiogénesis; es la formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes (Figura 9). Esta ocurre en una serie de patologías, incluyendo la cicatrización de las heridas. Las células endoteliales próximas a la lesión, se dividen y forman unos brotes sólidos que parten de los vasos preexistentes. En la cicatrización por segunda intención, las asas capilares hacen salientes en la superficie de la zona en reparación, los cuales se observan macroscópicamente como granulaciones rojizas, por lo que a este tipo de neoformación se le denomina tejido de granulación. (9)

La vasculatura comprende más del 60% del tejido de reparación. Un suplemento abundante de sangre es necesario para satisfacer la enorme demanda metabólica a nivel local de desbridamiento y la fibroplasia de las células endoteliales en la angiogénesis, más que jugar un papel nutritivo, son un organizador y un regulador en las heridas. (19)

Después de dos o tres días de haber sido lesionado el tejido, aparecen las primeras yemas capilares de neoformación, a partir de los vasos de las áreas circundantes. La laminina es importante para la atracción y manutención de células endoteliales (32, 33). Las células endoteliales se multiplican y extienden su citoplasma, formando un tubo en el que se observan glóbulos rojos y leucocitos. Rápidamente se anastomosan a la vez que crecen hacia el interior del área de necrosis, pero en sentido perpendicular a la superficie de la herida (9, 34). La vascularización se coordina junto con otros eventos como por ejemplo la coagulación, inflamación etc. Estos eventos son esenciales para la formación sucesiva de la costra. (19)

Las citocinas, componentes de la matriz extracelular, gradientes metabólicos y las fuerzas físicas son importantes como reguladores de la angiogénesis. Muchos factores angiogénicos modifican el medio de las células inflamatorias y fibroblastos y a través de sus efectos en los vasos. La angiogénesis forma parte de la reparación del tejido, debido a sus mecanismos y controles sobre ella. Es probable que los fibroblastos y los leucocitos actúen teniendo efectos en el crecimiento de los vasos sanguíneos, lo que sugiere que hay un gran número de vías por las cuales puede ser influida la reparación. (19)

Las células endoteliales secretan citocinas y tienen un control en la infiltración de las células involucradas en el proceso inflamatorio (35). La angiogénesis tiene un papel importante en la nutrición celular. (9)

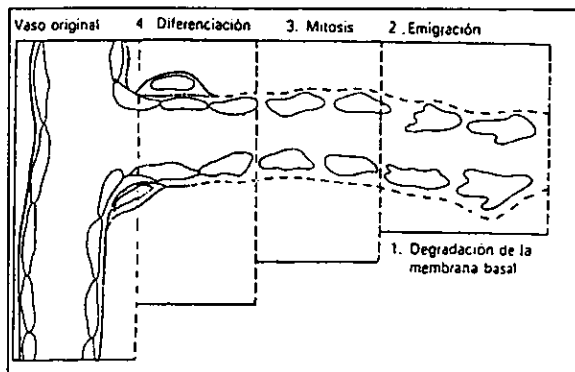


Figura 9. Los cuatro pasos de la angiogénesis. A la izquierda está el vaso original. 1. Degradación de la membrana basal y matriz extracelular. 2. Emigración del endotelio. 3. Proliferación endotelial (mitosis). 4. Organización y maduración. (Tomado de Ausprunk D. h in Houck, J. C. Ed: *Chemical Messengers of the inflammatory process*. Amsterdam, Elsevier/North Holland, 1979).

2.3.- REMODELACIÓN Y REPARACIÓN

La reparación es el reemplazo de tejido muerto por tejido de granulación que eventualmente madura a tejido cicatrizal. En las heridas en que la lesión llega al tejido conectivo y dermis, las células mesenquimáticas o precursoras se activan y proliferan dando origen a fibroblastos activos. Estas células sintetizan y secretan componentes de la matriz extracelular como fibronectina, proteoglicanos y colágenas tipo I y III.

De 48 a 72 horas de producida la lesión comienza una importante proliferación vascular que se extiende por varios días. La fase inicial de la reparación se caracteriza por la presencia de células inflamatorias, algunos detritos y abundante acumulación de fibroblastos y capilares.

La síntesis de colágena por los fibroblastos comienza a las 24 horas de ocurrida la herida, pero su depósito no se evidencia en el tejido hasta los 4 días de producida la lesión. Al principio predomina la colágena tipo III, pero después de 7 a 8 días se destaca la colágena tipo I que eventualmente se convierte en la colágena principal del tejido cicatrizal maduro.

Después de las etapas iniciales de la reparación se establece la fuerza tensional, los capilares se reabsorben y comienza la movilización del tejido. Por lo tanto, es necesario que las fibras y haces de colágena se reorienten de acuerdo con las nuevas líneas de fuerzas. A pesar de la gran actividad de la colagenasa en la herida, la colágena se acumula con una velocidad constante y por lo general, llega a su máximo a los dos o tres meses de ocurrida la lesión. La fuerza tensional de la herida sigue aumentando constantemente meses después de que el contenido de colágena alcanza su máximo. A medida que el contenido de colágena de la herida aumenta, muchos de los vasos neoformados desaparecen (Figura 10). Esta involución vascular de los vasos sanguíneos o desvascularización que tiene lugar en pocas semanas finaliza junto con otros procesos como; la síntesis de los componentes del tejido conectivo y epitelización (Figura 11). (13)

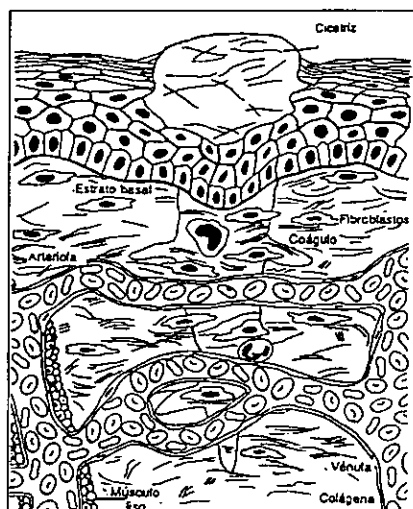


Figura 10. La proliferación continúa en el sitio de la herida. Se completa la neovascularización.

Los fibroblastos siguen proliferando y producen materiales de la matriz extracelular. (Tomado de Banks J. William. Histología veterinaria aplicada, Ed. Manual moderno, México 1996. 459p).

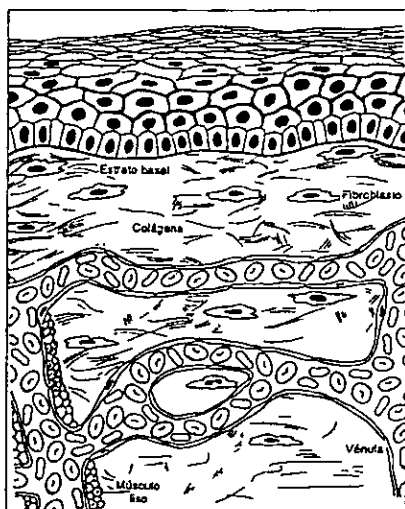


Figura 11. Se completa la reparación de la herida aumenta la fuerza de la misma y origina la remoción del exceso de colágeno. (Tomado de Banks J. Willam. Histología veterinaria aplicada. Ed. Manual moderno, México 760p).

2.3.1 Remodelación

El proceso de regeneración de heridas cutáneas es complejo, se induce una alteración secuencial en las proteínas de la matriz extracelular, la liberación de factores de crecimiento y la secreción de estimuladores de citocinas. Uno de los componentes más importantes de este proceso, es la migración de queratinocitos sobre la dermis dañada para formar un nuevo estrato epidérmico bajo condiciones normales. Los queratinocitos se depositan sobre una membrana basal compuesta de proteínas tales como laminina, colágeno tipo IV y el proteoglicano heparán sulfato. Durante el proceso de cicatrización de las heridas en la migración epidérmica, los queratinocitos están expuestos sobre una cicatriz provisional que contiene material de la matriz extracelular (ECM) que incluye material de fibrina, fibrinógeno, fibronectina, tenacina y vitronectina. La presencia de fibronectina y fibrinógeno tienen un efecto importante en la migración de los queratinocitos funcionando como una base para la movilización de las células.

Los intentos del organismo para reparar las lesiones inducidas por agresiones locales comienzan muy tempranamente en el proceso de inflamación y finalmente concluyen con la reparación y sustitución de las células lesionadas por células sanas. La reparación generalmente implica dos procesos diferentes:

- 1) *Regeneración*; es la sustitución del tejido lesionado por células parenquimatosas del mismo tipo, a veces sin residuos de la lesión previa,
- 2) *Sustitución por tejido conjuntivo*; que en su estado permanente constituye una cicatriz.

Después de la llegada inicial de las células inflamatorias provenientes de la sangre al sitio de la herida, los fibroblastos acuden al área de la lesión. Los fibroblastos inactivos tienen un aspecto ovalado, un citoplasma amorfo y un núcleo homogéneo elongado. Esta morfología, es compartida por lo menos por tres tipos celulares de origen mesodérmico funcionalmente distintos; células precursoras de los tejidos conectivos, histiocitos o células con receptores Fc con capacidad fagocitaria y fibrocitos o células especializadas en la síntesis de componentes de la matriz celular. Los tres tipos de células son importantes en la respuesta de reparación. Además de las células endoteliales, macrófagos, plaquetas y células parenquimatosas del mismo órgano lesionado participan en la reacción de reparación. (16)

Las células del organismo se dividen en tres grupos, dependiendo de su capacidad regenerativa (Figura 12):

1. Células lábiles: Son aquellas que proliferan durante toda la vida sustituyendo células que son destruidas continuamente, éstas células siguen el ciclo celular, de una mitosis a la siguiente. Entre estas células están los epitelios superficiales de la piel
2. Células quiescentes o estables: Son aquellas que muestran un bajo nivel de multiplicación normal. Pueden considerarse en G_0 , pero pueden ser estimuladas a G_1 por medio de un estímulo apropiado. Estas células pueden comenzar a dividirse rápidamente respondiendo a diversos estímulos, por lo que son capaces de reconstruir el tejido original.
3. Células permanentes: son células que no se dividen, han abandonado el ciclo celular y están destinadas a envejecer y morir.

Para que la reparación del tejido sea ordenada, tiene que estar conservada la trama de sostén (estroma) de las células parenquimatosas. La membrana basal parece ser la estructura necesaria para que ocurra la regeneración ordenada, constituyendo el armazón para la multiplicación de las células parenquimatosas. Cuando se rompen las membranas basales, las células proliferan al azar, produciendo masas desorganizadas sin un parecido a la estructura original, comenzando así la cicatrización.

En los mamíferos adultos, el tejido conjuntivo y las células mesenquimatosas (fibroblastos, endotelios, músculo liso, condrocitos y osteocitos) son quiescentes, es decir, son células que se pueden dividir y regenerar.

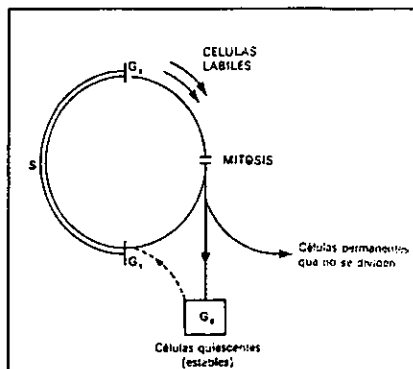


Figura 12. Poblaciones celulares y fases del ciclo celular. Las células lábiles siguen el ciclo, una mitosis tras otra. Las células permanentes han abandonado el ciclo y están destinadas a morir sin volver a dividirse. Las células estables en G_0 no están en el ciclo ni muriendo y pueden ser inducidas a entrar al ciclo celular por medio de un estímulo adecuado. (Tomado de Baserga R. The cell cycle. N. Eng J. Med. 304:453 1981).

2.3.2 Reparación

La fase de reparación de la herida, está caracterizada por la formación del tejido de granulación, migración y proliferación de fibroblastos, formación de la barrera epitelial, neovascularización, producción y depósito de moléculas de la matriz extracelular particularmente colágena (Figura 14).

La cicatrización comienza con la inflamación, cuando los macrófagos comienzan a digerir los microorganismos que han sobrevivido al ataque de los neutrófilos, detritus de las células parenquimatosas y neutrófilos muertos. A veces 24 horas después de la lesión, comienzan a proliferar los fibroblastos y las células endoteliales, formando de tres o cinco días un tejido especializado o tejido de granulación que es el rasgo fundamental de la curación en la inflamación

Al ocurrir un daño en la piel, la ruptura de vasos sanguíneos provoca la acumulación de plaquetas que se adhieren y se agregan para formar un coágulo. El proceso inflamatorio que se observa pocas horas después, implica la alteración de la permeabilidad capilar, infiltración de neutrófilos, macrófagos, exudado de proteínas, inmunoglobulinas y glicoproteínas (36). Los macrófagos desempeñan funciones importantes como la fagocitosis de organismos patógenos, secreción de quimioatrayentes y citocinas, así como de colagenasas y de hialuronidasas que influyen en el tejido de granulación y en el proceso de reepitelización. (37)

La reepitelización es la migración y proliferación de células epiteliales para cubrir la zona dañada. Si la membrana basal no ha sido perdida, se observa con frecuencia una reepitelización rápida (17, 20). Cuando la herida es de grosor total (perdida de todas las capas de la piel) y se ha perdido la membrana basal, el fluido y el exudado proteico forman una cicatriz provisional (36, 38), sobre la que ocurre la migración epitelial, esta matriz cambia de composición conforme cicatriza la herida y madura el tejido de granulación. (20) La reepitelización implica un balance controlado entre la proliferación y la migración. Los queratinocitos sufren alteraciones fenotípicas tales como la serganización de desmosomas, la formación de filamentos de actina periféricos, el cese de los márgenes de la herida, la modificación en la presencia de integrinas y de las queratinas K6 y K16. (36, 30)

La formación del tejido de granulación se traslapa con el proceso de reepitelización. El tejido de granulación consiste; en la acumulación de macrófagos y fibroblastos, el depósito de tejido conectivo laxo y la angiogénesis (20). La matriz provisional de fibronectina, fibrinógeno, tenascina que previamente se deposita en la herida (36), es reemplazada gradualmente por fibronectina de tipo embrionario, fibrina, proteoglicanos y grandes cantidades de colágena tipos I y III. La remodelación de la herida continuará por largo tiempo, lapso en el cual las fibras de colágena se orientan y forman la cicatriz. (39)

No se conoce con claridad cómo están implicadas en la cicatrización las citocinas, metaloproteínas y enzimas relacionadas. Sin embargo, las plaquetas y macrófagos, así como las células epiteliales y fibroblastos, reflejan un mecanismo molecular que sinergiza y regula la regeneración del tejido. De esta manera finalizan todos los eventos del proceso de cicatrización. (40, 41, 42)

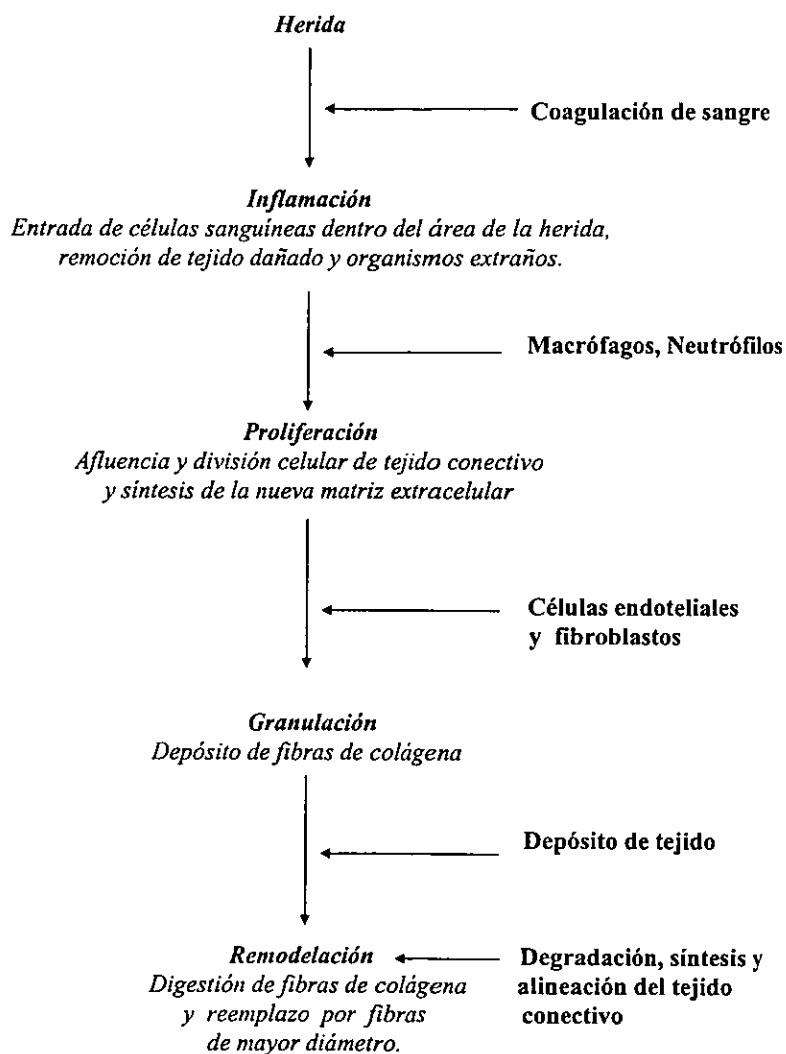


Figura 13. Diagrama esquemático que ilustra los eventos que preceden una cicatrización (Silver et al, 1991).

2.4 FACTORES SISTEMICOS Y MEDIO AMBIENTALES QUE AFECTAN EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN.

Muchos factores del medio pueden afectar el proceso de la cicatrización de la herida. En general, los factores que influyen favorable o desfavorablemente en el proceso de cicatrización se pueden dividir en locales y generales.

Factores locales

Formación y amplitud de la herida: A mayor amplitud e irregularidad de la lesión, el tiempo requerido para la reparación es mayor; entretanto la inflamación y la fibroplasia son más intensas. (9)

Infección: Las heridas son una puerta de entrada para los microorganismos. La infección retarda o impide la curación, promueve la formación de tejido de granulación exuberante y puede dejar grandes cicatrices. (13)

Aporte de oxígeno: El alto nivel de aporte sanguíneo es determinante para la pronta reparación de la herida ya que por medio de la sangre llegan al foco de la lesión, oxígeno, nutrientes y leucocitos, que constituyen la materia prima para la eliminación de detritus celulares y la sustitución del tejido destruido por tejido fibroso. (9)

Factores generales

Edad: Conforme avanza la edad del paciente, ésta puede influir en la respuesta inflamatoria, reparadora del proceso de cicatrización, haciéndolo más tardado. (13)

Nutrición: Tiene un efecto profundo sobre la curación de las heridas. En los animales carentes de proteínas, parece estar inhibida la síntesis de colágena. Una dieta rica en proteínas acelera la velocidad de reparación de la herida. Es necesario tener niveles adecuados de vitamina C para la síntesis de colágena normal. Los déficits de esta vitamina dan lugar a alteraciones en la síntesis de colágena. Algunas enzimas, como las metaloenzimas y las polimerasas de ADN y ARN son dependientes del zinc, por lo que la curación de las heridas se atrasa en los pacientes con deficiencia de zinc, normalizándose al ser éste suministrado. (13)

Alteraciones hematológicas: Los déficits de neutrófilos en la sangre periférica o los defectos de quimiotactismo y fagocitosis de los leucocitos son causas de aumento de la susceptibilidad para las infecciones bacterianas. (13)

Diabetes: Los pacientes diabéticos tienen una mayor susceptibilidad a las infecciones, por lo que son más vulnerables a la invasión bacteriana, resultando un atraso de la curación de la herida. (13)

2.5 IMPORTANCIA DE LA PRESENCIA DE CALCIO Y ZINC EN EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN

2.5.1. Calcio

El calcio (Ca^{2+}) juega un papel importante en la regulación de la diferenciación celular y descamación de los queratinocitos epidérmicos (43), cumple una función clave en la regulación y coordinación de la diferenciación terminal de las células, puede ser precursor de varios eventos terminales asociados con el estrato córneo.

Se ha demostrado que el calcio actúa en la fase S del ciclo celular, justo previo a la síntesis de DNA (44), y además es esencial para la formación de desmosomas y la adhesión celular. El calcio es necesario para la activación de algunos sistemas enzimáticos como por ejemplo la fosfolipasa A, que está involucrada en el proceso de disolución de gránulos de queratohialina y en el entrecruzamiento de los precursores de la cubierta córnea vía calcio dependiente de transglutaminasas (45). El calcio, está involucrado en la formación inicial de la bicapa lipídica en el interior del estrato córneo, y se ha sugerido que puede estar involucrado en un mecanismo protector de corneomas (desmosomas modificados) contra la proteólisis prematura y/o en la inhibición de enzimas proteolíticas involucradas en la descamación. (46)

2.5.2. Zinc

El zinc (Zn) es el segundo metal más abundante en el cuerpo humano y se encuentra presente en todas las células y secreciones del cuerpo. La concentración de zinc en un humano adulto va de 90 a 130 $\mu\text{g/ml}$ de sangre y de ello el 20% del total se encuentra localizado en la piel, en forma de metaloproteínas. (47)

La fuerza con que se unen los iones de zinc a varias proteínas ha servido para establecer una división entre dos clases de proteínas; las metaloproteínas (con una firme unión del metal a la proteína) y las complejo metaloproteínas (con una débil unión del metal a la proteína). (48)

El zinc forma parte de más de 70 metaloproteínas presentes en el organismo como por ejemplo las polimerasas de DNA y RNA, transcriptasas reversas, proteasas y más de 300 proteínas que tienen un papel central en la reconstrucción de la piel lesionada (47, 49), sus propiedades físicas y químicas le permiten cubrir las necesidades de las proteínas y enzimas que sostienen diversas funciones biológicas.

El zinc es esencial para llevar a cabo las actividades de muchas enzimas que están involucradas en la síntesis de proteínas, lípidos y además posee una acción antibacterial, ya que se ha reportado que actúa inactivando el sistema enzimático de las bacterias. (50)

Se ha reportado que las concentraciones de zinc cambian dependiendo del proceso de la cicatrización de la herida de acuerdo con los eventos en progreso. Estudios experimentales muestran que las concentraciones de zinc en los márgenes de las heridas son 15-20.5% más altas que en el resto de la piel, este incremento es suministrado por el zinc en el plasma. Se ha mostrado que la administración tópica de zinc reduce la fase inicial de la hemorragia de una herida en piel y promueve el crecimiento tanto de la piel dañada como de pelo. (47,48) Los iones de zinc son considerados por su habilidad para promover la regeneración de las heridas. El zinc intracelular semeja la acción de los factores de crecimiento en la activación de quinasas intracelulares y fosforilación de proteínas tirosina. Esto puede proveer una reacción bioquímica por efectos tópicos de zinc en la cicatrización de heridas.

Sin niveles adecuados de zinc, las células epiteliales y los fibroblastos pueden migrar normalmente pero no pueden multiplicarse, por lo tanto la epitelización no puede ocurrir y la síntesis de colágena es inadecuada. El zinc estabiliza la membrana lisosomal y celular, el zinc en niveles altos puede inhibir o disminuir la fagocitosis e interferir en el entrecruzamiento de la colágena.

La administración de zinc a pacientes puede ayudar en la restauración de la cicatrización de heridas normales. (24)

La collagenasa es una proteína dependiente del zinc y forma parte de las enzimas de la matriz metaloproteínasa (MMPs). Las MMPs participan en la remodelación del tejido conectivo. El zinc y el calcio juegan un papel importante en la estabilización de la estructura terciaria de la collagenasa. Las MMPs son las responsables para fragmentar componentes de la matriz extracelular durante la remodelación normal del tejido conectivo en la cicatrización de las heridas. Los miembros de la familia de las MMPs incluyen a las collagenasas, gelatinasas, etc. Estas enzimas son reguladas por factores de crecimiento, hormonas y metaloproteínas inhibitoras de tejido (TIMPs).

El óxido de zinc ha sido usado como constituyente de medicamentos aplicados en heridas y se ha demostrado que su aplicación tópica incrementa los niveles de zinc local y sistémico. (51, 52)

La administración del zinc en forma acuosa, pasta, crema, en un vehículo anfílico, etc., tiene una influencia importante en la cantidad y porcentaje de zinc absorbido por el organismo influyendo de esta manera en el micro ambiente de la herida. (47)

2.6 GENERALIDADES DE LAS ZEOLITAS

Las zeolitas son caracterizadas como cerámicas. En particular las cerámicas zeolitas de tipo ALPO-CHA enriquecidas con Zn y Ca^{2+} , son aluminofosfatos hidratados altamente cristalinos, cuya estructura presenta canales y cavidades ocupados por iones y moléculas de agua con gran libertad de movimiento. (53) (Figura 14)

La primera aplicación de las zeolitas de tipo aluminosilicatos fue como tamices y en tal calidad se encuentran los refrigeradores caseros, donde separa las trazas de agua que pueden pasar a la sustancia congelante del aparato, y también como el secado de gases y separación de los hidrocarburos. También se ha añadido a los detergentes para disminuir sus agentes nocivos, para fabricar gasolina a partir del metanol y para romper las moléculas de petróleo. En Japón que cuenta con vastos yacimientos de zeolita se ha convertido en práctica común añadir este mineral al alimento que se da a aves y cerdo. (54)

Las cerámicas, son regularmente usadas para reparar y reconstrucción de tejido conectivo, enfermedades y daños en diferentes partes del cuerpo.

Durante las últimas décadas, se ha recurrido al uso de las cerámicas para mejorar la calidad de vida de los humanos. Las cerámicas usadas para ese propósito son las llamadas biocerámicas. (55,56)

Cabe señalar que no existen reportes en la literatura sobre el uso de las zeolitas en el campo médico.

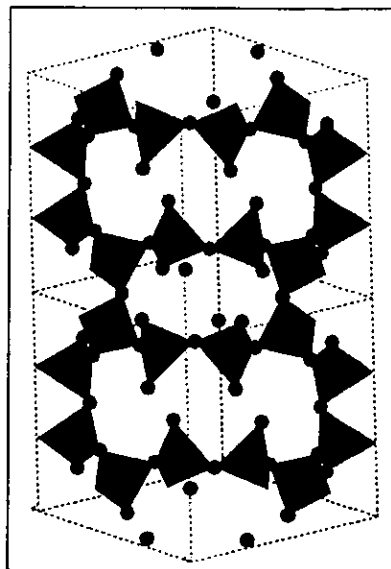


Figura 14. Estructura de una zeolita.
(Tomada de Gonzáles G, et al. Synthesis and characterization of ZnAPO-34 molecular sieve with CHA structure type. Microporous and Mesoporous Materials. 25.1998. 106p)

2.6.1 Características de los materiales empleados en la experimentación:
cerámicas Zeolitas AlPO enriquecidas con Ca²⁺ al 0.5 % y al 1.1 % en peso y Nitrofurazona (Furacín)

Zeolitas AlPO enriquecidas con Zn y Ca²⁺ al 0.5% y al 1.1% en peso

Clasificación: cerámicas zeolitas tipo AlPO (aluminio-ortofosfatos)

Nombre químico: Zeolitas tipo CHA (chabazita).

Propiedades farmacológicas: no hay literatura sobre su empleo como material de uso médico. (57)

Nitrofurazona (furac  n).

Clasificación: Antiséptico

Nombre químico: 5-nitro-2-furaldehído-semicarbazona.

Propiedades farmacológicas: La nitrofurazona es un fármaco sintético derivado del furano que se presenta como polvo cristalino amarillo, inodoro, poco soluble en agua y en alcohol. Posee actividad bacteriostática. El efecto antibacteriano se atribuye a la inhibición que la nitrofurazona ejerce sobre las enzimas requeridas para el metabolismo aeróbico y anaeróbico de los carbohidratos bacterianos. El desarrollo de resistencia bacteriana en la nitrofurazona es limitado y cuando ocurre no presenta resistencia cruzada con sulfon  midas o con antibióticos. Se emplea típicamente en el tratamiento y prevención de infecciones mixtas que ocurren en heridas superficiales, en quemaduras y úlceras cutáneas. Se le ha empleado junto con corticoides (hidrocortisona), para aliviar la inflamación, eritema, edema local y prurito en algunas dermatosis. (58,59)

2.7 HIPOTESIS y OBJETIVOS

Hipótesis

Si el calcio y el zinc juegan un papel importante en el proceso de cicatrización en las heridas en piel, entonces se espera obtener un mejor proceso de cicatrización y diferenciación celular en heridas de piel, empleando materiales que contengan estos elementos, para lo que se proponen las cerámicas zeolitas AlPO enriquecidas con Zn y Ca^{2+} al 0.5% y al 1.1% en peso, por contener esos elementos.

Objetivos

General

- Analizar el efecto de la zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso y zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso, en el proceso de cicatrización de heridas en piel en animales de laboratorio (rata Wistar), comparándolas con un medicamento conocido (Nitrofurazona) a 15, 30 y 45 días de experimentación.

Particulares

- Registrar y observar a nivel externo los cambios evolutivos sucedidos en el proceso de cicatrización de las heridas realizadas en los animales de laboratorio a los que se les administraron los distintos materiales a evaluar:
 - a) Zeolita enriquecidas con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso.
 - b) Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso.
 - c) Nitrofurazona (Furacín) – control positivo
 - d) Sin administración – control negativo
- Realizar un estudio morfométrico del grosor de la capa epidérmica y del estrato córneo en cada una de las muestras.
- Realizar una descripción y un análisis histológico a cada una de las muestras en estudio.
- Observar las diferencias que puedan existir entre las características macroscópicas y microscópicas para evaluar los materiales propuestos y compararlos entre sí.

CAPITULO 3

MÉTODOLOGIA

3.1. MATERIALES Y MÉTODO

Se trabajó con 60 ratas de la cepa Wistar, hembras, juveniles, con peso aproximado de 250g, las cuales se mantuvieron durante un periodo de cinco días en aclimatación. Al término del cual se separaron en tres grupos de experimentación de 20 ratas cada uno, correspondiendo al primer grupo 15 días de experimentación, al segundo 30 días y al tercer grupo 45 días de experimentación. Cada grupo a su vez, fue dividido en cuatro subgrupos de cinco ratas cada uno. A cada subgrupo se le administró un material diferente:

- | | |
|------------------|--|
| Subgrupos | 1) Control (sin ningún tipo de administración). |
| | 2) Nitrofurazona. |
| | 3) Mezcla compuesta de petrolato puro, utilizado como vehículo dérmico y 0.2g de zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso. |
| | 4) Mezcla compuesta de petrolato puro, igualmente utilizado este como vehículo dérmico y 0.2g de zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso. |

3.1.1. Realización de la incisión.

Las ratas fueron pesadas para determinar la dosis de anestésico; ketamina y xilacina, administrada intraperitonealmente a cada una de ellas. La relación de peso de la rata con respecto al anestésico aplicado fue la siguiente: ketamina (100 mg / kg de peso) y xilacina (13 mg / kg peso).

Una vez anestesiadas las ratas, se realizó la limpieza de la parte dorsal anterior del cuerpo, empleando gasa y jabón bactericida. Se rasuró y se desinfectó la zona utilizando benzal (germicida y antiséptico). Se procedió a realizar la disección, para lo cual se trazó un cuadro, utilizando un marcador indeleble. Las dimensiones de la incisión fueron de 2 x 2cm de área y aproximadamente 2mm de profundidad, hasta la fascia muscular. Tanto la piel como la fascia muscular fueron retiradas.

Retirado el tejido (ver Figura 15), se procedió a la administración del material en cada uno de los subgrupos considerados.

Las cerámicas zeolitas enriquecidas con Zn y Ca^{2+} al 0.5% y al 1.1% en peso, se emplearon combinadas con petrolato (sustancia inerte), como vehículo dérmico, con el objeto de fijarlas al tejido dañado y evitar que fueran removidas por los movimientos de la rata.

Tanto las cerámicas como la nitrofurazona en forma de crema fueron administradas cada día sobre la herida, después de limpiarla. A los subgrupos control se les dio el mismo trato que a las otras ratas, sólo que no se colocó nada sobre la herida.



Figura 15. Muestra la forma de la herida realizada en el dorso de la rata.

Después de la cirugía, las ratas se mantuvieron en condiciones de estricta higiene y se alimentaron ad libitum empleando alimento para rata y agua.

Se realizaron observaciones clínicas diarias, llevándose el registro de cada rata.

Al inicio, a medio periodo y al término del mismo, se tomaron fotografías de la zona en estudio.

3.1.2. Estudio clínico.

Existen variables clínicas que cambian durante el periodo de cicatrización de la piel, por lo que es preciso llevar un registro diario para cada animal sobre la evolución del proceso de cicatrización durante todo el tiempo de experimentación, este registro es importante para entender el efecto del material administrado en la herida. Estas variables y criterios de su calificación se mencionan abajo. La calificación que se les asigna se hizo considerando las normas internacionales dadas por la ASTM (modificadas). (60,61)

a) Secreción de suero:

1. No
2. Poco
3. Moderada
4. Mucha

b) Presencia de infección:

1. Si
2. No

c) Formación de edema:

1. Sin edema
2. Edema muy leve (apenas perceptible)
3. Edema leve (límites de área bien definida por un levantamiento)
4. Edema moderado (límites elevados aproximadamente 1mm)
5. Edema severo (levantamiento mayor de 1mm y extendido mas allá del área de exposición)

d) Pelo:

1. Ninguno
2. Poco (respecto al resto de la piel)
3. Normal (No hay diferencia con el resto de la piel)

e) Formación de Eritema:

1. Sin eritema
2. Eritema muy leve (apenas perceptible)
3. Eritema bien definido (de color rojo pálido)
4. Eritema de moderado a severo (área bien definida y roja)
5. Eritema severo (amorado y una leve escara)

f) Cierre de la herida:

1. Segunda intención

3.1.3. *Sacrificio y toma de la muestra.*

Al final del periodo de experimentación, se sacrificó a las ratas de cada grupo con métodos éticos. Se limpió la zona en estudio con una solución de benzal concentrada, se rasuró y fotografió para observar el efecto a nivel externo producido por los materiales administrados a cada subgrupo.

Para tomar la biopsia, se cortó la periferia del cuadro marcado hasta llegar a músculo esquelético. El tejido extraído se introdujo para su fijación en una solución de buffer de fosfatos (ver apéndice, pag. 59), para su estudio histológico.

3.2. Estudio Histopatológico

Los tejidos disectados fueron fijados en un buffer de fosfatos (ver apéndice, pag. 59) a un pH de 7.4 durante siete días. Después de la fijación fueron procesados mediante la técnica histológica e incluidos en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 micras de grosor con un microtómo. Una vez realizado los cortes, se montaron en laminillas, mismas que se tiñeron empleando dos tipos de tinciones: Hematoxilina-Eosina y Tricrómica de Masson (ver apéndice)

El estudio histológico se realizó en cada una de las laminillas obtenidas de cada muestra, utilizando un microscopio óptico.

El estudio morfométrico se realizó en dos laminillas de cada muestra, teñidas con Hematoxilina-Eosina. En cada laminilla se selecciono una zona al azar, misma que fue fotografiada a un aumento de 400X, empleando un microscopio óptico y una cámara fotográfica. En cada fotografía se realizaron trazos de 10 X 10 micras, obteniéndose un total de 6 campos por cada una de las fotografías. Por cada muestra de rata se obtuvo 18 campos en total, de los cuales se hizo un conteo celular de 5 campos, siendo éstos escogidos al azar, los cuales fueron utilizados para: El análisis morfométrico que consistió en el conteo de los tipos celulares existentes en cada campo y en la determinación del grosor de la capa epidérmica y del estrato córneo.

3.3. Prueba estadística

La prueba estadística empleada fue la ANOVA, considerando una significancia de 0.05% para determinar la existencia de alguna diferencia entre las medias obtenidas de los datos de cada campo a nivel de subgrupo y a nivel de grupo. (62)

Con los resultados obtenidos del conteo celular se realizaron gráficas, mismas que permitieron llegar en parte a las conclusiones que serán dadas al final de este trabajo.

CAPITULO 4

RESULTADOS

Observaciones clínicas.

En la tabla 1, se muestra el registro de las variables evaluadas a nivel clínico, durante el tiempo de experimentación de 15 días.

Grupo de 15 días.

Se observó una secreción de suero que va de lo moderado durante 1 a 2 días para luego disminuir. Esto ocurrió para los subgrupos administrados con nitrofurazona, zeolita Ca^{2+} 0.5% y el control, la excepción fue el administrado con zeolita Ca^{2+} 1.1%, donde la secreción fue de tipo moderada pero permaneciendo por un tiempo más prolongado.

En este grupo no se observó la presencia de infección en ninguno de los subgrupos.

El grado de inflamación, o formación de edema, fue moderado para todos los subgrupos permaneciendo de 5 a 6 días, seguida de una inflamación leve y más tarde muy leve hasta finalizar el proceso, a excepción del subgrupo control donde fue moderada por más tiempo. La presencia de pelo sólo se observó en el subgrupo administrado con zeolita Ca^{2+} 0.5%, desde el 14avo día después de la cirugía.

En todos los subgrupos de este grupo se observó la presencia de costra. En la Figura 17, se observa que ha comenzado el desprendimiento de la costra desde el epitelio que se encuentra por debajo de ella. En el subgrupo control y en el administrado con nitrofurazona, la costra fue más prominente que en los administrados con zeolita.

El cierre de la herida fue más rápidamente en los subgrupos administrados con las zeolitas. ver tabla 1.

Tabla 1. Evaluación de las variables clínicas para el grupo correspondiente a los 15 días de experimentación

GRUPO DE 15 DÍAS DE EXPERIMENTACIÓN				
CARACTERÍSTICAS	SUBGRUPO CONTROL	SUBGRUPO NITRO-FURAZONA	SUBGRUPO ZEOLITA Ca^{2+} 0.5%	SUBGRUPO ZEOLITA Ca^{2+} 1.1%
Secreción de suero	Moderada del día 1 al día 2.	Moderada del día 1 al día 2.	Moderada del día 1 al día 2.	Moderada del día 1 al día 5.
Presencia de infección	No	No	No	No
Formación de edema	Moderada del día 1 al día 9.	Moderada del día 1 al día 6.	Moderada del día 1 al día 5.	Moderada del día 1 al día 5.
Presencia de pelo	No	No	Aparición al día 14	No
Formación de eritema	Costra	Costra	Costra	Costra
Cierre de la herida	Día 15	Día 15	Día 12 al día 13	Día 12 al día 13

Grupo de 30 días.

Respecto a la secreción de suero, esta fue de tipo moderada disminuyendo con el tiempo, permaneciendo moderada por más tiempo en el subgrupo al cual se le administró nitrofurazona.

No se observó la presencia de infección.

El edema en el subgrupo administrado con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% fue severo durante los tres primeros días, decreciendo posteriormente. Para los otros subgrupos, el edema fue moderado hasta el sexto día para luego decrecer. Al subgrupo administrado con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% le correspondió el menor tiempo de duración del edema, ver Tabla 2.

La presencia de pelo se observó más tempranamente en el subgrupo administrado con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso, seguido por el subgrupo correspondiente a la zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1%, mientras los subgrupos administrados con nitrofurazona y el control presentaron la presencia de pelo más tarde simultáneamente.

En el subgrupo administrado con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5%, se formó un eritema muy leve apenas perceptible en la zona de la herida, en comparación a los subgrupos restantes donde el eritema fue bien definido. El cierre de la herida se presentó más rápidamente en los subgrupos administrados con las zeolitas (ver Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación de las variables clínicas correspondientes a un tiempo de experimentación de 30 días.

GRUPO DE 30 DÍAS DE EXPERIMENTACIÓN				
CARACTERÍSTICAS	SUBGRUPO CONTROL	SUBGRUPO NITRO-FURAZONA	SUBGRUPO ZEOLITA Ca^{2+} 0.5%	SUBGRUPO ZEOLITA Ca^{2+} 1.1%
Secreción de suero	Moderada del día 1 al día 2	Moderada del día 1 al día 4	Moderada del día 1 día 2	Moderada del día 1 al día 3
Presencia de infección	No	No	No	No
Formación de edema	Moderada del día 1 al día 6	Moderada del día 1 al día 6	Moderada del día 1 al día 4	Severa al 3 y Moderada al 15
Aparición de pelo	Presencia al día 16	Presencia al día 16	Presencia al día 13	Presencia al día 15
Formación de eritema	Bien definido en la zona de cierre	Bien definido en la zona de cierre	Leve en la zona de cierre	Bien definido en la zona de cierre
Cierre de la herida	Día 15 al día 17	Día 15 al día 17	Día 12 al día 13	Día 12 al día 13



A



B



C



D

Figura 16. Se muestra el dorso de ratas al cabo de 30 días de experimentación, correspondientes a los subgrupos: A) control, B) administrado con nitrofurazona, C) administrado con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso y D) administrado con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso. Se puede observar el cierre de la herida en el dorso.

Grupo de 45 días.

La secreción de suero en todos los subgrupos fue moderada durante los primeros días para luego disminuir.

No se observó infección en ninguno de los animales.

Respecto a la formación del edema, el subgrupo administrado con nitrofurazona la presentaron desde el primer día hasta el 8avo día, los demás subgrupos presentaron un tiempo de edema similar.

La aparición del pelo fue más temprana para los subgrupos administrados con las zeolitas respecto a los otros dos subgrupos, donde fue más tardía.

En cuanto a la formación del eritema, se observan los mismos resultados obtenidos para el grupo de 30 días.

El cierre de la herida se presentó más tempranamente en los subgrupos administrados con zeolita que en los otros subgrupos.

En la tabla 3, se muestran los resultados de las variables clínicas correspondientes al grupo de 45 días.

Tabla 3. Evaluación de las variables clínicas correspondientes a un tiempo de experimentación de 45 días.

GRUPO DE 45 DÍAS DE EXPERIMENTACIÓN				
CARACTERÍSTICAS	SUBGRUPO CONTROL	SUBGRUPO NITRO-FURAZONA	SUBGRUPO ZEOLITA Ca ²⁺ 0.5%	SUBGRUPO ZEOLITA Ca ²⁺ 1.1%
Secreción de suero	Moderada del día 1 al día 2	Moderada del día 1 al día 2	Moderada del día 1 al día 2	Moderada del día 1 al día 3
Presencia de infección	No	No	No	No
Formación edema	Moderada del día 1 al día 6	Moderada del día 1 al día 8	Moderada del día 1 al día 5	Moderada del día 1 al día 5
Aparición de pelo	Presencia el día 16	Presencia el día 17	Presencia el día 14	Presencia el día 14
Formación de eritema	Bien definido en la zona de cierre	Bien definido en la zona de cierre	Leve en la zona de cierre	Bien definido en la zona de cierre
Cierre de la herida	Día 15 al día 17	Día 15 al día 17	Día 12 al día 13	Día 12 al día 13

Estudio Histológico.

Grosor de la capa epidérmica.

En la tabla 4 se muestra el grosor de la capa epidérmica de los diferentes subgrupos correspondientes a los grupos de 15, 30 y 45 días de experimentación. El grosor de la capa epidérmica entre los tres grupos de ratas fue mayor a los 15 días de experimentación en todos los subgrupos, y conforme avanzó el tiempo de cicatrización fue disminuyendo el grosor de la capa.

A los 15 días de experimentación, se observó para el subgrupo de zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1%, que el grosor de la capa epidérmica fue mayor en comparación a los otros subgrupos, siendo el subgrupo control el que tuvo el menor grosor de la capa, este comportamiento no ocurre en los subgrupos correspondientes a los grupos de 30 días y 45 días de experimentación.

El grosor de la capa epidérmica entre los subgrupos no parece tener un comportamiento definido que permita establecer cuál presentó un grosor mayor o menor de la capa en los tres grupos experimentales. Lo que sí se observó fue la disminución del grosor de la capa epidérmica conforme el proceso de cicatrización avanzó.

Al aplicar la prueba estadística ANOVA con un nivel de significancia de $F_{0.05}$, se obtuvo que había una diferencia significativa entre las medias obtenidas del grosor de la capa epidérmica entre los subgrupos de un mismo grupo, obteniendo los mismos resultados en los tres grupos. También se aplicó la prueba estadística a las medias obtenidas de cada subgrupo, pero ahora comparándola entre subgrupos de un mismo material administrado en los tres tiempos de experimentación, donde se obtuvo una diferencia significativa entre grupos.

Tabla 4. Comparación del grosor de la capa epidérmica de los grupos administrados con diferentes materiales a tres tiempos de experimentación.

GROSOR DE LA CAPA EPIDERMICA				
TIEMPO DE EXPERIMENTACIÓN	SUBGRUPO CONTROL (μ)	SUBGRUPO NITROFURAZONA (μ)	SUBGRUPO ZEOLITA Ca^{2+} 0.5% (μ)	SUBGRUPO ZEOLITA Ca^{2+} 1.1% (μ)
15 días	249.8 $\pm$ 63.1	381.2 $\pm$ 191.1	338.8 $\pm$ 79.7	448.4 $\pm$ 98.4
30 días	205.6 $\pm$ 78.9	190.2 $\pm$ 115.8	143.4 $\pm$ 30.2	173.2 $\pm$ 37.2
45 días	97.0 $\pm$ 23.2	82.0 $\pm$ 5.6	115.4 $\pm$ 25.9	138.8 $\pm$ 36.5

Grosor del estrato córneo.

En la tabla 5 se observa que todos los subgrupos presentan una tendencia a disminuir el grosor del estrato córneo con el tiempo (similar al comportamiento observado en la tabla 4). Además para los tres tiempos de experimentación los subgrupos administrados con nitrofurazona presentaron un grosor menor del estrato córneo en comparación a los otros subgrupos, y fue siempre mayor para los subgrupos administrado con la zeolita Ca^{2+} 0.5%. Al comparar las medias de los subgrupos administrados con un mismo material, aplicando la prueba estadística ANOVA con un nivel de significancia de $F_{0.05}$, se obtuvo que había diferencia estadísticamente significativa entre los subgrupos a nivel grupal, y al comparar las medias entre subgrupos de un mismo grupo, mostró que había diferencia significativa entre las medias, con la excepción en el grupo de 45 días, donde esta diferencia fue nula.

Tabla 5. Muestra la diferencia en grosor del estrato corneo a diferentes tiempos de experimentación en los distintos grupos de tratamiento.

GROSOR DEL ESTRATO CORNEO				
TIEMPO DE EXPERIMENTACIÓN	SUBGRUPO CONTROL (μ)	SUBGRUPO NITROFU-RAZONA (μ)	SUBGRUPO ZEOLITA Ca^{2+} 0.5% (μ)	SUBGRUPO ZEOLITA Ca^{2+} 1.1% (μ)
15 días	27.6 ± 7.2	27.2 ± 4.3	36.8 ± 4.8	40.4 ± 6.0
30 días	26.0 ± 4.6	19.0 ± 8.3	20.8 ± 7.0	35.2 ± 12.7
45 días	20.2 ± 9.0	16.2 ± 3.3	22.8 ± 6.8	22.4 ± 11.8

Descripción histológica.

Se puede observar en la Figura 17, la cicatrización de la piel que han tenido al cabo de 15 días las ratas de los distintos subgrupos.

A) Control

En la parte superior se observa la costra de la herida. Esta se encuentra en una fase de desprendimiento debido a la presencia del epitelio, que por debajo de la costra se está realizando la migración celular epidérmica hacia la zona de daño en el proceso epitelización. La capa epitelial en migración presenta un mayor grosor debido al aumento en la tasa de proliferación de la población de células epidérmicas que se desplazan hacia la zona de daño. Debajo de la costra donde no ha sido cubierta por epitelio, se observa gran formación de vasos sanguíneos en la zona de regeneración dérmica. En esta zona de la dermis se tiene la presencia de tejido de granulación y depósito de colágena.

A) Nitrofurazona

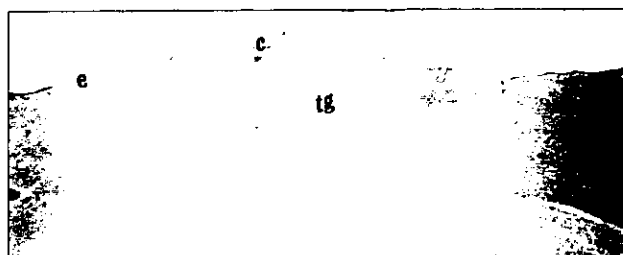
Se observa el tamaño de la costra muy prominente. Por debajo de esta costra se puede ver la migración de las células epidérmicas. Además de un grosor de la capa epidérmica mucho mayor que el grosor normal. En la zona dérmica se observa la formación del tejido de granulación y la formación de vasos sanguíneos.

C) Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso

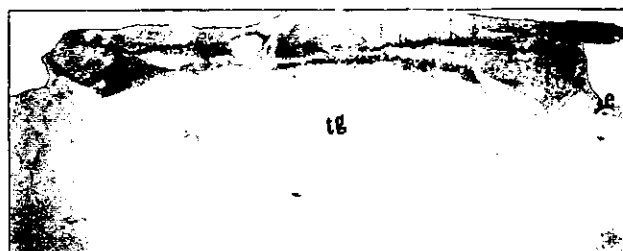
Se observan restos de costra en la parte superior. Por debajo de la costra se está llevando a cabo la migración del epitelio que es de un grosor mucho más grande de lo normal, debido a la alta tasa de proliferación de las células epiteliales. En la zona dérmica, se observa parte de tejido de granulación y síntesis de fibras de colágena.

D) Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso

En la parte superior de la fotografía se encuentra la costra, donde se observa que por debajo de ella se está llevando a cabo la migración de la epidermis. Debajo de la costra y el epitelio se observa el tejido de granulación y la formación de nuevos vasos sanguíneos, junto con la síntesis de fibras de colágena.



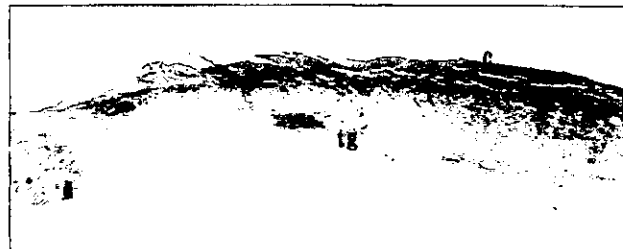
A



B



C



D

Figura 17. Fotografías tomadas a los 15 días de experimentación de piel con microscopía de luz, 32X. Los cortes en parafina fueron teñidos con Tricrómica de Masson. Se muestra el proceso de cicatrización de los cuatro subgrupos en estudio. Control (A), Nitrofurazona (B), Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso (C) y Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso (D). costra (c), epidermis (e), dermis (d), tejido de granulación (tg).

En la Figura 18, se muestran las fotografías tomadas a los 30 días de experimentación en microscopía de luz. Los cortes aquí mostrados fueron teñidos con Tricrómica de Masson..

A) Control

Se observa que ha finalizado el proceso de epitelización, ya que se encuentra la zona de la herida cubierta por células epiteliales en su totalidad. El grosor de la capa epidérmica, se encuentra disminuido en comparación a lo observado en el caso del subgrupo de 15 días.

En la dermis, se observa una zona ocupada por tejido de granulación, esta es de menor tamaño que el subgrupo de 15 días, debido a que en las orillas del tejido de granulación, se observa la regeneración de folículos pilosos y células adiposas. Además de la síntesis de fibras de colágena ha comenzado. Debajo de la dermis se observa la presencia de tejido laxo.

B) Nitrofurazona

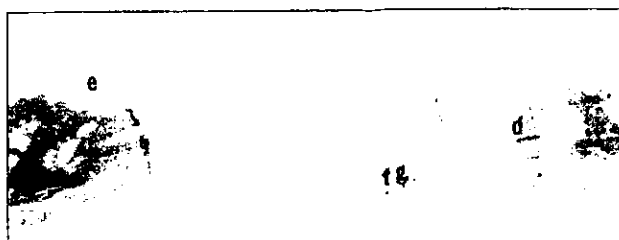
Se observa que ha finalizado el proceso de epitelización. En la parte inferior de la capa epidérmica, se observa la dermis en proceso de regeneración con la presencia de vasos sanguíneos. Del lado izquierdo de la fotografía, en la zona dérmica se localizan folículos pilosos en proceso de regeneración y más abajo de la dermis se observa la presencia de tejido laxo.

C) Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso.

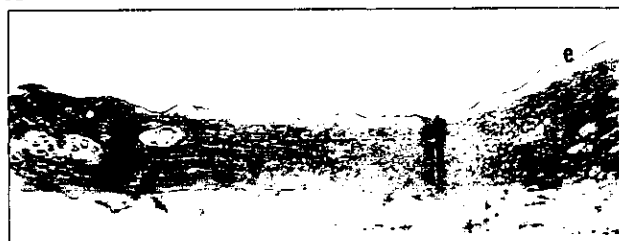
Se observa la capa epidérmica regenerada en su totalidad. El área de regeneración en la zona dérmica es de un tamaño mucho menor en comparación al subgrupo de 15 días de experimentación. En la dermis, se observa la regeneración de folículos pilosos y células adiposas.

D) Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso.

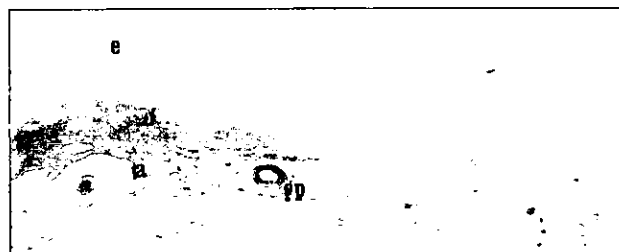
Se observa que ha finalizado el proceso de epitelización. Debajo de la capa epidérmica se observa la dermis en proceso de regeneración, donde se ve la presencia de folículos pilosos en fase de regeneración. Además de la presencia de células adiposas localizadas más abajo de la zona dérmica. En la parte inferior de la fotografía se observan fibras de tejido laxo y fibras musculares.



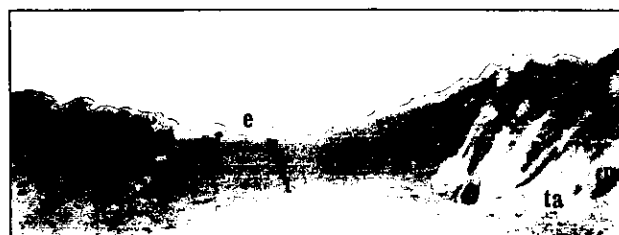
A



B



C



D

Figura 18. Fotografías tomadas a los 30 días de experimentación de piel en microscopía de luz, 32X. Los cortes en parafina fueron teñidos con la tinción de Tricrómica de Masson. Se muestra el proceso de cicatrización de los cuatro subgrupos en estudio. Control (A), Nitrofurazona (B), Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso (C) y Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso (D). epidermis (e), dermis (d), tejido de granulación (tg), folículo piloso (fp), tejido adiposo (ta) y tejido subcutáneo (ts).

En la Figura 19, se muestran fotografías tomadas al grupo de 45 días de experimentación, en microscopía de luz a 32X, de cortes teñidos con Tricrómica de Masson.

A) Control

Se observa que ha finalizado el proceso de regeneración de la herida. En la capa epidérmica, se observa una regeneración total. Debajo de la epidermis se observa la capa dérmica que se encuentra regenerada en su totalidad con la presencia de algunos apéndices como; folículos piloso con sus respectivas glándulas adiposas. Más abajo de esta capa dérmica se localiza una capa de tejido adiposo con infiltrado de fibras de colágena. Siguiendo esta capa en su parte inferior se localizan fibras de tejido laxo.

B) Nitrofurazona

En la parte superior se localiza la capa epidérmica regenerada en su totalidad. Más abajo se localiza la capa dérmica formada por fibras de tejido conectivo. Además en esta zona, se observan folículos pilosos. Debajo de la capa dérmica se localiza la capa de tejido adiposo. En la parte inferior de la capa de tejido adiposo se localizan fibras de tejido laxo y se observa la presencia de fibras musculares.

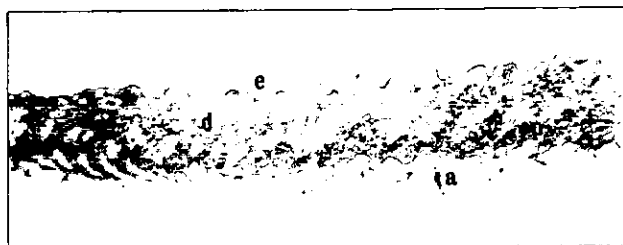
C) Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso.

En la parte mas superior se observa la capa epidérmica regenerada en su totalidad. En su parte inferior se observa la capa dérmica regenerada completamente con gran cantidad de folículos pilosos junto con glándulas sebáceas y células adiposas.

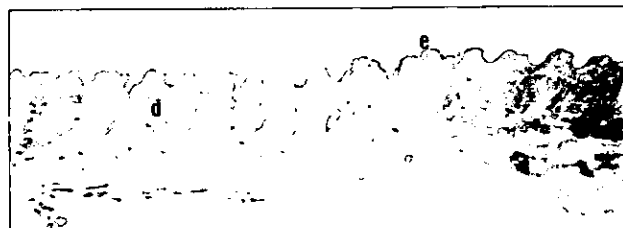
En la capa de tejido adiposo se localiza una gran cantidad de folículos pilosos de diferente tamaño. Más abajo se observan fibras de tejido laxo.

D) Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso.

Se observa la capa epidérmica en la parte superior. Más abajo se observa la capa dérmica regenerada en su totalidad, en esta capa se encuentra una gran cantidad de folículos pilosos y glándulas sebáceas. Debajo de la dermis se observa la presencia de tejido adiposo en la parte inferior de esta capa se observan fibras de tejido laxo y algunas fibras musculares.



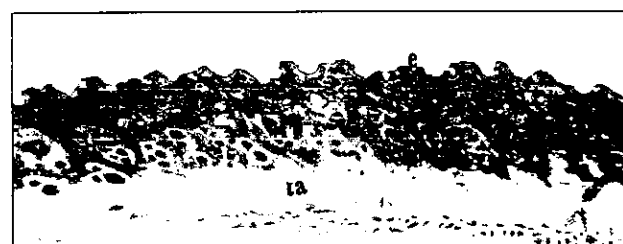
A



B



C



D

Figura 19. Fotografías tomadas a 45 días de experimentación de piel en microscopía de luz, 32X. Los cortes en parafina fueron teñidos con la tinción de Tricrómica de Masson. Se muestra el proceso de cicatrización de los cuatro subgrupos en estudio. Control (A), Nitrofurazona (B), Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso (C) y Zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso (D). epidermis (e), dermis (d), tejido de granulación (tg), folículo piloso (fp), tejido adiposo (ta) y tejido subcutáneo (ts).

Análisis morfológico.

Neutrófilos.

En la Figura 20, se muestra la densidad poblacional de los neutrófilos a 15, 30 y 45 días de experimentación. Se puede observar que la población celular presenta una tendencia a disminuir con el tiempo.

A los 15 días se observa una población más alta de neutrófilos en el subgrupo administrado con nitrofurazona, seguida de una población menor en el subgrupo administrado con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso. Este comportamiento no es visible en los grupos de 30 y 45 días, lo que hace que no haya un comportamiento definido entre los subgrupos.

Al aplicar la prueba estadística ANOVA a las medias poblacionales entre subgrupos de un mismo tratamiento en los tres tiempos con un nivel de significancia de $F_{0.05}$, se encontró una diferencia significativa entre los diferentes tiempos. Al aplicar la prueba estadística a las medias de los subgrupos entre un mismo grupo, dio como resultado una diferencia significativa para los periodos de 15 y 30 días, y no la hubo a los 45 días de cicatrización.

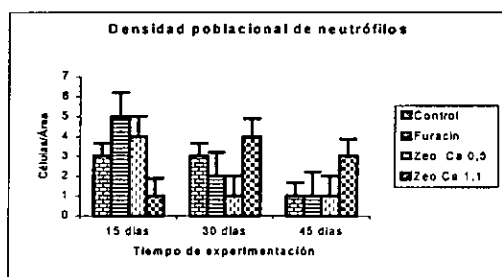


Figura 20. Se muestra la densidad de población de los neutrófilos de una herida para los diferentes subgrupos en los tres grupos.

Macrófagos.

En la Figura 21, a los 15 días de experimentación se observa en todos los subgrupos que el número de macrófagos no tiene un comportamiento definido en la población conforme avanza el tiempo de cicatrización.

La prueba estadística demostró que no hubo diferencia significativa entre las medias de los subgrupos de un mismo grupo, sucediendo lo mismo en los tres tiempos de cicatrización.

Al aplicar la prueba estadística a las medias de los subgrupos de un mismo tratamiento al compararla en sus tres tiempos de cicatrización, tampoco mostró diferencia significativa en los cuatro casos.

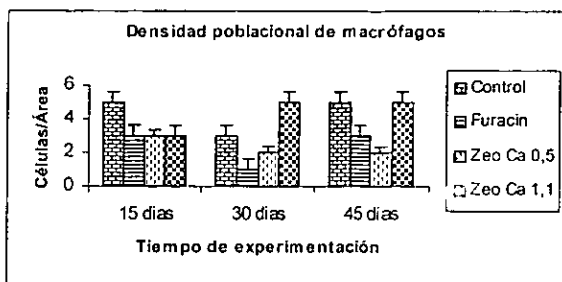


Figura 21. Se muestra la densidad de la población celular de los macrófagos en una herida de cuatro subgrupos tratados a tres tiempos de experimentación.

Fibroblastos.

En la Figura 22, se muestra el comportamiento poblacional de los fibroblastos, la cual presenta una tendencia a disminuir con el tiempo.

La prueba estadística mostró una diferencia significativa entre las medias de los subgrupos al aplicarla, comparándolas entre los subgrupos de un mismo grupo a 15 y 30 días, ocurriendo lo contrario en el grupo de 45 días. Mientras al aplicar la prueba a subgrupos administrados con un mismo material en los tres tiempos considerados, sí hubo diferencia significativa en los cuatro subgrupos.

Linfocitos.

La población de linfocitos se muestra en la figura 23. No se observa un comportamiento definido de las poblaciones celulares en los tres tiempos. Al aplicar la prueba estadística ANOVA, no se encontró una diferencia significativa de las medias entre los subgrupos de un mismo tratamiento al compararlos en los tres tiempos de 15, 30 y 45 días. Tampoco arrojó una diferencia significativa entre las medias al compararlos entre los subgrupos en un mismo grupo.

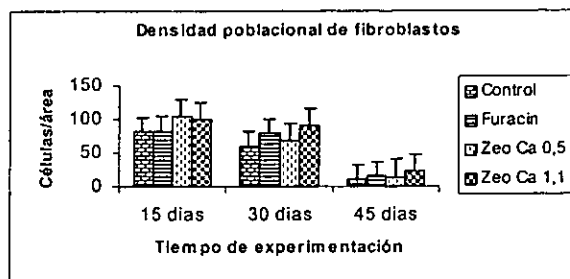


Figura 22. Se muestra la densidad de la población de los fibroblastos en la herida para los diferentes subgrupos de animales en los tres grupos de experimentación.

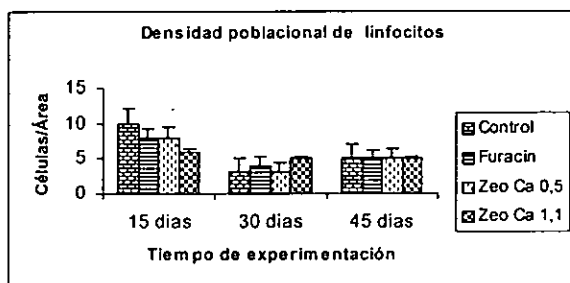


Figura 23. Se muestra la densidad de la población de los linfocitos una herida en diferentes subgrupos similares en los tres tiempos de experimentación .

CAPITULO 5.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

5.1. DISCUSIONES

En este trabajo el registro de las características evaluadas durante los tiempos de experimentación a nivel externo e interno, fue fundamental y de vital importancia para ver el efecto de los materiales administrados en las heridas de piel de rata.

Los resultados obtenidos de las observaciones realizadas a nivel externo mostraron que no hubo presencia de infección en la zona de la herida en ninguno de los subgrupos experimentales. La explicación de esto puede deberse a que el sistema inmune de la rata sea resistente contra algunos agentes patógenos, contribuyendo a reforzar esta posible explicación, se observó que el subgrupo control no mostró signos de infección; o puede deberse, a que el desarrollo de la fase experimental fue realizado bajo estrictas condiciones de higiene.

Una de las características evaluadas a nivel externo fue la aparición de pelo. Esta fue muy notoria entre los distintos subgrupos conforme la evolución del proceso de cicatrización siguió su curso. Esta aparición de pelo se presentó de forma más rápida en los subgrupos administrados con la cerámica zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso, en comparación con los otros subgrupos a los que no se les administró este material. La variación en el tiempo de aparición de pelo entre los subgrupos administrados con zeolita y los subgrupos a los que no se les administro este material, puede deberse a la forma en que se encuentran ubicados los iones calcio y zinc en la estructura de la zeolita, en especial a los iones zinc; ya que estos se encuentran entre las cavidades formadas en la estructura de la molécula, lo que hace que sean más susceptibles de que puedan ser removidos en el área de la herida por las condiciones del microambiente, como por ejemplo; el pH, la temperatura, etc, incrementando así los niveles de zinc local y sistemático y promoviendo de esta manera el crecimiento de la piel dañada y de pelo (47, 48). Además se ha reportado que el zinc desempeña un papel importante en el proceso de regeneración y diferenciación de los folículos pilosos (1), contribuyendo a que su aparición sea más rápida en los subgrupos administrados con zeolita.

El cierre de una herida es una característica vital y fundamental por parte de las células epidérmicas para que el proceso de cicatrización pueda funcionar de una manera buena y eficiente. Por lo que un cierre más rápido de la herida, es de mucha importancia para evitar posibles complicaciones o alteraciones en el proceso de cicatrización. El cierre de la herida se presento de una manera más rápida en los subgrupos que se administraron con zeolita, en comparación con los subgrupos a los que no se les administro este material. Este cierre de la herida puede deberse a los iones de calcio y zinc contenidos en la molécula de zeolita, ya que hay reportes que indican que el calcio desempeña un papel importante en la regulación de los procesos de diferenciación de los queratinocitos (43, 48). Además se sabe que con niveles adecuados de zinc, las células epiteliales y los fibroblastos migran

normalmente y se multiplican, llevándose a cabo una reepitelización y síntesis de colágena adecuada (24).

La recuperación del color de piel casi en su totalidad, se presentó en los subgrupos administrados con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso, mientras que los subgrupos administrados con nitrofurazona presentaron un color de piel regenerada más oscura, notándose claramente la diferencia en el color de piel entre la regenerada y la normal. En el caso del subgrupo control se presentaron resultados similares a los obtenidos en los subgrupos administrados con nitrofurazona. Esto nos indica que probablemente el zinc está desempeñando una función importante en la coordinación de la diferenciación celular y en la regulación de la producción del pigmento por parte de los melanocitos. Además que el calcio es precursor de varios eventos terminales asociados con la epidermis y el estrato córneo (46).

En todos los subgrupos el grosor de la capa epidérmica y del estrato córneo fue disminuyendo conforme transcurrió el tiempo de cicatrización, este resultado fue similar al reportado por Paladini et al 1996 (30), en donde observo que inicialmente la capa epidérmica cuando sufre un daño en su integridad física aumenta el grosor de la misma; esto se debe a la alta tasa de proliferación celular ocurrida en el sitio de la herida para llevar a cabo el proceso de epitelización, y conforme el proceso de cicatrización transcurre esta capa disminuye en grosor hasta establecerse en un grosor constante.

Con respecto a la secreción de suero y formación de edema se obtuvieron resultados similares en todos los subgrupos en sus tres tiempos de experimentación. Esta similitud probablemente se debió a que todos los subgrupos estuvieron sometidos a las mismas condiciones de experimentación; además de que no se presentó infección en ninguno de los subgrupos evaluados, lo que podría hacer que cambien estas características.

Los resultados histológicos indicaron que la formación de la costra fue muy prominente en los subgrupos administrados con nitrofurazona y en los que no recibieron ningún tipo de administración, mientras que en los subgrupos administrados con zeolita la costra fue de menor tamaño. Estos resultados se atribuyen al zinc, ya que este actúa en las etapas iniciales de la herida disminuyendo la fase inicial de la hemorragia (49), influyendo de esta manera en la formación de la costra de un menor tamaño en comparación con los subgrupos en los que no fue administrada la zeolita.

Los procesos de reparación y remodelación del tejido conectivo, están relacionados en gran parte con la presencia de fibroblastos en la zona de la herida. Como sabemos, los fibroblastos son los responsables de la síntesis de los componentes del tejido conectivo, específicamente colágena, glucosaminoglicanos y fibras elásticas. La síntesis de estos compuestos por parte de los fibroblastos es regulada por una variedad de procesos en los que el calcio y el zinc se encuentran involucrados. En los subgrupos administrados con zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso la reparación del tejido conectivo fue más rápida lo que hace pensar que la zeolita tiene un efecto benéfico en el proceso de cicatrización, donde los iones de zinc están cumpliendo con alguna función importante en algunas proteínas involucradas en el proceso de cicatrización. Este posible efecto puede estar a nivel de las MMPs, que son proteínas dependientes de zinc y que su participación

está dada en el proceso de remodelación del tejido conectivo (51, 52). Además existen reportes en donde se cita que sin niveles adecuados de zinc en la zona de la herida los fibroblastos pueden migrar pero no pueden llevar a cabo su multiplicación generando una síntesis de colágena inadecuada. (24)

Las poblaciones celulares de las distintas células que intervienen en el proceso de cicatrización juegan un papel importante en el proceso de cicatrización, ya que dependiendo de la densidad de la población celular, se puede dar un proceso eficiente o deficiente de cicatrización. Al realizar los estudios morfométricos se observó que la población de neutrófilos y macrófagos en los distintos subgrupos experimentales no mostraron un comportamiento definido de su población, ya que son muy pocas las células encontradas en los tres tiempos de experimentación. Debido a que estas se presentan en mayor número en los primeros estadios de las etapas de cicatrización, por lo que al evaluarlas a un tiempo más prolongado muchas de éstas células ya no se encontraron debido a que su función primordial la cumplieron durante los primeros días de la cicatrización. La presencia de estas células durante los tiempos de experimentación se debe a que posiblemente están llevando a cabo la fagocitosis de detritus celulares generados por la herida.

Para el caso de la densidad poblacional de los fibroblastos, se pudo observar un comportamiento definido de la población. Este comportamiento se observa a los 15 días donde la población de fibroblastos es muy alta y que disminuye conforme el tiempo de cicatrización transcurre. Esto concuerda con lo reportado en literatura, donde se cita, que cuando el contenido de colágena aumenta en la fase de reparación decrece el número de fibroblastos, dando comienzo al proceso de remodelación. (21, 29)

La población linfocitaria, no presentó un comportamiento definido en la población. Esto se puede deber a que la población de linfocitos presente en los tejidos es normal en los tres tiempos, ya que la población es similar en todos los subgrupos administrados.

5.2 CONCLUSIONES

De los resultados externos

- La secreción del suero producido en las heridas, en todas las ratas fue de tipo moderada durante los dos primeros días, disminuyendo esta con el tiempo.
- No hubo presencia de infección en ningún caso.
- Se observó que para los subgrupos administrados con la zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso, no hubo diferencia significativa visible en el color de piel entre la normal y la regenerada; el resto de los subgrupos experimentales sí la mostraron.
- Los resultados de este estudio, muestran que el pelo aparece tempranamente en los subgrupos administrados con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5% en peso, seguidos por los subgrupos administrados con zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 1.1% en peso, y respecto a los subgrupos control y nitrofurazona la aparición del pelo fue más retardada.
- El cierre de la herida fue siempre más rápido en los subgrupos administrados con zeolita que en los otros subgrupos.

De los resultados histopatológicos

- En todos los subgrupos hubo una tendencia a la disminución del grosor de la capa epidérmica con respecto el tiempo.
- El grosor del estrato córneo siguió los mismos patrones de disminución establecidos para la capa epidérmica.
- El comportamiento de la población celular de neutrófilos y macrófagos no fue bien definido. Por lo que no se pudo establecer diferencias en la población entre los subgrupos en los tres tiempos de experimentación.
- La población de fibroblastos en los distintos subgrupos disminuyó con el tiempo como se esperaba.
- La población de linfocitos no mostró un comportamiento definido en todos los subgrupos a sus tres tiempos de experimentación.

Por los resultados obtenidos en este trabajo, puede afirmarse que los materiales administrados no mostraron ningún efecto negativo en el organismo. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo fueron realizados utilizando como modelo a la rata wistar

En resumen la zeolita enriquecida con Zn y Ca^{2+} al 0.5 en peso, resultó ser buen reconstituyente de piel, ya que esta se regeneró más rápido que con la administración de los otros materiales, además evito la cicatriz en el área lesionada, que para fines estéticos es muy importante. Además de producir una piel sana y sin diferencia en color respecto a la normal. Así como también acelero la proliferación y el crecimiento de pelo normal sin provocar rechazo del organismo.

GLOSARIO

Badicínina. Nonapéptido vasoactivo, mediador más importante generado por el sistema de las cininas. (63)

Biopsia. Toma de una muestra de un tejido del organismo para ser analizado, así, dependiendo del órgano considerado pueden existir muchos tipos: Biopsia hepática, digestiva, de piel, tiroidea, cuello del útero etc. (63)

Células gigantes. Grandes células multinucleadas que se observan a veces en las reacciones granulomatosas; se cree que son el resultado de la fusión de macrófagos. (63)

Contracción de la herida. Es un proceso activo por el cual las heridas son cerradas durante la pérdida de tejido. (9)

Cicatrización por primera intención. La cicatrización es por primera intención en las incisiones asépticas en que es poca la cantidad de tejido destruido y los bordes pueden ser adosados perfectamente uno al otro. (9)

Cicatrización por segunda intención. es de segunda intención si resulta muy amplio el daño y por lo tanto muy extenso el espacio que separa a los bordes de la lesión, de modo que no logran adosarse uno al otro. (9)

Ciclo celular. Proceso de la división celular en el que se distinguen cuatro fases: G1, S, G2 y M. El DNA se replica durante la fase S y la célula se divide en la fase M (mitótica). (63)

Citocinas. Término genérico para designar a las moléculas solubles que median las interacciones entre las células. (63)

Diapédesis. (Del gr. *Diapedesis*, pasar a través). Paso de los glóbulos blancos a través de la membrana de los vasos. (64)

Endotelio. Células que tapizan los vasos sanguíneos y linfáticos. (63)

Epitelio. Cubierta externa de la superficie corporal o límite de la superficie interna. (7)

Factor de crecimiento. Son secreciones proteicas que actúan en células próximas de una manera paracrina o autocrina. Los factores de crecimiento tienen varios efectos que actúan no sólo como reguladores de la proliferación celular, sino también como secretores, quimioatrayentes y factores de diferenciación. Actúan todos por unión a células a través de un receptor de membrana. (63)

Fenotipo. Características expresadas en un individuo. (63)

Homeostasis. Son aquellos mecanismos de regulación que tienen todos los seres vivos para mantener constante su morfología y fisiología a pesar de los cambios ambientales. (64)

Hemostasis. Detención de la sangre. Puede efectuarse espontáneamente por la formación de un coágulo. (64)

Mitógeno. Sustancia que provoca que las células, en particular los linfocitos experimenten división. (63)

Quimiotaxis. Aumento de la migración direccional de las células, particularmente en la respuesta a gradientes de concentración de ciertos factores quimiotácticos. (63)

REFERENCIAS

- 1.- Banks, J. W. 1996. *Histología Veterinaria Aplicada*. Manual Moderno. México. 750pp.
- 2.- Morgan, R. J., Martin, L.Y. 1997. Bioengineered Skin Substitutes. *Science Medicine*. 8: 10-15.
- 3.- Weis. L., Greep. R. 1997. *Histology*. MacGraw – Hill. New York.
- 4.- Bloom, W., Fawcett, D. W. 1975. *A text book of histology*. 10 ed. WB Saunders Philadelphia. 1026pp.
- 5.- Almada, J. R. E. 1986. Evaluación del efecto cicatrizante de propóleos. *Tesis Licenciatura* (M.V.Z). Facultad de Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.
- 6.- Fuchs, E. 1990. Epidermal Differentiation: The Basic Essentials. *J. Cell Biol.* 111: 280-2814.
- 7.- Leeson, S. T., Leeson, R. C. 1985. *Histología*. Interamericana. México. 602pp.
- 8.- Roos, H. M., Romrell, J. L., Gordon, I. K. 1997. *Histología Texto y Atlas Color*. Panamericana. México, 817pp.
- 9.- Trigo, T. F. J. 1992. *Patología sistémica veterinaria*. Interamericana. McGraw Hill. México. 286pp,
- 10.- Goldfinger, L. E., Hopkinson, S.B., deHart, G. W., Collawn, S., Couchman, R., Jones, J. C.R. 1999. The $\alpha 3$ laminin subunit $\alpha 6\beta 4$ and $\alpha 3\beta 1$ integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *J. Cell Sc.* 112: 2615-2629.
- 11.- Compton, C.C., Gill, J.M., Bradfor, D.A., Regauer, S., Gallico, G.G., Oconnor's, N.E. 1989. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on fullthickness burn wound from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immuno-histochemical study. *Lab. Invest.* 60: 600 - 612.
- 12.- Ratner, B. D, Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. 1996. *An introduccion to materials in medicine*. Academic press. U.S.A. 484pp.
- 13.- Rubin, E. 1992. *Patología fundamentos*. Panamericana. México. Pp 36-49
- 14.- Chung, A. E., Durkin, M. E. 1990. Entactina structure and funtion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 3: 275-282.

- 15.- Silver, F. H. 1994. *Biomaterials medical devices and tissue engineering*. Chapman & Hall. New York. 303 pp.
- 16.- Taussing, M. J. 1980. *Processes in pathology*. Blackwell Scientific Publications. Great Britain.
- 17.- Carver, N., Navsaria, H. A., Fryer, P., Green, C. J., Leigh F.M. 1993. Restoration of basement membrane structure in pigs following keratinocyte autografting. *B.J.Plast. Surg.* 46: 384-392.
- 18.- Hunt, K. Thomas. 1980. *Cicatrización e infección de las heridas. Teoría y practica quirúrgica*. Manual Moderno. México. 301pp.
- 19.- Arnold, F. and West, C. D. 1991. Angiogenesis in wound healing. *Pharmac. Ther.* 52: 407-422.
- 20.- Clark, R. A. F., Henson, P.M. 1988. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. *Plenum Press*. New York and London. 596 pp.
- 21.- Steven, F.S., Ralph, A. H and Rhoda, S. P.1990. Small Animal Wound Management *Leo Fibiger*. Philadelphia. London. 252 pp.
- 22.- Douglas, S. 1993. *Textbook of small animal surgery*. W. B. SAUNDERS . 2 Edition, 1.
- 23.- Mustoe, A. T, Pierce, F. G., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, B. M., Devel, F. T. 1987. Accelerated healing of incisional wound in rats induced by transforming growth factor - β . *Science*. 237:1333 – 1335.
- 24.- Regan, M. C., Barbul, 1991. A. Regulation of wound healing by the T-cell dependent immune system. Wound healing. pp. 21-22. Janssen, H., Rooman, R., Robertson, J. I. S(eds). Wrightson, Petersfield.
- 25.- Hsich, P., Chen, L.B. 1983. Behaviour of cell seeded on isolated fibronectin matrices. *J Cell Biol.* 96: 1208-1215.
- 26.- Sporn, M. B., Roberts, A.B. 1992. Transforming growth factor - β recent progress and new challenges. *J. Cell. Biol.* 119: 429 – 440.
- 27.- Broadley, K. N., Aquilino, A. M., Woodward, S.C., Buckley – Sturrock, A., Sato, Y., Rifkin, D. B. 1989. Monospecific antibodies implicate bFGF in normal wound repair. *Lab. Inv.* 5: 571-575.

- 28.- Pierce, G. F., Mustoe, T. A., Lingelbach, J., Masakowski, V. R., Griffin, G. L., Senior, R. M. 1989. Platelet – derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanism. *J Cell Biol.* 109: 429 – 440.
- 29.- Grinnell, F., Billingham, R.E., Burgess, L. 1981. Distribution of fibronectin during wound healing. *In vivo. J. Inv Dermatol.* 76: 181 – 189.
- 30.- Paladini, D. I, Takahashi, K., Bravo, S. N. and Coulomb. A. P. 1996. Onset of Reepithelialization after Skin Injury Correlates with a reorganization of keratin filaments in wound Edge Keratin 16. *J. Cell Biology.* 132: 381-397.
- 31.- Silver, F.H and Parson, J. R. 1991. *Repair of skin cartilage and bone. applications of materials Facial plastic surgery cells.* (Eds A.I Glasgoid and F.H and Silver.) CRC Press, Boca Ratón Fl.
- 32.- Yurchenco, P. D, Schittny, J. C. 1990. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4: 1577 - 1590.
- 33.- Beck, K., Hunter, J., Engel, J. 1990. Structure and function of laminin: anatomy of multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4: 148 - 160.
- 34.- Seghezzi, G., Patel, S., Ren J. C., Gualandre, A., Pintucci, G., Rubbins, S. E., Shapiro, R. L., Aubrey, C. G., Rifkin, B. D., Mignatti, P. 1998. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) Expression in the endothelial cell of forming capillaries: An autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J. Cell Biol.* 141: 1659-1673.
- 35.- Albelda, S. M, Smith, C. W, Ward, P. A. 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8: 504-512.
- 36.- Muller, H. K. 1981. Mechanisms of clearing injured tissue. Ed en: *Handbook of inflammation. Tissue repair and regeneration* (L.E.Glynn, J.C.Houck, G. Weissmann editores) Elsevier/North-Holland. New York. 145 pp.
- 37.- Riches, W. H. 1988. *The multiple roles of macrophages in wound healing* ed en: *The molecular and cellular biology of wound repair* (R.A.F. Clark y P.M. Henson editores) Plenum New York. 3. 233 pp.
- 38.- Juhaz, I., Murphy, F. G., Yan, H., Herlyn, M., Albelda, M. S, 1993. Regulation of extracellular matrix proteins and integrin cell substratum adhesion receptors on epithelium during cutaneous human wound healing in vivo. *Am J. Pathol.* 143:1458 – 1469.
- 39.- Mcpherson, J. M. Piez, K.A. 1988. *Collagen in dermal wound repair* ed en: *The molecular and cellular biology of wound repair* (R.AF. Clark y P.M. Henson editores). Plenum press. N.Y. 491 pp.

- 40.- Kane, C. J., Hebda, P. A., Mansbridge, J. N., Hana, Walt D. C. 1991. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor β 1 expression during cutaneous wound healing. *J. Cell physiol.* **148**: 157-173.
- 41.- Antoniadis, H. N., Galanopoulos, T., Neville – Golden, J., Kiritsy, C.P., Lynch, S.E 1991. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cell and PDGF mRNA in connective tissue fibroblast. *Proc Natl. Acad Sci. U.S.A.* **88**: 565-569.
- 42.- DeBoer, W. I., Schuller, A.G., Vermey, M., Vander, Kwast, T.H. 1994. Expression of growth factor and receptors during specific phases in regeneration urothelium after acute injury in vivo. *Am. J. Pathol.* **145**: 1199-1207.
- 43.- Vicanova, J, Boelsma, E., Mommaas, M. A., Kempenaar. A. J., Forslind, B., Pallon, J., Egelrud, T., Koerten, K. H, Ponee, M. 1998. Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J. Invest. Dermatol.* **111**: 97 –113.
- 44.- Egljo, K. Hennings, H., Clausen, O. P. F. 1986. Altered growth kinetics proceed calcium – induced differentiation in mouse epidermal cells. *In vitro.* **22**: 332- 336.
- 45.- Dale, B. A., Resing, K. A., Presland, R. B. 1994. Keratohyalin granule proteins. Leigh, I. M., Lane, E. B., Watt, F. M (Eds). *The keratinocyte Handbook*, Cambridge University Press, Cambridge. 323-350 pp.
- 46.- Lundstrom, A., Egelrud, 1990. T. Cell shedding from human plantar skin in vitro: evidence that two different types of protein structures are degraded by a chymotrypsin like enzyme. *Arch dermatol Res.* **282**: 234-237.
- 47.- Lansdown, A. B. G. 1996. Zinc in the healing wound. *The Lancet.* **347**: 706-707.
- 48.- Valle, B.L, Falchuk, K.H. 1993. The biochemical basic of zinc physiology. *Physiol Rev.* **73**: 79-118.
- 49.- Anders, H. 1996. Extracellular zinc ions induces mitogen - activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin - sensitive swiss 3T3 fibroblast. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **328**: 233-238
- 50.- McLaren, S. 1991. Nutrition and Wound Healing. *J wound Care.* **29**

- 51.- Lovejov, B., Cleasby, A., Hasell, M. A., Longley K., Luther, A. M., Weigl, D., McGeehan, G., McElroy, A. B., Drewry, D., Hambert, M H., Jordan, S. R. 1994. Structure of the catalytic domain of fibroblast collagenase complexed with an inhibitor. *Science* 263: 375-377.
- 52.- Agren, M.S., Franzen, L., Chapvil, M. 1993. Effects on wound healing of zinc oxide in a hydrocolloid dressing. *J. Am. Acad. Dermatol.* 29: 221-227.
- 53.- González, G., Piña C., Jacas, A., Hernández, M, H., Leyva A. 1998. Synthesis and characterization of ZnAPO-34 molecular sieve with CHA structure type. *Microporous and Mesoporous Materials.* 25: 103-108.
- 54.- Bosch, P., Schifter. I. (1988). *La zeolita una piedra que hierve*. F.C.E. México. 82pp.
- 55.- Buddy, D. R and Allan, S. H., Frederick, J. Schoen, J. E. L. 1996. *Biomaterials science. An introduction to Materials in Medicine*. Academic Presss. USA. 484pp.
- 56.- Larry, L. Hench. 1991. Bioceramics. From concep to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (7): 1487-1510.
- 57.- Tejeda, C. A. 1999. Zeolitas ALPO enriquecidas con Zn y Ca obtención y caracterización. *Tesis de licenciatura*. Facultad de ciencias. UNAM..
- 58.- Carranza, R. . 1984. *Vademécum Académico de Medicamentos*, UNAM, México, Tomo II. 932 pp.
- 59.- Katzung, B. 1994. *Farmacología Básica y Clínica*. Manual Moderno, México. 1235p
- 60.- ASTM F 719, 1991. Practice for Testing Biomaterials in Rabbits for primary skin irritation, American society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM, Philadelphia, U.S.A. 13.10.
- 61.- ASTM I 720, 1991. Practice for Testing Guinea Pigs for contact Allergens: Guinea Pig Maximization test, American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM Philadelphia, U.S.A. 13.01.
- 62.- Wayne, W. D. 1996. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Limusa. 877pp.
- 63.- Roitt, M. I., Brostoff, J., David, K. M. 1991. *Inmunología*. Salvat Editores. México 250 pp.
- 64.- Dabout, E. 1977. *Diccionario de medicina*. Epoca. México. 839pp.

APÉNDICE

Técnicas histológicas empleadas

La finalidad de la coloración es destacar el contraste natural y hacer más patentes varias células, componentes tisulares y material extrínseco. (7)

Hematoxilina – Eosina (H y E)

Esta técnica de tinción le da una coloración característica a algunos componentes celulares como por ejemplo: la estructura del núcleo toma un color azul intenso o púrpura, y prácticamente todas las estructuras citoplásmicas y sustancias intercelulares toman color rosado (7). Esta técnica consiste en pasar las muestras por:

1. Xilol.....6 minutos
2. Alcohol 100%.....2 minutos
3. Alcohol 96%.....2 minutos
4. Alcohol 80%.....2 minutos
5. Alcohol 60%.....2 minutos
6. Agua destilada.....Enjuague
7. Hematoxilina de Harris.....5 minutos
8. Agua destilada.....3 enjuagues
9. Eosina.....2 minutos
10. Agua destilada.....3 enjuagues
11. Alcohol 96%.....3 enjuagues
12. Alcohol 100%.....3 enjuagues
13. Xilol.....2 enjuagues
14. Xilol.....2 enjuagues
15. Montar con bálsamo de Canadá

Tricrómica de Masson

Este tipo de tinción es un método tricrómico en donde las fibras de tejido conectivo se tiñen de verde, los núcleos de azul o púrpura, y las estructuras citoplásmicas de rojo. (7)

1. Desparafinar en xilol6 minutos
2. Alcohol 100%.....3 minutos
3. Alcohol 96%.....3 minutos
4. Alcohol 70%.....3 minutos
5. Alcohol 50%.....3 minutos
6. Agua destilada.....Enjuague 3 minutos
7. Sumergir en alumbre férrico acuoso al 5%...30 minutos a 50 C
8. Hematoxilina.....30 minutos a 50 C
9. Agua destilada.....Enjuague
10. Ácido pícrico.....40 minutos
11. Agua destilada.....30 minutos
12. Fucsina ácida.....60 minutos
13. Agua destilada.....Enjuague

14. Ácido fosfomolibdico.....	5 minutos
15. Azul de anilina.....	2 minutos
16. Agua destilada.....	Enjuague
17. Ácido acético.....	2 minutos
18. Alcohol 70%.....	5 minutos
19. Alcohol 96%.....	5 minutos
20. Alcohol 100%.....	5 minutos
21. Alcohol 100% - xilol.....	5 minutos
22. Xilol.....	5 minutos
23. Montar con bálsamo de Canadá	

Buffer de fosfatos

La principal finalidad de la fijación es conservar el protoplasma con el menor grado de alteración en relación con la célula viva. Los líquidos fijadores actúan como conservadores, inhiben los cambios autolíticos y el crecimiento bacteriano. (7)

Este tipo de buffer es utilizado especialmente para la fijación de piel.

Fosfato de Sodio Monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)....4.6g

Fosfato de sodio dibásico. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)....6.5g

Agua Destilada900ml

Formol al 37 %100ml

pH7.4