



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CICATRIZACION DE HERIDAS EN PIEL DE RATAS EMPLEANDO ZEOLITA (ENRIQUECIDA CON ZINC Y CALCIO) Y CAMPOS MAGNETICOS PULSANTES.

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 :

MARIA ISABEL ARENAS REYES



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARIA CRISTINA RISA BARBA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

280289



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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:

"Cicatrización de heridas en piel de ratas empleando Zeolita
(enriquecida con zinc y calcio) y campos magnéticos pulsantes".

realizado por María Isabel Arenas Reyes.

con número de cuenta 9455654-0, 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. Patricia Rivas Manzano.

Propietario

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz.

Suplente

M. en C. Claudia Karina Torres Villaseñor.

Suplente

Biol. Alfonso José Vilchis Pelayera.

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz,
Coordinador de Licenciatura.



**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA**

A mis padres

Gaudencio Arenas C.

Lilia Reyes M.

Con cariño respeto y amor.

A mis hermanos

*Por estar siempre a mi lado y por
brindarme su confianza y apoyo.*

A Miguel

*Por todo su amor y
apoyo incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento especial a la Dra. María Cristina Piña Barba por su ayuda para la realización de esta tesis, por su paciencia y modo de ser.

A la Dra. Patricia Rivas Manzano, a la Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz, a la M. en C. Claudia K. Torres Villaseñor y al Biol. Alfonso J. Vilchis Peluyera; por sus valiosos comentarios que permitieron enriquecer este trabajo.

A todos aquellos que contribuyeron de alguna manera y apoyaron la realización de este trabajo y mi formación profesional.

A la Coordinación de Programas de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL).

Al Instituto de Investigaciones en Materiales, al Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y al Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, por las instalaciones prestadas para la realización de este trabajo.

A mis amigos por su paciencia y apoyo.

ÍNDICE

Resumen	1
----------------------	---

Capítulo I Introducción

1.1 Piel	2
1.1.1 Epidermis.....	2
1.1.2 Dermis.....	5
1.2 Cicatrización.....	7
1.2.1 Inflamación.....	8
1.2.2 Proliferación.....	9
1.2.3 Formación y remodelación de la matriz	13
1.2.4 Tipos de cicatrización	15
1.2.5 Funciones del zinc y el calcio en la cicatrización de heridas	17
1.2.6 Factores que influyen en la cicatrización.....	18
1.3 Biomateriales.....	18
1.3.1 Definición de biomaterial.....	18
1.3.2 Zeolita como un biomaterial.....	19
1.3.3 Definición de zeolita.....	19
1.3.4 Aplicaciones de las zeolitas.....	20
1.4 Campos magnéticos.....	21
1.4.1 Polos magnéticos.....	21
1.4.2 Corriente eléctrica y campo magnético.....	21
1.4.3 Definición de campo magnético constante y pulsante.....	23
1.4.4 Aplicaciones clínicas de campos magnéticos.....	23
Hipótesis y Objetivos	25

Capítulo II Material y Método

2.1 Animales de experimentación.....	27
2.2 Cirugía.....	27
2.3 Tratamiento de los animales.....	27
2.4 Estudio clínico	29
2.5 Procesamiento histológico del tejido cicatrizal.....	29
2.6 Estudio histológico.....	30
2.7 Análisis estadístico	30

Capítulo III Resultados

A los 15 días de tratamiento.....	31
A los 30 días de tratamiento.....	33
A los 45 días de tratamiento.....	36

Capítulo IV Discusión y Conclusiones

Discusión.....	40
Conclusiones.....	43

<i>Apéndice</i>	44
-----------------------	----

<i>Bibliografía</i>	45
---------------------------	----

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es describir la morfología externa e histología de la piel en la cicatrización de heridas empleando campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5 % en peso con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss y sin tratamiento (control).

Se trabajó con 45 ratas cepa Wistar a las cuales se les realizó una herida en la parte dorsal anterior de 3X3 cm a nivel de fascia muscular, se dividieron en tres grupos de estudio, el primer grupo fue expuesto diariamente durante 30 minutos a campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, el segundo grupo se le aplicó sobre la herida una mezcla de petrolato puro con zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5 % en peso, y el tercer grupo no recibió ningún tratamiento (control).

El proceso de cicatrización de las heridas a nivel histológico fue evaluado cualitativamente a 15, 30 y 45 días de experimentación después de realizada la herida, en los cortes teñidos con la técnica de Tricrómica de Gallego. El estudio clínico también se evaluó durante los tres tiempos de experimentación establecidos (15, 30 y 45 días de tratamiento).

Los resultados obtenidos nos muestran que la aplicación diaria de zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5 % en peso, en presencia de campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, ayudan a que el proceso de cicatrización de heridas de piel sea más rápido en días hasta en un 21% en comparación con el grupo control que no recibió ningún tratamiento. El estudio histológico de las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, mostró presencia de folículos pilosos y glándulas sebáceas en mayor cantidad en comparación con el grupo control y con el grupo que sólo recibió campos magnéticos. Además se observó una más rápida reepitelización y un buen reacomodo de las fibras de colágena en el grupo tratado con campos magnéticos más zeolita que en los otros grupos, en los que el reacomodo fue de una manera más heterogénea y la reepitelización siempre fue más lenta.

Capítulo I

INTRODUCCION

1.1 PIEL

La piel es el órgano sensitivo más extenso del cuerpo, percibe la recepción de estímulos táctiles, térmicos y dolorosos. Cubre la superficie del cuerpo y protege al organismo de daños provenientes del exterior. Proporciona una barrera a la invasión por microorganismos patógenos, ayuda a regular la temperatura corporal, por el sudor excreta agua, grasa y varios productos de desecho del catabolismo. Se divide en dos regiones distintas anatómicamente; epidermis y dermis [1,2,3,4].

1.1.1 Epidermis

La epidermis se deriva del ectodermo y está compuesta por epitelio estratificado plano queratinizado. El grosor de la epidermis varía dependiendo de su localización, es mayor en la palma de las manos (0.8mm) y la planta de los pies (1.4mm) donde se aplican cargas mecánicas grandes, y es más delgada en el resto del cuerpo donde tiene un espesor de 0.07 a 0.12 mm. El tipo celular más abundante en la epidermis son los queratinocitos. Se compone de cinco estratos (Fig.1), del más interno al más externo son: el estrato germinativo, el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido y el estrato córneo [1,2,3,4].

a) *Estrato germinativo*, está formado por una sola capa de células cuboidales o cilíndricas, son las únicas células de la epidermis con capacidad de multiplicarse, contienen citoplasma basofílico y un gran núcleo. Hay muchos desmosomas en los compartimentos laterales que unen a las células del estrato basal entre sí y con las células del estrato espinoso. Los hemidesmosomas localizados a nivel basal unen a las células contra la membrana basal. Las células resultantes de la mitosis tienen un movimiento ascendente durante el cual sintetizan y almacenan la queratina. El estrato germinativo, descansa sobre un tejido membranoso al que generalmente se denomina membrana basal.

b) *Estrato espinoso*, es el estrato más grueso de la epidermis, esta compuesto por células poliédricas a aplanadas. Los queratinocitos localizados a nivel basal en el estrato espinoso también son mitóticamente activos como los del estrato basal, ambos estratos se encargan en conjunto del cambio de los queratinocitos epidérmicos. El estrato granuloso contiene más haces de filamentos

intermedios (tonofilamentos) que el estrato basal. En las células del estrato espinoso estos haces se proyectan de manera radial hacia el exterior desde la región perinuclear hasta llegar a proyecciones celulares altamente interdigitadas, pero unen a las células adyacentes entre sí por medio de desmosomas. Estas proyecciones ofrecen a las células de este estrato un aspecto de "células espinosas" y de ahí su nombre. Conforme los queratinocitos pasan hacia arriba por el estrato espinoso, siguen produciendo tonofilamentos, que se agrupan en haces denominados tonofibrillas, que hacen que el citoplasma se vuelva eosinofílico.

c) *Estrato granuloso*, esta formado por tres a cinco capas de células aplanadas, su citoplasma contiene grandes gránulos de queratohialina basofílicos, ásperos y de forma irregular, que no están fijos a la membrana. Los filamentos de queratina se asocian a estos gránulos, y algunos de estos filamentos pasan a través de ellos. Estos filamentos se consideran precursores de la queratina localizada en las células del estrato córneo.

d) *Estrato lúcido*, este estrato se encuentra sólo en la piel gruesa, consta de una o varias capas de células anucleadas, las cuales contienen filamentos de queratina densamente empaquetados orientados en sentido paralelo con la superficie de la piel y eleidina, producto de transformación de la queratohialina.

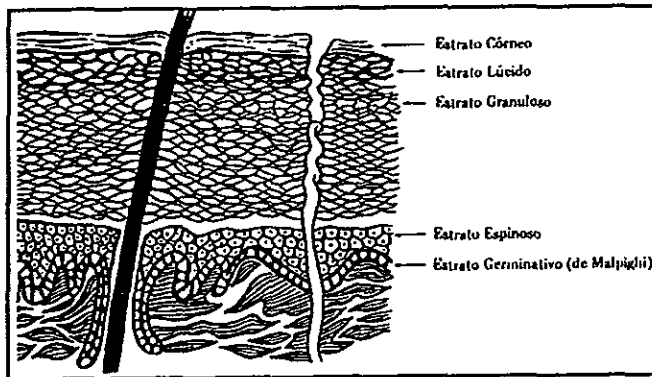


Fig. 1 Estratos de la epidermis [5].

e) *Estrato córneo*, es la capa más externa de la piel, esta formada por células muertas, que se aplanan progresivamente y se fusionan. No hay núcleos y el citoplasma está substituido por queratina que proviene principalmente de las tonofibrillas de las capas profundas de la epidermis. Las capas más superficiales del estrato córneo son placas cornificadas planas que se descaman constantemente.

Las poblaciones celulares que se encuentran en la epidermis incluyen queratinocitos, células de Merkel, células de Langerhans (llamadas en ocasiones células dendríticas) y melanocitos. En la Tabla 1 se muestra la función de cada una de ellas, las cuales están involucradas en la producción de proteínas, transmisiones sensoriales, protección contra daños por radiación y reacciones inmunológicas [2,4].

Los queratinocitos forman la población de mayor tamaño y están distribuidos en los cinco estratos de la piel, como se están descamando continuamente desde la superficie de la epidermis, es necesario renovar continuamente esta población de células. Los queratinocitos situados en la capa basal de la epidermis efectúan lo anterior mediante actividad mitótica. Experimentan mitosis durante la noche y, en tanto se están formando nuevas células, las que quedan por arriba se ven impulsadas hacia la superficie y pasan desde una capa hacia la siguiente hasta que llegan a la última, proceso que requiere de 20 a 30 días. En su camino, las células van a aumentando de tamaño y se diferencian más, y empiezan a acumular filamentos de queratina en su citoplasma. Por último, al aproximarse hacia la superficie las células mueren y acaban por descamarse. Por lo anterior, se advierte que la organización estructural de la epidermis en estratos, refleja etapas de fenómenos vivos dinámicos de proliferación y diferenciación celular.

Las células de Merkel están intercaladas entre los queratinocitos del estrato basal de la epidermis, abundan de manera especial en la punta de los dedos de la manos. Aunque suelen encontrarse como células únicas orientadas en sentido paralelo con la lámina basal, pueden extender sus prolongaciones entre los queratinocitos, a los cuales se encuentran unidos por desmosomas. Hay nervios sensitivos amielínicos que atraviesan la lámina basal y que se aproximan hacia las células de Merkel, con las que forman complejos de células de Merkel y axones. Es posible que estos complejos funcionen como mecanorreceptores.

Las células de Langerhans, llamadas en ocasiones células dendríticas por sus numerosas prolongaciones largas, se encuentran distribuidas por toda la epidermis, pero se localizan primordialmente en el estrato espinoso. Estas

células funcionan en la reacción inmunológica. Tienen receptores para Fc (anticuerpo) y C3 (complemento), y fagocitan y desintegran a los antígenos extraños. Las células de Langerhans emigran hacia los ganglios linfáticos más cercanos, en los cuales presentan epítopes de los antígenos extraños sometidos a procesamiento a los linfocitos T; por tanto, son células presentadoras de antígeno.

Los melanocitos producen melanina, pigmento pardo que da diversas tonalidades de este color a la piel. La tirosinasa, enzima que poseen los melanocitos, es esencial para la síntesis de melanina. Se encuentra localizada en organitos especiales, conocidos como melanosomas, situados dentro del citoplasma de los melanocitos. El número de melanocitos de la piel varía, en las diferentes regiones del cuerpo. La diferencia en la pigmentación de la piel se relaciona más con la localización de la melanina que con el número total de melanocitos en la piel, que es casi el mismo en todas las razas. En los sujetos de raza blanca los melanosomas son más pequeños y más escasos, y se congregan en la vecindad del núcleo, en tanto que en los individuos de raza negra los melanocitos son grandes, más numerosos y están dispersos por todo el citoplasma de los queratinocitos.

Tabla 1. Células que se encuentran en la epidermis.

Tipo de Célula	Función
Queratinocitos	Producen queratina.
Células de Merkel	Involucrados en procesos sensoriales.
Células de Langerhans, llamadas en ocasiones células dendríticas	Participan en la reacción inmunológica, fagocitando y desintegrando antígenos extraños.
Melanocitos	Producen melanina y protegen contra daños por radiación.

Elaboración propia.

1.1.2 Dermis

La dermis o corión, se deriva del mesodermo y está compuesta de tejido conectivo denso irregular (Fig. 2). Se divide en dos capas: la capa papilar, la cual está en contacto directo con la epidermis; y la capa reticular la cual se encuentra debajo de la capa papilar. El espesor de la dermis varía entre 0.6 mm en los párpados y 3mm aproximadamente en las palmas de las manos y las plantas de los pies [1,3,4].

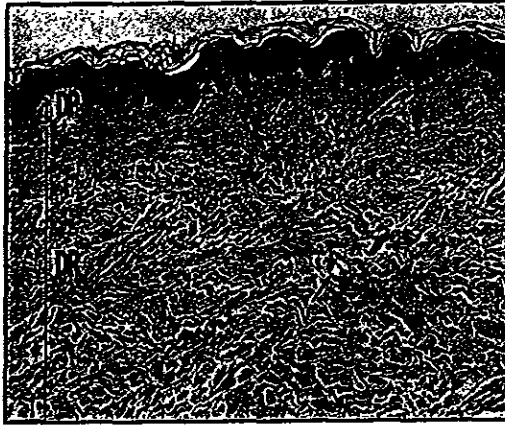


Fig. 2 Corte perpendicular de la dermis, se advierten las dos capas que la conforman; la dermis papilar (DP) y la dermis reticular (DR), se observa también un vaso sanguíneo (v). Hematoxilina - Eosina 60X. [6].

a) *La capa papilar* está compuesta de tejido conectivo laxo, incluye surcos y papilas que sobresalen de la epidermis. Las papilas suelen aparecer en doble hilera y con frecuencia están ramificadas. En esta capa se encuentran abundantes fibroblastos, macrófagos y otros tipos celulares, finas fibras de colágena tipo I y III; aunque cabe destacar que la más abundante es la colágena tipo III (fibras reticulares). Además, también se encuentran fibras de oxilátán, las cuales son similares en composición a las fibras elásticas que se encuentran en esta capa. Las fibras de colágena y las fibras elásticas no son tan gruesas como las de la capa reticular. La capa papilar contiene muchas asas capilares que se extienden hacia la interfase entre la epidermis y la dermis. Estos capilares regulan la temperatura corporal y nutren a las células de la epidermis, que es avascular. Además contiene prolongaciones nerviosas; algunas de las cuales finalizan en la dermis y otras perforan la lamina basal y penetran en el compartimento epitelial. Las asas capilares y las terminaciones nerviosas sensoriales están muy concentradas por lo que son visibles en las papilas dérmicas.

b) *La capa reticular* está compuesta de tejido colagenoso denso irregular, contiene haces agregados de fibras de colágena tipo I y de fibras elásticas de mayor diámetro que las encontradas en la capa papilar. Estas fibras no tienen una orientación aleatoria, sino que forman líneas regulares de tensión en la piel, denominadas líneas de Langer. Los intersticios de la capa reticular están

lentos de proteoglucanos, ricos en dermatánulfato. Las células son más escasas en esta capa que en la capa papilar. Consisten en fibroblastos, mastocitos, linfocitos, macrófagos y, a menudo, células grasas en las partes más profundas de la capa reticular.

A diferentes niveles de la dermis, hay folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas, que son derivados epidérmicos que penetran profundamente en la dermis. Los nervios, vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas son abundantes también en esta capa de la piel [4].

Por debajo de la dermis hay un estrato de tejido conjuntivo laxo, la fascia superficial o hipodermis, que en muchas especies está transformado en tejido adiposo subcutáneo, el cual tiene un papel importante en el metabolismo de la grasa. No es parte de la piel y aparece como extensión profunda de la dermis [2].

La dermis y la epidermis están conectadas por colágena tipo VII y fibras de oxilátán [7].

La piel está sujeta a diferentes heridas o alteraciones de su integridad anatómica. Se describe a continuación el proceso de cicatrización de heridas por segunda intención (cuando el daño es muy amplio y por tanto muy extenso el espacio que separa los bordes de la lesión de modo que no logran adosarse uno al otro).

1.2 CICATRIZACION

La cicatrización es una secuencia de eventos que se desencadenan como respuesta a un daño o lesión tisular y que comprende factores humorales y respuestas celulares que llevan a la reparación del tejido lesionado. Estos eventos pueden verse alterados por la presencia de cuerpos extraños, por infecciones o por problemas vasculares [8].

El proceso de cicatrización, se conoce desde hace tiempo y consiste en una secuencia cronológica de eventos caracterizada por infiltrados celulares que aparecen en las inmediaciones de la herida. Dicho proceso es continuo y se ha dividido en tres fases consecutivas y superpuestas: a) Inflamación (temprana y tardía) b) Proliferación y c) Formación y remodelación de la matriz (Fig. 3). Los fenómenos que se observan en la reparación de la piel en todo su espesor requieren contribuciones epidérmicas, dérmicas e hipodérmicas [8,9,10].

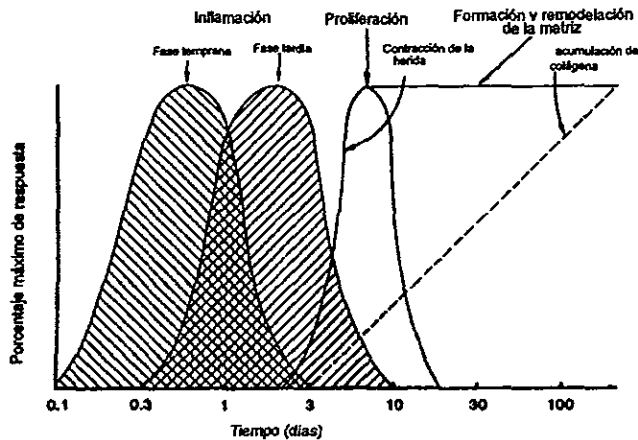


Fig. 3 Fases de la reparación de heridas. Se muestran las tres fases en que se ha dividido la cicatrización de heridas. (1) Inflamación (temprana y tardía), (2) Proliferación y (3) Formación y remodelación de la matriz. Las fases están sobrelapadas una con otra y están graficadas a lo largo del eje de las abscisas como una función logarítmica del tiempo. La inflamación está dividida en fase temprana y tardía caracterizada por una acumulación rica en neutrófilos e infiltrados de células mononucleares respectivamente. La contracción de la herida se da de forma paralela con la proliferación. La acumulación de colágena empieza poco tiempo después de que inicia la proliferación, continuando durante la formación y remodelación de la matriz [8].

1.2.1 Inflamación

a) *Inflamación temprana:* Como resultado del rompimiento de los vasos sanguíneos hay extravasación de constituyentes de la sangre y agregación plaquetaria, coagulación de la sangre y generación de bradicidina y anafilotoxinas derivadas del complemento. Las plaquetas activadas no solamente se agregan y desencadenan la coagulación de la sangre, sino también liberan sustancias biológicamente activas, incluyendo la formación de moléculas que promueven la migración y crecimiento celular dentro del sitio de la herida y factores de crecimiento que actúan a nivel local de la herida. Los neutrófilos son los primeros leucocitos observados en el área de inflamación y daño. Estos liberan enzimas y prostaglandinas de la serie E_2 , las enzimas atacan a los desechos extracelulares y facilitan la ruptura del material necrótico. La principal función de los neutrófilos, durante la fase *inflamatoria temprana del tejido dañado*, es librar el sitio de bacterias. Los monocitos aparecen poco tiempo después y a medida que van llegando a la herida se van transformando en macrófagos, los cuales siguen aumentando en número, mientras que los neutrófilos disminuyen, lo cual nos permite hacer una división arbitraria entre la fase inflamatoria temprana y la tardía. A la llegada de estas células al sitio de la herida se le denomina infiltrado celular, y como se mencionó anteriormente, son de vital importancia para

llevar a cabo el proceso de cicatrización por las funciones que llevan a cabo [8].

b) *Inflamación tardía*: tanto los macrófagos como los neutrófilos fagocitan y digieren organismos patógenos, limpian el tejido (detritus del tejido) incluyendo neutrófilos degenerados. Además los macrófagos liberan una plétora de sustancias biológicamente activas. Muchas de estas sustancias facilitan el establecimiento de células inflamatorias adicionales y ayudan al macrófago en la descontaminación del tejido. También son liberados los factores de crecimiento y otras sustancias que son necesarias para la iniciación y propagación del tejido de granulación, el cual consiste de una densa población de macrófagos, fibroblastos y neovasculatura embebida en una matriz de colágena, fibronectina y ácido hialurónico [8]. Los macrófagos también atraen a los fibroblastos hacia la herida e influyen en su maduración. Así, el macrófago juega un papel pivote en la transición entre la inflamación y la segunda fase de la reparación de la herida [8].

1.2.2 Proliferación

Esta fase de la reparación de heridas se caracteriza por la formación del tejido de granulación con la migración y proliferación de fibroblastos, la regeneración de una barrera epitelial, neovascularización y la producción y depósito de moléculas de la matriz extracelular, particularmente colágena [11].

Migración y proliferación de fibroblastos. Los fibroblastos se originan a partir de células mesenquimatosas indiferenciadas presentes en el tejido conectivo adyacente (tejido subcutáneo y grasa) [12]. Aproximadamente después de 72 horas de la lesión se empiezan a infiltrar fibroblastos en el sitio de la herida [11], en respuesta al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la matriz provisional rica en fibrina y fibronectina, la cual guía esta migración celular. Así esta matriz rica en fibronectina funciona como un base para la migración celular [13]. Los fibroblastos comienzan a secretar proteínas, polisacáridos y varias glucoproteínas que constituyen la sustancia amorfa del piso de la matriz, que sirve para el depósito de colágena. Los fibroblastos comienzan a secretar colágena al cuarto o quinto día. En los estadios iniciales, las moléculas de tropocolágena son expulsadas hacia el espacio extracelular y se agregan para formar fibrillas de colágena joven, cerca de los fibroblastos. El continuo enlace de éstas resulta en las fibras de colágena (Fig. 4). Estas últimas son pequeñas al principio, pero se van agrandando gradualmente hasta producir un tejido denso de colágena que une los bordes del tejido dañado. A medida que aumenta el contenido de colágena de la herida, decrece la cantidad de glucoproteínas y mucopolisacáridos, así como también el número de fibroblastos. Con la

reducción del número de fibroblastos con función de síntesis, decrece la síntesis total de colágena.

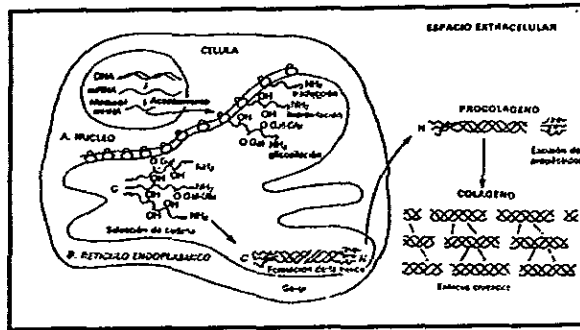


Fig. 4 Fases de la síntesis de colágena [14].

Además de producir la matriz extracelular, el fibroblasto está involucrado en el proceso de contracción de la herida. La matriz formada por los fibroblastos del tejido conectivo provee un sustrato sobre el cual macrófagos, nuevos vasos sanguíneos y los mismos fibroblastos pueden migrar dentro de la herida.

Formación del tejido de granulación. El tejido de granulación (Fig. 5) consiste de una densa población de macrófagos, fibroblastos y neovascularización embebida en una matriz de colágena, fibronectina y ácido hialurónico [8]. La fibronectina juega un papel en la adhesión celular y puede estar involucrada en la remodelación de la matriz [11]. El tejido de granulación aparece tres o cuatro días después de haber ocurrido la herida. Su nombre se debe al aspecto que presenta, ya que se observa un tejido granular rojo brillante como resultado de la proliferación de los ovillos capilares o "nodillos" originados desde los capilares seccionados en la herida. En las heridas pequeñas este tejido se encuentra por debajo de la costra [12].

El tejido de granulación es importante en la curación de las heridas abiertas, ya que es extremadamente resistente a las infecciones por la gran cantidad de células presentes en este. Provee una superficie sobre la cual el epitelio es capaz de migrar, juega un papel en la contracción de la herida y contiene fibroblastos que producen colágena [8].

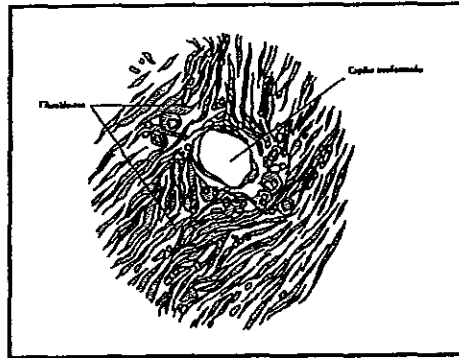


Fig. 5 Corte transversal de tejido de granulación. Se observa en el centro un capilar neoformado rodeado de fibroblastos [5].

Neovascularización. La cicatrización de heridas no puede llevarse a cabo sin la neovascularización o proceso angiogénico, el cual implica la formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes (Fig. 6). Dos o tres días después de haber sido lesionado el tejido, aparecen las primeras yemas capilares que se van desarrollando inmediatamente por detrás del avance de los fibroblastos. Cada ovillo capilar del tejido de granulación a medida que avanza el tiempo se va diferenciando de manera progresiva en arteriolas, capilares y vénulas. De la misma forma aunque con un poco más de lentitud, se van desarrollando los vasos linfáticos. La formación de una nueva vasculatura provee a la zona de la herida de oxígeno y nutrientes necesarios para continuar el crecimiento del nuevo tejido [9].

Aproximadamente después del sexto día de evolución de la reparación, los vasos de neoformación tienden a disminuir de calibre y a desaparecer [15].

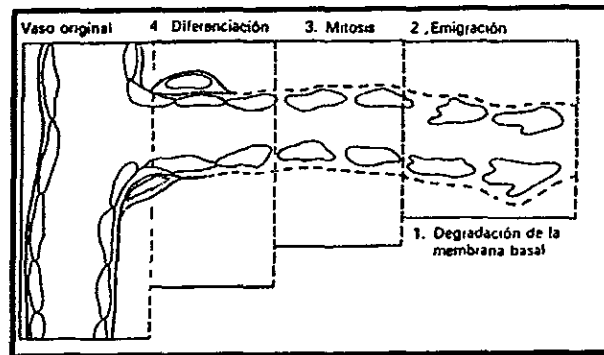


Fig. 6 Pasos de la angiogénesis. A la izquierda está el vaso original. 1) Degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular. 2) Emigración del endotelio. 3) Proliferación endotelial (mitosis). 4) Organización y maduración [14].

Contracción de la herida. La contracción de una herida es su reducción en tamaño como resultado del movimiento centripeto de todo el espesor de la piel adyacente a la misma. El tejido de granulación tracciona los márgenes cutáneos hacia el centro, de forma tal que el área a cubrir por epitelización se reduce. Durante este proceso no se forma piel, sino que aquélla que rodea a la herida se acerca hacia el centro del defecto. En aquellas áreas donde la piel se encuentra laxamente unida a las estructuras subyacentes, la contracción de la herida puede conducir a su cierre completo dejando cicatrices cuya forma varía.

Dentro del tejido de granulación los fibroblastos toman características de músculo liso, incluyendo la capacidad contráctil. Su contracción es la responsable del acortamiento de la herida y el proceso se detiene cuando uno de los lados de ésta contacta con el lado opuesto, ó cuando el tejido de granulación carece de miofibroblastos sanos.

Epitelización. La epitelización puede ocurrir tan rápidamente como sea posible para restablecer la integridad del tejido. Se produce de forma independiente de la contracción de la herida; comienza después de minutos u horas con la movilización de las células basales de la epidermis del borde de la lesión. Las células se desprenden de su firme inserción a la dermis subyacente, se agrandan, se aplanan y movilizan hacia la profundidad y al exterior del borde de la herida (Fig. 7). Estas células epiteliales migran hacia el defecto a través del tejido de granulación desarrollado para reemplazar al déficit celular

epitelial. Al principio el proceso de epitelización es rápido, pero a medida que la cobertura celular se va alejando del borde de la herida y tiende al monoestrato, el proceso se hace más lento. Si hay una costra, el epitelio en migración se mueve por debajo de ella hasta contactar con el lecho de tejido de granulación subyacente. Estas células epiteliales producen una colagenasa que disuelve la base de la costra de forma tal que ésta se pueda desprender [14]. Si la membrana basal es destruida por el daño o degradación enzimática subsecuente, las células epiteliales migran sobre la matriz provisional [8]. Subsecuentemente las mismas células epiteliales secretan fibronectina y colágena tipo V y finalmente laminina y colágena tipo IV, la cual constituye la nueva membrana basal.

1.2.3 Formación y remodelación de la matriz

La tercera fase de la reparación de heridas es la formación y remodelación de la matriz extracelular. La formación de la matriz comienza simultáneamente con la proliferación como se muestra en la Figura 3. Durante esta extensa fase la colágena es producida y remodelada; la cicatriz madura es formada y hay una neovascularización regresiva. La fibronectina es removida en pocas semanas; el ácido hialurónico es reemplazado principalmente por heparán sulfato en la membrana basal, y dermatán sulfato y sulfato de condroitín en el intersticio. Existe un balance entre la formación de colágena y su destrucción por colagenasas tisulares [11] que eliminan fibras no funcionales y preservan aquellas con orientación funcional. Con el tiempo la fuerza tensil de la herida aumenta, esto se debe a un aumento del entrelazamiento de fibras de colágena a nivel intra e intermolecular y a los cambios de ordenamiento físico de las fibras. Las fibras de colágena bien orientadas aumentan en espesor y densidad, y tienden a agruparse en bandas. La unión entre las bandas de colágena de la dermis del borde de la herida y la colágena recién formada se van haciendo cada vez más difícil de distinguir a medida que éstas se van entremezclando. Aunque la resistencia aumenta con el tiempo, el tejido de la cicatriz permanece de un 15 a un 20 % más débil que el tejido adyacente [12].

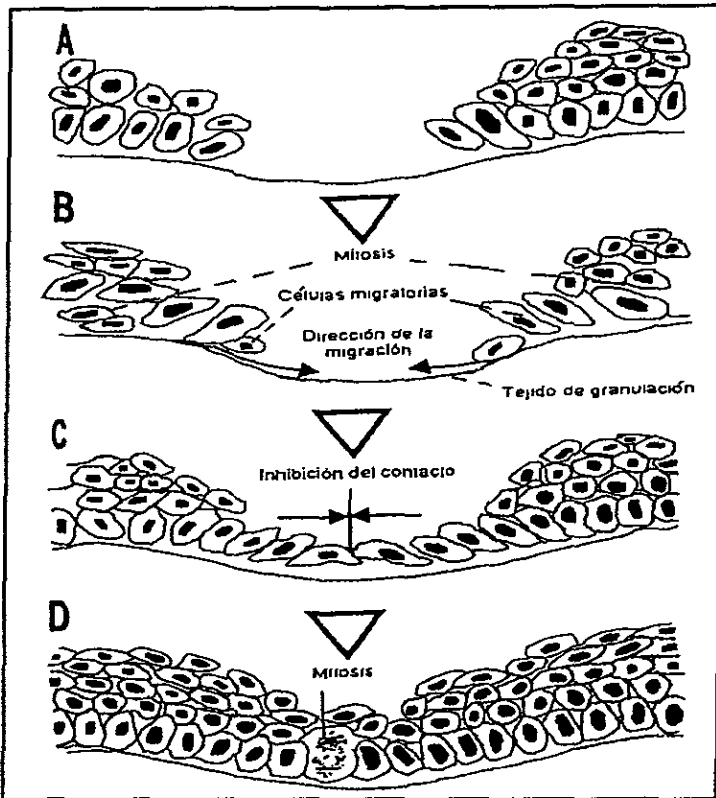


Fig. 7 Epitelización de una herida abierta. (A) Las células epidérmicas basales del borde de la herida se aflojan de su inserción en la dermis. (B) Las células epidérmicas del borde de la herida se extienden hacia la profundidad y exterior del borde cutáneo, sobre la dermis. (C) La migración de las células epiteliales se detiene por medio de la inhibición por contacto. (D) Las células epiteliales proliferan y se diferencian [12].

1.2.4 Tipos de cicatrización

En heridas cutáneas se reconocen dos tipos de cicatrización; de primera y de segunda intención que se diferencian esencialmente en cuanto a la cantidad de tejido dañado, intensidad del proceso de reparación y, por tanto, en el tiempo en el que éste se lleve a cabo.

Cicatrización por primera intención: La cicatrización es de 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 (Fig. 8).

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

Las heridas triangulares, rectangulares y cuadradas curan en dirección centripeta, permaneciendo las esquinas estacionarias y los lados movilizándose hacia el centro. Como resultado se obtiene una cicatriz estrellada en tres puntas, una con dos "V" con sus vértices enfrentándose y unidas por una línea recta delgada y una estrellada de cuatro puntas [12].

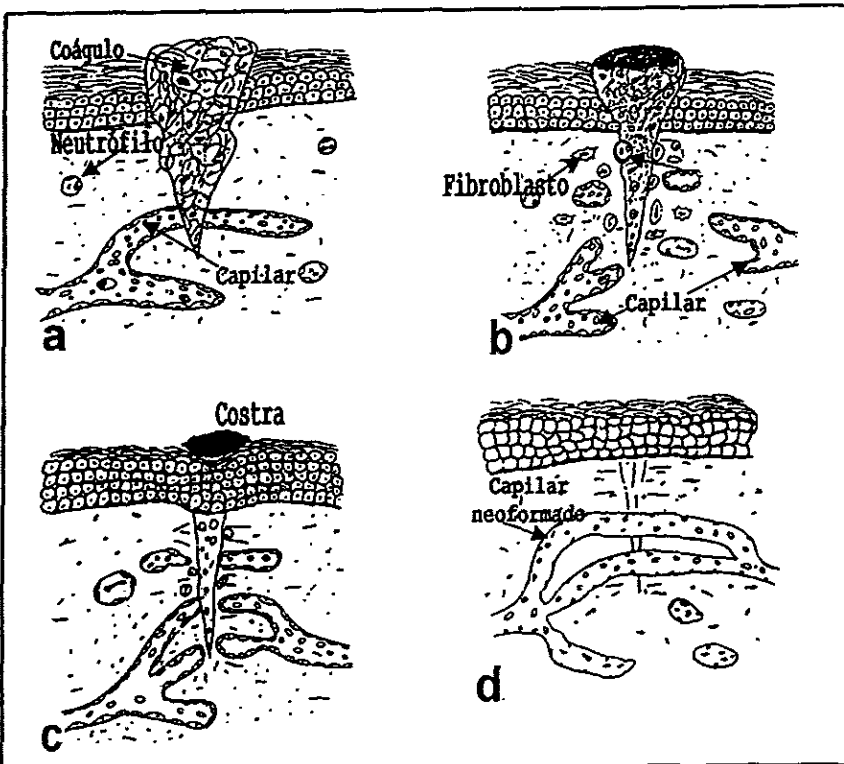


Fig. 8 Cicatrización de primera intención. (a) La lesión traumática es mínima y con bordes regulares. (b) Se genera una respuesta inflamatoria discreta. (c) Formación de escaso tejido de granulación. (d) La cicatrización es excelente con poco tejido conectivo residual [15].

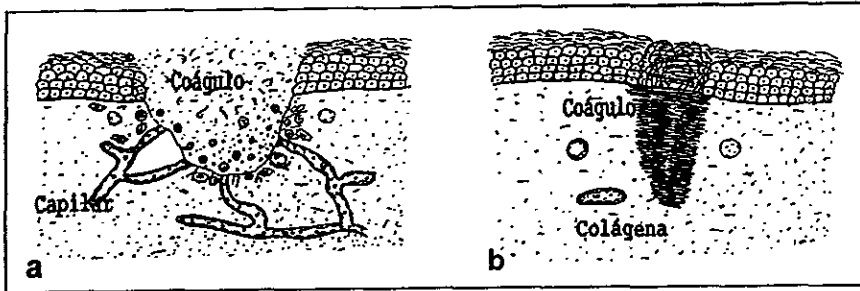


Fig. 9 Cicatrización de segunda intención. a, herida más extensa, aunada a contaminación bacteriana y necrosis. b, el proceso de cicatrización es mucho más extenso [15].

1.2.5 Funciones del zinc y el calcio en la cicatrización de heridas

Zinc. El zinc estimula la cicatrización de heridas y ayuda a una mejor queratinización epidermal; participa en muchos eventos fisiológicos dermales y epidermales que son dependientes de zinc. Como la gran mayoría de los elementos traza, el zinc es incorporado dentro de una variedad de metaloenzimas. Hay más de 70 enzimas descritas en la fisiología humana y animal en donde el zinc participa como parte integral de la enzima o como cofactor para la actividad enzimática. Algunas de las metaloenzimas incluyen las que están involucradas en las síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y metabolismo de lípidos. Se ha observado que sin niveles adecuados de zinc las células epiteliales y fibroblastos pueden migrar normalmente pero no pueden multiplicarse; por lo tanto la epitelización no puede ocurrir y la síntesis de DNA y colágena es inadecuada [16]. Otras evidencias circunstanciales que evidencian que el zinc está involucrado en la fisiología epidermal incluyen:

- 1.- Alta concentración de zinc en la piel; la cual es mayor en la epidermis que en la dermis.
- 2.- Presencia de alopecia y dermatitis cuando hay deficiencias de zinc tanto en humanos como en animales
- 3.- Paraqueratosis; una característica histológica de la dermatitis cuando hay deficiencia de zinc.

Calcio. Se han realizado pocos estudios sobre los efectos del calcio en el crecimiento celular epitelial [17]. Sin embargo, se sabe que el ion calcio está involucrado en la fisiología de la diferenciación celular y descamación [18], ya que se ha observado que los queratinocitos de ratón cuando se cultivan en un medio que contiene 0.05mM de calcio crecen en una monocapa, debido a que

el ensamblaje de los desmosomas se inhibe y, cuando el medio contiene una concentración más elevada de calcio (1.2mM) los desmosomas se forman y las células se estratifican. Después de 3 a 7 días adicionales en cultivo las células se *cornifican*; estos datos indican que al menos algunos rasgos de diferenciación pueden ser inducidos por el calcio *in vitro* [19].

El calcio actúa en el estado tardío de la fase S del ciclo celular, justo antes de la síntesis de DNA y es necesario para ciertos rasgos de diferenciación *terminal*, por ejemplo; para la formación de desmosomas, estratificación, adhesión celular y activación de transglutaminasas en queratinocitos humanos [19]. El calcio puede ser el que desencadene varios eventos terminales asociados con la cornificación y es requerido para la activación de varios sistemas enzimáticos, por ejemplo; la fosfolipasa A, involucrada en la disolución de gránulos de queratohialina [18].

1.2.6 Factores que influyen en la cicatrización

El proceso de cicatrización se puede retardar por factores tan diversos como la presencia de bacterias en la herida, por nutrición inadecuada, por un estado patológico coexistente y por factores fisiológicos [5].

1.3 BIOMATERIALES

Dentro del área de la Física Médica existe una rama muy importante, la de los biomateriales; cuya aplicación principal se encuentra en el área médica.

1.3.1 Definición de biomaterial

En la segunda guerra mundial se presentó la necesidad de utilizar materiales para ayudar a soldados y civiles que habían perdido un miembro o un tejido en forma parcial o total; recientemente, para sustituir partes del cuerpo o promover la cicatrización de un órgano o tejido, se utilizan materiales que cumplen con las propiedades adecuadas para permanecer en el organismo sin afectarlo, conocidos como biomateriales, los cuales pasan por pruebas determinadas que la comunidad científica internacional ha designado. Hasta ahora no se han puesto de acuerdo los científicos de todo el mundo en la definición de un biomaterial, sin embargo, una de ellas es que es un material producido por el hombre, que puede usarse en dispositivos médicos con la intención de interactuar con sistemas biológicos. Su objetivo principal es reemplazar y/o restaurar tejidos u órganos vivos y sus funciones, o parte de ellas. Para cumplir tal propósito, el material debe de ser biocompatible, es decir, debe de ser aceptado por el organismo y no causar ningún tipo de

rechazo ni respuesta inmunitaria durante el tiempo que esté implantado en el organismo, y debe de ser biofuncional, es decir; llevar a cabo una o más funciones del tejido u órgano al que está supliendo [20].

1.3.2 Zeolita como un biomaterial

Los biomateriales pueden ser metálicos, cerámicos, polímeros y materiales compuestos. Las cerámicas usadas como biomateriales son llamadas biocerámicas; dentro de estas se encuentran las zeolitas AIPO, que son cerámicas bioactivas; es decir, que inducen una actividad biológica específica. Se han logrado sintetizar zeolitas con unidades tetraédricas de PO_4 . Entre estas se encuentra la zeolita AIPO tipo chabazita (CHA) [21], la cual presenta las siguientes características:

Chabazita

Fórmula química $CaAl_2Si_4O_{12} \cdot 6H_2O$ (Alumino silicato de calcio hidratado)

Clase: silicatos

Características físicas:

Color: Blanco

Transparencia: de transparentes a translúcidas

Dureza: de 4 a 5

Sistema cristalográfico: trigonal

Peso específico: aproximadamente de 2 a 2.2 (muy ligero)

1.3.3 Definición de zeolita

El término zeolita fue utilizado inicialmente para designar a una familia de minerales naturales que presentaban como propiedades particulares el intercambio de iones y la absorción reversible de agua. Esta última propiedad dio origen al nombre genérico de zeolita, el cual deriva de dos palabras griegas, *zeo*; que ebulle y *lithos*; piedra. Hoy en día, dicho término engloba a un gran número de minerales naturales y sintéticos, que constan de un esqueleto cristalino formado por la combinación tridimensional de tetraedros TO_4 ($T = Si, Al, B, Ga, Fe, P, Co, \dots$), unidos entre sí a través de átomos de oxígeno. La estructura contiene canales y cavidades que son ocupados por cationes y moléculas de agua los cuales son removidos continuamente. En particular la zeolita que se utilizó en este trabajo tiene una estructura como la que se muestra en la Figura 10. Su unidad estructural básica es un tetraedro [22] formado por cuatro átomos de oxígeno y un átomo central T, que generalmente es Si o P.

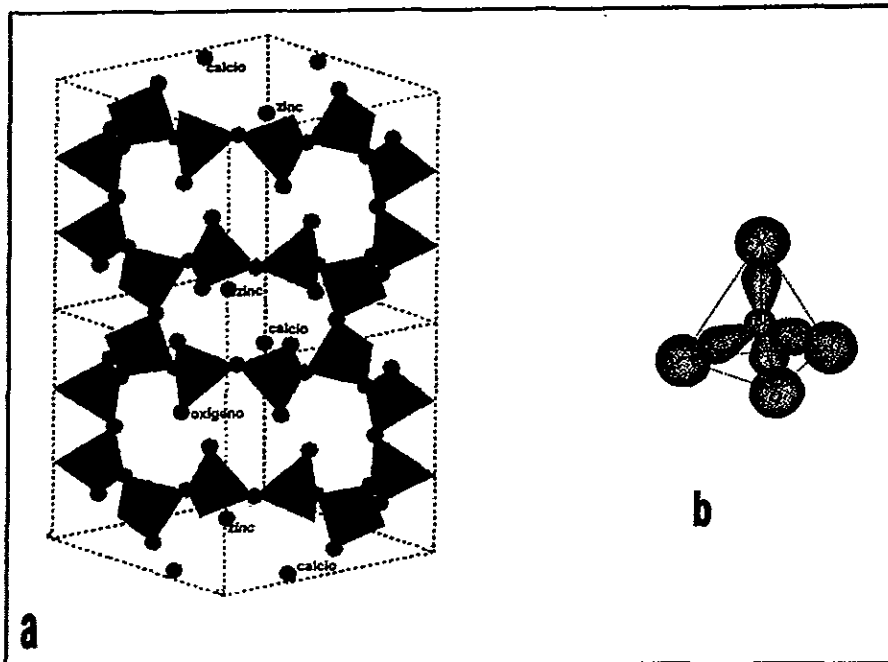


Fig. 10 Estructura de la zeolita AIPO tipo CHA (a) y su unidad estructural básica formada por un tetraedro (B) [22].

1.3.4 Aplicaciones de las zeolitas

Entre sus aplicaciones está la de ser tamices moleculares, su capacidad de adsorción depende del volumen poroso y del diámetro de los poros, lo que permite que sean utilizadas como adsorbentes tanto en procesos de purificación como de separación. También son usadas como intercambiadores iónicos para disminuir la dureza de aguas domésticas e industriales y para la purificación de aguas, además se han utilizado como catalizadores [23]. En el campo médico cabe mencionar que se ha aplicado zeolita natural en heridas de piel de rata, en donde se observó un cierre rápido de la herida. También se ha aplicado zeolita AIPO tipo CHA sintética enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso a heridas de piel de rata, en donde se obtuvieron resultados benéficos, ya que ésta evitó la formación de una cicatriz en el área lesionada, además de que no se presentó diferencia de color en la cicatriz respecto a una piel normal, también aceleró la proliferación y el crecimiento de pelo en el área lesionada y no provocó rechazo al organismo [24].

1.4 CAMPOS MAGNETICOS

1.4.1 Polos magnéticos

Todo imán posee un polo norte y un polo sur, los cuales se localizan a lo largo de todo el imán. Estos, llamados polos magnéticos, dan origen a la existencia de un campo magnético que se forma a su alrededor, cuyas líneas de fuerza, indican hacia donde se ve atraído un polo en su presencia. Si se aproxima el polo norte de un imán al polo norte de otro imán, los imanes se repelen, lo mismo ocurre si se aproximan dos polos sur. Pero si se aproximan dos polos opuestos, estos se atraen. La intensidad de la interacción entre ellos es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que los separa [25].

El campo magnético que rodea a un imán abarca todo el espacio. La forma del campo magnético se revela a través de las llamadas líneas de campo (Fig. 11a), que en número son proporcionales a la intensidad del campo. Los campos magnéticos ejercen fuerzas que son más intensas cuanto mayor es el número de líneas de fuerza que contienen. A diferencia de lo que sucede con las cargas eléctricas, una característica muy importante de los polos magnéticos es que estos nunca están aislados, lo que implica que las líneas de campo magnético siempre son líneas cerradas.

1.4.2 Corriente eléctrica y campo magnético

Una carga eléctrica en movimiento produce un campo magnético, por lo que una corriente eléctrica, es decir, muchas cargas en movimiento, también producen un campo magnético. Si se forma una espira con un alambre que lleva corriente eléctrica, las líneas de campo magnético se apiñan en el interior de la espira (Fig. 11b). Si se hace otra espira y se superpone a la primera obtenemos una concentración de las líneas de campo magnético del doble que en el caso de una sola espira. En una bobina (espiras de hilo conductor) el campo magnético de cada una de las espiras se suma formando el campo magnético total de la bobina, proporcional a N , donde N es el número de espiras consideradas, dando como resultado una gran concentración de líneas de fuerza, rectas en el interior de la bobina, que se curvan a la salida de ésta formando un arco más o menos grande dependiendo de la corriente que pase por ellas [26]. Por esto, en el interior de la bobina la densidad del flujo magnético es mucho mayor que fuera de ella. Además, cuando la bobina es suficientemente grande (del orden de centímetros) puede garantizarse que el campo magnético en la parte interior central de la bobina es homogéneo y se puede aprovechar para diferentes aplicaciones.

La unidad para la densidad del flujo magnético es el gauss o el tesla (T), donde:

$$1T = 10^4 \text{ gauss (G)}$$

Un tesla equivale a que una partícula cargada sienta fuerza de 1 Newton por cada Ampere de corriente en cada metro recorrido. $T = N/Am$.

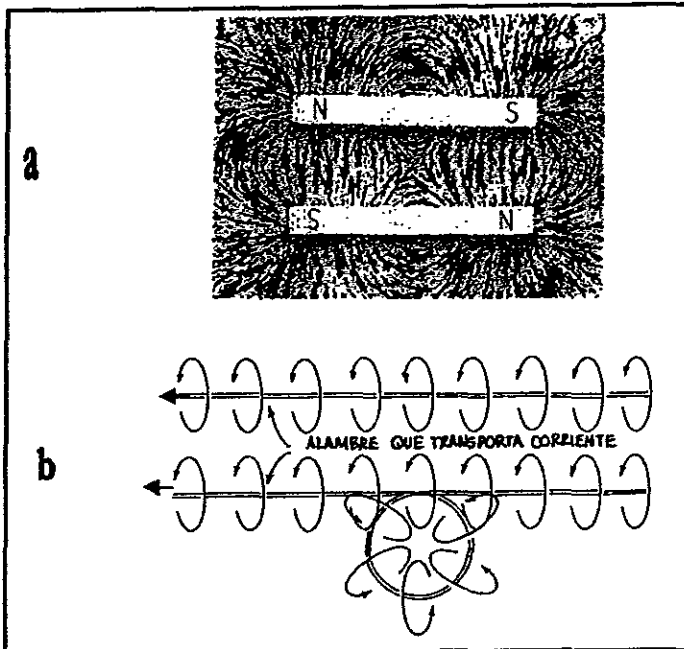


Fig. 11 (a) Patrones de campo magnético de dos imanes cuando los polos opuestos están uno frente al otro.(b) Las líneas de campo magnético que rodean un alambre que transporta corriente se apiñan cuando el alambre forma una espira [25].

Los materiales en general puede dividirse en tres categorías de acuerdo con su comportamiento dentro de un campo magnético: ferromagnéticos, paramagnéticos y diamagnéticos. Los ferromagnéticos son los que se alinean fácilmente con un campo magnético externo; los paramagnéticos son aquéllos que tienden

a alinearse sólo con campos muy grandes mientras que los diamagnéticos no se alinean con los campos magnéticos.

1.4.3 Definición de campo magnético constante y campo pulsante

Cuando se tiene una bobina por la que pasa una corriente eléctrica constante, el campo magnético producido por la misma será constante; mientras que si por la bobina pasa una corriente eléctrica pulsante, el campo magnético producido será pulsante, es decir, cambiará su orientación tantas veces como la corriente eléctrica lo haga. Esto puede verse de la Figura 11b, ya que si cambia de dirección la corriente el campo magnético rodeará al alambre en sentido contrario.

1.4.4 Aplicaciones clínicas de campos magnéticos

Se han realizado numerosos estudios sobre la cicatrización de heridas tanto teóricos como experimentales; entre éstos se encuentran las aplicaciones de campos magnéticos, los cuales se han utilizado en la regeneración de tejido suave y en la proliferación celular en donde se han obtenido resultados benéficos en cuanto al tiempo de cicatrización [27]. Además los campos magnéticos pulsantes de frecuencia extremadamente baja < 1000 Hz (ELF < 1000 Hz), se han utilizado para promover la cicatrización de fracturas de hueso. Hay un gran número de artículos que reportan resultados benéficos [28,29,30,31,32,33,34,35]. Sin embargo, se conoce poco sobre los campos magnéticos pulsantes en la regeneración de tejido suave y en la proliferación celular. Se ha demostrado que los campos magnéticos pulsantes aumentan la síntesis de DNA en cultivos de fibroblastos humanos [29], en cultivos de condroblastos se ha observado que aumentan la síntesis de colágena y en fracturas de hueso aceleran la tasa de reparación ósea [31,33,34].

En úlceras crónicas de piel se ha demostrado que cuando estas se someten a campos electromagnéticos por un periodo de tres meses, aumentan la angiogénesis, la síntesis de colágena y la producción de glucosaminoglucanos [30]. En heridas abiertas aumentan la epitelización [35] y disminuyen el tiempo de cicatrización [32]. Hay reportes que demuestran que no hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la fuerza tensil de la herida, es decir la fuerza requerida para la separación de los bordes de la herida [36].

Por otra parte se han realizado estudios epidemiológicos que sugieren que la exposición a campos magnéticos incrementa la incidencia de algunos cánceres

[37], otros estudios han demostrado que estos no tienen efectos genotóxicos [38,39], ya que se ha reportado que no inician cáncer, sino que pueden promover el cáncer que ha sido iniciado por otras causas [40].

En otros trabajos se ha observado que los campos electromagnéticos pulsantes tienen un mejor efecto en la cicatrización de piel que los campos electromagnéticos constantes [32].

Se cree que los campos magnéticos pueden alterar la producción de algunos radicales libres que influyen en varios procesos biológicos [37].

Se ha observado que cuando una célula está dañada debido a una quemadura, corte, contusión o abrasión quirúrgica se produce una despolarización de la célula, dando como resultado una disminución del ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (ARN) y del bombeo de sodio [41]. En eritrocitos humanos se ha demostrado que cuando estos se exponen a campos magnéticos, aumenta la salida de sodio, esto significa, que hay una mayor actividad de la Na-KATPasa, la cual regresa las concentraciones de los iones a su nivel original, dando como resultado una buena polarización de la membrana celular [41]. Además hay otros estudios [42] que reportan que los campos magnéticos orientan a las proteínas transmembranales facilitando los movimientos iónicos a través de la membrana celular ayudando de esta manera a una buena polarización de la misma.

Debido a que la piel está sujeta a una gran cantidad de accidentes, es importante desarrollar nuevos métodos que aceleren el proceso de reparación de los tejidos lesionados, restaurando sus funciones y evitando de esta manera infecciones que puedan alterar el proceso de cicatrización. Por tal motivo y por los antecedentes antes mencionados, en este trabajo se propone la utilización de campos magnéticos pulsantes de 100 gauss y de zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5 % en peso, como un posible método alternativo en la cicatrización de heridas.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Si la zeolita enriquecida con zinc y calcio y los campos magnéticos pulsantes participan de alguna manera en los eventos fisiológicos dermales y epidermales durante el proceso de cicatrización de heridas, entonces, se espera observar una mejor cicatrización en las heridas de piel tratadas con la combinación de campos magnéticos más zeolita al compararlas con las heridas que no recibieron ningún tratamiento y con las que sólo se trataron con campos magnéticos, en los diferentes tiempos de experimentación (15, 30 y 45 días).

OBJETIVOS

General

- Describir la morfología externa e histología de la piel en la cicatrización de heridas empleando campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, y sin tratamiento (control), durante 15, 30 y 45 días de experimentación, utilizando como modelo experimental a la rata Wistar.

Particulares

- Observar, describir y comparar externamente la evolución del cierre de la herida durante 15, 30 y 45 días de experimentación en ratas tratadas con:
 - a) Campos magnéticos pulsantes de 100 gauss.
 - b) Campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5 % en peso.
 - c) Grupo control.
- Comparar histológicamente la respuesta que hubo en la cicatrización de heridas en piel de ratas tratadas con campos magnéticos y con la combinación de campos magnéticos más la zeolita con el grupo control.

Capítulo II

MATERIAL Y MÉTODO

2.1 Animales de experimentación

Se trabajó con 45 ratas hembras de la cepa Wistar con un peso entre 200 y 250 gramos, de edad juvenil, se mantuvieron en un bioterio en cajas de fibra de vidrio con tapas de alambre soldado y cama de aserrín. Se alimentaron con alimento comercial y libre acceso al agua.

2.2 Cirugía

Las ratas se dejaron 4 días en el bioterio para que se aclimataran antes de realizar la herida. Se anestesiaron por vía intraperitoneal con una dosis de Ketamina (100 mg/kg de peso) y Xilacina (13 mg/kg de peso). La región dorsal anterior de la rata se rasuró con una navaja de afeitar, se lavo la zona rasurada con jabón antiséptico líquido y se desinfectó con Benzal (Laboratorios Berrier); a cada rata se le realizó, bajo condiciones asépticas, una herida con un bisturí a nivel del tejido subcutáneo de 3.0 X 3.0 cm (figura 12).

2.3 Tratamiento de los animales

Las 45 ratas se dividieron en tres grupos de 15 ratas cada uno. El primer grupo (I), fue expuesto a campos magnéticos pulsantes con una intensidad de 100 gauss durante 30 minutos diarios con un generador de campos magnéticos (Magnetoterapia DHAN-100). Las bobinas fueron colocadas con polos opuestos dentro de la caja de la rata (Fig. 13).

Al segundo grupo (II) se le aplicó sobre la herida una mezcla de Zeolita AIPO* con petrolato puro, utilizando este último como vehículo dérmico, este grupo también fue expuesto a campos magnéticos pulsantes de 100 gauss durante 30 minutos diarios con el mismo generador de campos magnéticos (Magnetoterapia DHAN-100).

El tercer grupo (III) fue el control y no recibió tratamiento.

* La zeolita empleada fue AIPO en forma de polvo enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso.



Fig. 12 Se observan los músculos expuestos de la rata después de haber realizado la herida de 3.0×3.0 cm. Se retiró epidermis, dermis y tejido subcutáneo.

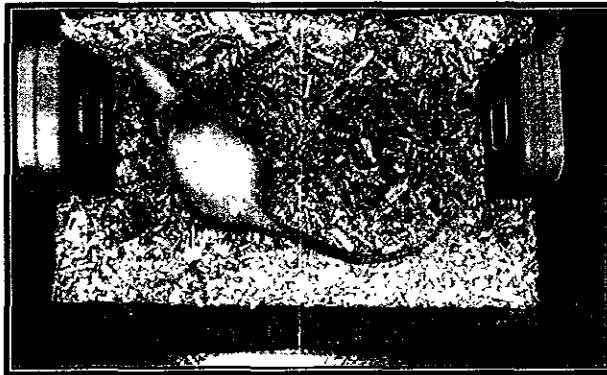


Fig. 13 Rata Wistar de 200 a 250 g recibiendo campos magnéticos pulsantes de 100 gauss. Se observan las bobinas colocadas con polos opuestos.

Cada grupo se dividió en tres subgrupos de 5 ratas cada uno, cada subgrupo correspondió a los diferentes tiempos de experimentación, los cuales fueron: a) de 15 días de tratamiento, b) de 30 días de tratamiento y c) de 45 días de tratamiento. Al terminar los días de experimentación se sacrificaron las ratas con éter etílico y se disectó el tejido cicatrizal para el procesamiento histológico.

2.4 Estudio clínico

El estudio clínico consistió en observar externamente la evolución del cierre de la herida de cada una de las ratas estudiadas durante los tres tiempos de experimentación. Los criterios de puntuación evaluados (modificados de la ASTM) [43] fueron los siguientes:

a) 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)

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 se extiende mas allá del área de exposición).

d) Pelo

1. Presencia
2. Ausencia

2.5 Procesamiento histológico del tejido cicatrizal

❖ Técnica de procesamiento para inclusión en parafina

- Inmediatamente después de haber disectado el tejido cicatrizal, se fija en una solución amortiguadora de fosfatos durante 48 horas, a un pH de 7.4, el cual se preparó de la siguiente manera:

Fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.043M
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	0.050M
Formaldehído al 37%	100ml
Agua destilada	900ml

- Después de que se fijaron los tejidos se lavaron con agua de la llave de 15 a 20 minutos.
- Se deshidrataron con alcoholes de concentración ascendente (50, 70, 80, 96 y 100%) de 30 minutos a 1 hora en cada alcohol hasta llegar a xilol-alcohol.
- Se aclararon con xilol de 30 minutos a una hora.
- Se incluyeron los tejidos en parafina (JUNG-Histowax) (p.f. 57-58° C).
- Se realizaron cortes de 5 μ de grosor con un micrótopo de rotación, los cuales se colocaron en un baño de flotación que contenía agua con grenetina a una temperatura de 38-42 ° C.
- Finalmente los tejidos se colocaron en portaobjetos y se tiñeron con la técnica de Tricrómica de Gallego (Apéndice I) [44].

2.6 Estudio histológico

Se realizó un análisis histológico de los cortes teñidos con la técnica Tricrómica de Gallego en un microscopio óptico Carl Zeiss, con un objetivo de 40X en donde se evaluó cualitativamente; tejido de granulación, infiltrado celular, disposición de las fibras de colágena, neovascularización, folículos pilosos y glándulas sebáceas. Se tomaron fotomicrografías de las áreas más representativas de los cortes teñidos con una cámara CONTAX 167 MT. La técnica Tricrómica de Gallego se utilizó principalmente para teñir fibras de colágena, en este caso se tiñeron de color azul verdoso, la queratina y eritrocitos se tiñeron de amarillo y los núcleos de las células de color rojo violáceo.

2.7 Análisis estadístico

Se analizaron los resultados utilizando la prueba de análisis de variancia (ANOVA) para comparar las medias del día de cierre de la herida de los diferentes grupos durante los tres tiempos de experimentación, tomando como base la hipótesis nula de que las medias del grupo control, del grupo tratado con campos magnéticos (CM) y del grupo tratado con campos magnéticos más zeolita (CM + ZEO) son iguales. Las pruebas tuvieron un nivel de significación de $\alpha = 0.05$ [45].

Capítulo III

RESULTADOS

A los 15 días de tratamiento

En el grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, a los 15 días de tratamiento, se observó que no había cerrado completamente la herida y que aún permanecía la costra. Además se observó que no hubo presencia de infección, ni de edema, el eritema fue muy leve durante los primeros días postoperatorios y después desapareció. Los resultados histológicos mostraron que el proceso de reepitelización no se había completado a los 15 días de tratamiento, ya que se pudo ver la epidermis aún migrando por debajo de la costra. Se observó además, el tejido de granulación con gran cantidad de vasos sanguíneos, el cual estaba siendo reemplazado por fibras de colágena (Fig. 14A).

A los 15 días de tratamiento en el grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, se observó la herida muy contraída, con presencia de costra en algunas ratas, sin infección, sin eritema y edema muy leve alrededor de la herida en algunas ratas. En los resultados histológicos se observa que el proceso de reepitelización ha sido completado pero aún no se ha desprendido la costra, por debajo de la epidermis el tejido de granulación está siendo reemplazado por fibras de colágena. Se observa una gran cantidad de vasos sanguíneos en la dermis y la colágena ordenada de una manera homogénea (Fig. 14B).

En el grupo control a los 15 días de tratamiento aún permanecía la costra, el eritema se presentó en los primeros días postoperatorios. No hubo presencia de infección y el edema al día 9 apenas era perceptible. Los resultados histológicos muestran que el proceso de reepitelización no se ha completado, ya que aún se observa la epidermis migrando por debajo de la costra. Debajo de la epidermis se puede ver que el tejido de granulación está siendo reemplazado por fibras de colágena (Fig. 14C y Fig. 15).

Es importante mencionar que a los 15 días de tratamiento no se comparó el promedio del día de cierre de la herida en los diferentes grupos, debido a que la mayoría de las heridas no había cerrado y por lo tanto no se obtuvieron datos para poder realizar la prueba estadística.

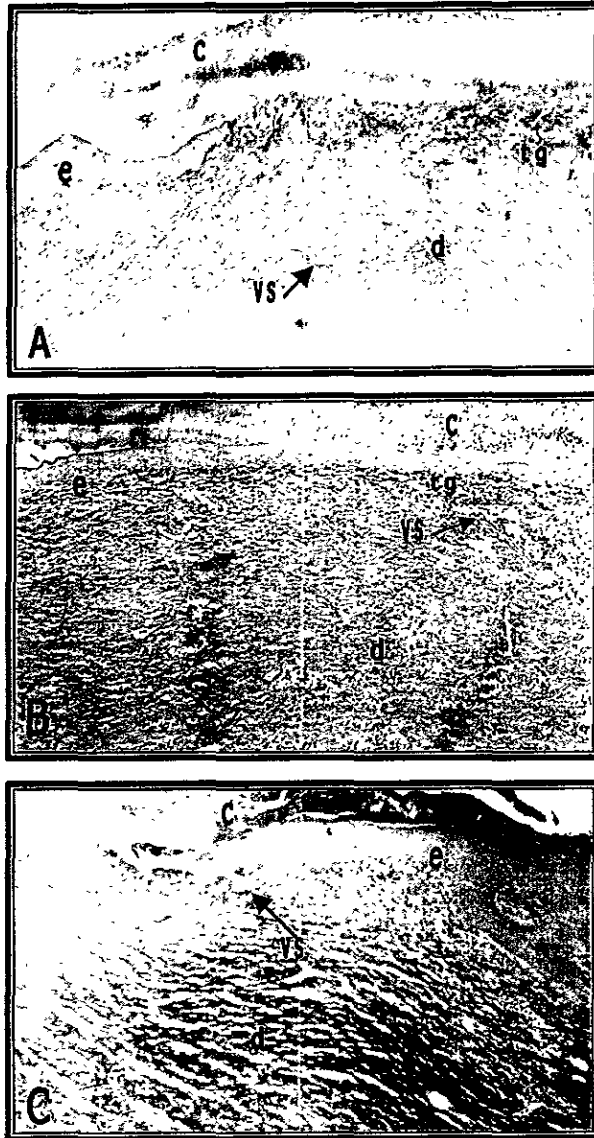


Fig. 14 Resultados histológicos de la cicatrización de piel a los 15 días después de realizada la herida en las ratas tratadas con A) campos magnéticos, B) campos magnéticos más zeolita y C) del grupo control. Se puede observar la epidermis (e), la costra (c), el tejido conectivo de la dermis (d) en donde se destacan vasos sanguíneos (vs) y parte del tejido de granulación (tg). Tricrómica de Gallego 10X.



Fig. 15 Se observa como las células epidérmicas (ce) van desplazando a la costra (c). Se pueden ver también eritrocitos (e). Tricrómica de Gallego 100 X.

A los 30 días de tratamiento

En el grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss a los 30 días de tratamiento, se observó presencia de eritema muy leve hasta el día 19 y después desapareció. No hubo presencia de infección y el edema fue muy leve durante los primeros días postoperatorios. En los resultados histológicos se puede observar que el proceso de reepitelización ha finalizado, ya que la epidermis se encuentra completamente regenerada. En esta misma capa de la piel se puede observar el estrato córneo. Debajo de la epidermis se encuentra la capa dérmica, en donde se observa que el tejido de granulación ha sido reemplazado en su totalidad por fibras de colágena y folículos pilosos que han empezado a regenerar, al igual que vasos sanguíneos (Fig. 16A).

En el grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, a los 30 días de tratamiento, se observó un eritema muy leve al día 14, se presentó infección en una rata durante todo el tiempo de experimentación, el edema fue muy leve hasta el día 19 y después desapareció. Los resultados histológicos mostraron que las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, fueron completamente reepitelializadas y el tejido de granulación fue casi completamente reemplazado por tejido conectivo de la dermis y folículos pilosos (Fig. 16B). En el centro de la figura se observa un corte longitudinal de un folículo piloso regenerado casi en su totalidad, se puede observar junto a él glándulas sebáceas, en esta misma área se observan vasos sanguíneos con eritrocitos y un buen reacomodo de las fibras de colágena.

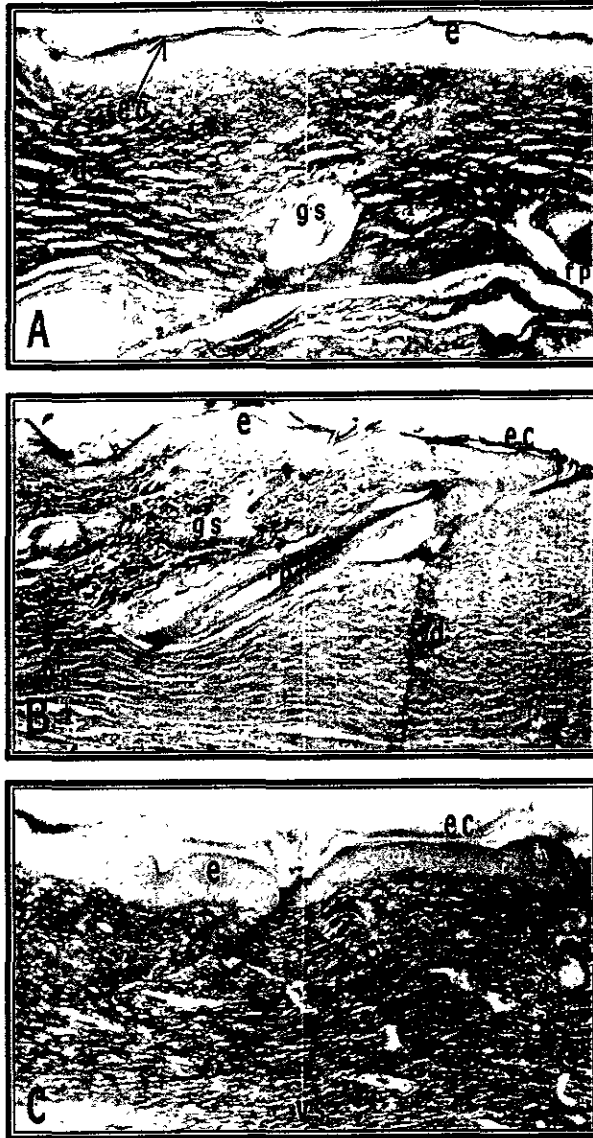


Fig. 16 Muestra los resultados histológicos de la cicatrización de piel a los 30 días después de realizada la herida en las ratas tratadas con A) campos magnéticos, B) campos magnéticos más zeolita y C) del grupo control. Se observa la epidermis (e), el estrato córneo (ec), la dermis (d), vasos sanguíneos (vs), folículos pilosos (fp) y glándulas sebáceas (gs). Tricrómica de Gallego 10X.

En el grupo control, a los 30 días de tratamiento se observó que ya había cerrado completamente la herida, se presentó eritema muy leve hasta el día 16. No hubo presencia de infección en ninguna rata, el edema fue muy leve durante los primeros días postoperatorios, después desapareció. En los resultados histológicos se observa que el proceso de reepitelización se ha llevado a cabo en su totalidad. Debajo de la epidermis se encuentra la dermis, en la que se puede ver una gran cantidad de vasos sanguíneos; a diferencia de los otros casos, aquí no se observa regeneración de folículos pilosos (Fig. 16C).

Con respecto al día de cierre de la herida se pudo observar a los 30 días de experimentación, que el grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso presentó una tasa de cicatrización más elevada, ya que cerró en promedio el día 16; seguido del grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss y por último el control, que cerró en promedio el día 20.4 (Fig.17).

Con base en la prueba estadística de ANOVA ($F_{0.05}$), se puede decir que si hay diferencia significativa con respecto al día de cierre de la herida en los grupos tratados durante 30 días con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso y en el grupo control.

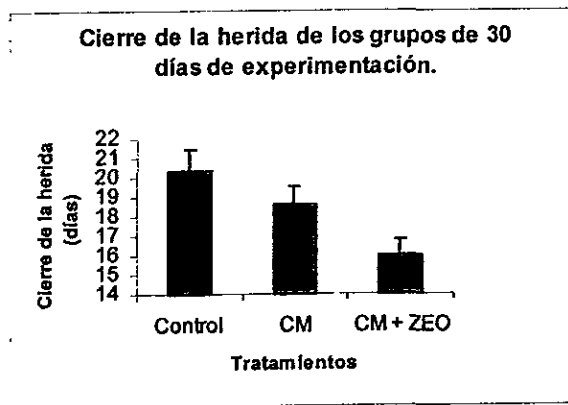


Fig. 17 Promedio del día de cierre de la herida en piel de ratas control, en ratas tratadas con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss (CM) y en ratas tratadas con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso (CM+ZEO), a los 30 días de experimentación.

A los 45 días de tratamiento

En el grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, el eritema fue muy leve hasta el día 13 y después desapareció. No se presentó infección en ninguna de las ratas de este grupo. El edema fue bien definido hasta el día 15 y después desapareció. En los resultados histológicos se observan bien delimitadas las dos capas de la piel; la epidermis y la dermis. La capa epidérmica a los 45 días de tratamiento fue completamente reepitelializada, en esta capa se observa el estrato córneo en color amarillo verdoso. En la dermis se observa que el tejido de granulación ha sido completamente reemplazado por fibras de colágena, las cuales muestran un arreglo muy parecido al de una piel normal, pero no se observan folículos pilosos ni glándulas sebáceas; sin embargo, si se pueden ver vasos sanguíneos (Fig. 18A).

A los 45 días de experimentación, en el grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, se observó que el eritema fue muy leve hasta el día 10, no se presentó infección en este grupo y el edema fue muy leve hasta el día 10. En los resultados histológicos se observó que la reepitelización se había llevado a cabo en su totalidad. En la dermis se observó la regeneración de folículos pilosos y glándulas sebáceas (Fig. 18B).

En el grupo control se observó que ya habían cerrado completamente las heridas a los 45 días de tratamiento, en este subgrupo el eritema fue muy leve durante el día 8 y después desapareció. No hubo presencia de infección y el edema fue moderado durante los primeros seis días, después desapareció. Los resultados histológicos muestran que las heridas fueron completamente reepitelializadas, pero el tejido de granulación no fue reemplazado completamente por fibras de colágena; sin embargo, en las áreas donde si fue reemplazado se observa un buen acomodamiento de éstas. En la capa dérmica se pueden observar vasos sanguíneos y folículos pilosos que no regeneraron en su totalidad (Fig.18C).

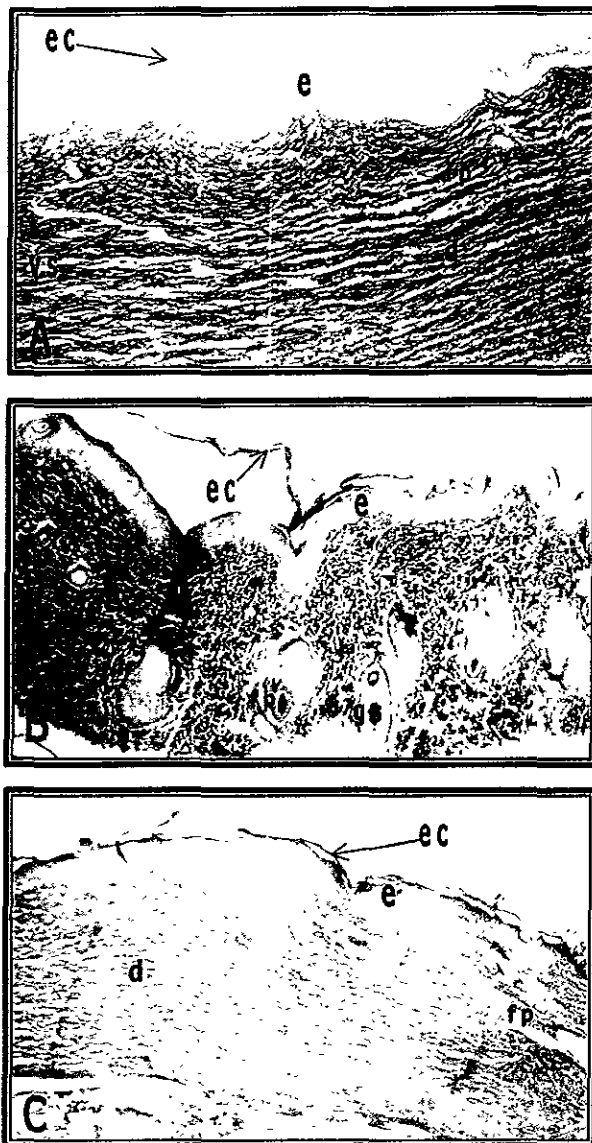


Fig. 18 Muestra los resultados histológicos de la cicatrización de piel a los 45 días después de realizada la herida en las ratas tratadas con A) campos magnéticos, B) campos magnéticos más zeolita y C) del grupo control. Se observa la epidermis (e), el estrato córneo (ec), la dermis (d), vasos sanguíneos (vs), folículos pilosos (fp) y glándulas sebáceas (gs). Tricrómica de Gallego 10X.

Con respecto al día de cierre de la herida se pudo observar a los 45 días de experimentación, que el grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso presentó una tasa de cicatrización más elevada, ya que la herida cerró en promedio el día 16; seguido del grupo tratado con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss y por último el control, que cerró en promedio el día 18.6 (Fig.19).

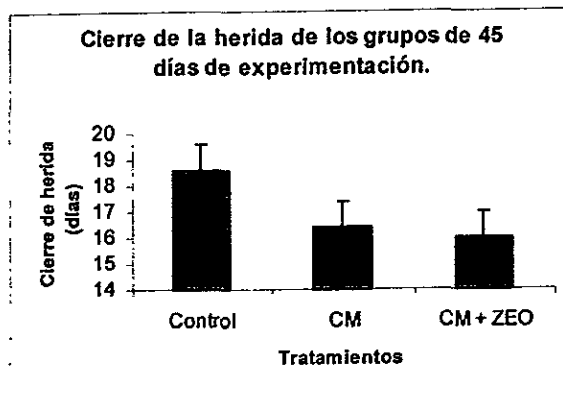


Fig. 19 Promedio del día de cierre de la herida en piel de ratas control, en ratas tratadas con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss (CM) y en ratas tratadas con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso (CM+ZEO), a los 45 días de experimentación.

Con base en la prueba estadística de ANOVA ($F_{0.05}$), se puede decir que si hay diferencia significativa con respecto al día de cierre de la herida en los grupos tratados durante 45 días con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso y en el grupo control.

Externamente, a los 45 días de tratamiento, se pudo observar en la piel cicatrizada de las ratas tratadas con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss y con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, una pequeña cicatriz con un ligero cambio de pigmentación (Fig. 20A y B, respectivamente). En el mismo tiempo de tratamiento, en las heridas del grupo control, se observó una cicatriz muy marcada con una pigmentación de piel menor respecto a la de una piel normal (Fig. 20C).

Es importante mencionar que todas las ratas presentaron una buena salud durante los tiempos de experimentación (15, 30 y 45 días).

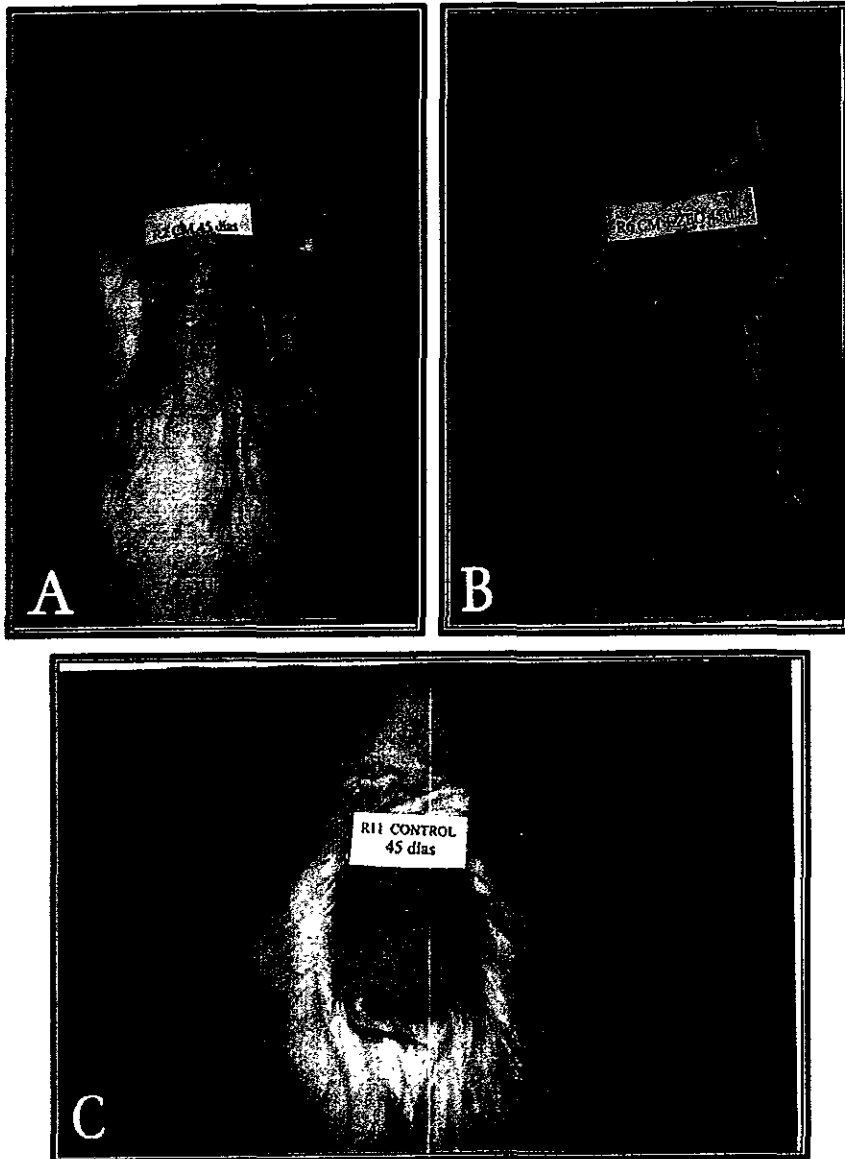


Fig. 20 Muestra el cierre de la herida de las ratas tratadas con campos magnéticos (A), con campos magnéticos más zeolita (B) y del grupo control (C) después de 45 días de experimentación.

DISCUSION

En la segunda guerra mundial se presentó la necesidad de utilizar materiales para ayudar a soldados y civiles que habían perdido un miembro o un tejido en forma parcial o total [20]. Desde entonces se han realizado numerosas investigaciones con materiales, que son conocidos actualmente como biomateriales [20]. En el presente trabajo se utilizó campos magnéticos pulsantes de 100 gauss y zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, utilizando esta última como biomaterial, ya que se ha demostrado que al ser administrada a heridas de segunda intención en piel, ésta no causa ningún efecto negativo ni rechazo en el organismo [24].

Los resultados de este trabajo a los 15 días de experimentación en las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes, con campos magnéticos pulsantes más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso y en las heridas control, mostraron que no hubo presencia de infección y que el edema y el eritema cuando se presentaron fueron de forma leve, estos parámetros evaluados también fueron observados en otro trabajo [24], en el que se obtuvieron resultados similares.

Los resultados histológicos, demuestran que las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, presentaron una mayor neovascularización y reepitelización que las heridas control y que las heridas tratadas sólo con campos magnéticos pulsantes; estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos [30,24], en donde se observó, que cuando se someten úlceras crónicas de piel a campos magnéticos por un período de tres meses, aumenta la angiogénesis y la síntesis de colágena; y en heridas de segunda intención aumenta la reepitelización cuando se aplica sobre la herida zeolita enriquecida con diferentes concentraciones de iones zinc y calcio [24].

Los resultados a los 30 días de experimentación en los tres grupos de estudio, mostraron que el eritema y el edema se presentaron de forma leve, estos parámetros también fueron evaluados en otro trabajo [24], en el que se obtuvieron resultados diferentes en el mismo intervalo de tiempo (30 días), ya que se observó que el edema que se presentó fue de tipo moderado. Una explicación de los resultados encontrados en este trabajo, se debe posiblemente a los campos magnéticos utilizados, ya que se ha observado que cuando una célula esta dañada, se produce una despolarización de los tejidos, y como consecuencia, aumenta la entrada de moléculas y agua a la célula debido a su permeabilidad, creándose de esta manera un edema, el cual es eliminado al exponer el tejido a un campo magnético mediante la repolarización de las células dañadas [46].

Un aspecto sobresaliente observado en los resultados histológicos, fue la presencia de folículos pilosos y glándulas sebáceas en las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso; estos resultados también fueron observados por otro autor [24], en donde concluye que el pelo aparece más tempranamente en las heridas a las que se les administró zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% y al 1.1% en peso en comparación con las heridas que no recibieron ningún tratamiento. La diferencia encontrada de folículos pilosos y glándulas sebáceas en este trabajo se debe probablemente a la zeolita, ya que su molécula contiene en sus cavidades iones zinc y calcio [23], los cuales son removidos continuamente en el medio, en donde participan en muchos eventos fisiológicos dermales. Además, se ha observado que el zinc promueve el crecimiento de pelo [47], y que cuando hay deficiencia de zinc tanto en animales como en humanos hay presencia de alopecia y dermatitis [14].

Otra diferencia notable en los resultados histológicos, fue la orientación de las fibras de colágena, ya que presentaron un mejor arreglo las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso que en los otros grupos de estudio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (29). Además, se ha observado que los campos magnéticos en cultivos de condroblastos aumentan la síntesis de DNA y de colágena [34].

Los resultados obtenidos a los 30 días de tratamiento, mostraron también, que el día de cierre de la herida fue más rápido en las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso. Estos resultados también han sido observados por otros autores [27,32], quienes encontraron que las heridas tratadas con campos magnéticos de 200 y 50 gauss cerraron más rápido que las heridas control. Cabe destacar aquí, que aunque se hayan obtenido resultados semejantes en ese trabajo, el cierre de la herida fue más rápido en este trabajo que en el otro. Además, en otro estudio se observaron resultados semejantes[24].

Los resultados a los 45 días de tratamiento, de las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, mostraron que el proceso de cicatrización fue mejor en este grupo que en los otros, ya que se observó un mayor número de folículos pilosos y glándulas sebáceas, además, la formación de la cicatriz fue de menor tamaño al compararla con los otros grupos de estudio y el color de pigmentación de la cicatriz fue parecida a la de una piel normal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otro trabajo [24], en donde se observó que la administración de zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso en heridas, no dejó cicatriz ni diferencia en la coloración de piel entre la normal y la regenerada. Otra característica notable asociada con la exposición a campos magnéticos, fue el día de cierre, ya que cerraron en días, hasta en un 21% más rápido las heridas expuestas a campos magnéticos que las heridas control. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores [27,32], quienes encontraron que en las heridas expuestas a campos magnéticos, siempre fue más pequeña la herida durante los tiempos de experimentación. Los resultados de este trabajo probablemente se deben a la aplicación conjunta de los campos magnéticos pulsantes más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, ya que se ha reportado que éstos intervienen en los procesos de regulación, diferenciación y división celular [18,19, 31,32,33].

Estos resultados sugieren que la zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso en combinación con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss influyen en la cicatrización de heridas, acelerando el proceso y restableciendo la normalidad del tejido lesionado; y llevan a considerar estudios moleculares para intentar dilucidar sus mecanismos de acción tanto de los campos magnéticos como de la zeolita, principalmente el marcaje radiactivo de los iones zinc y calcio y de los receptores que participan en la cicatrización de las heridas.

CONCLUSIONES

- Histológicamente las fibras de colágena en la capa dérmica se presentaron de una manera homogénea, y los estratos epidérmicos tuvieron un buen reacomodo en las heridas tratadas con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss más zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso.
- La aplicación diaria de zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso en presencia de campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, en las heridas de segunda intención, ayudan a mejorar el proceso de cicatrización, ya que aparecen anexos cutáneos y el área de la herida se ve de un color casi parecido al de una piel normal.
- La zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso en combinación con campos magnéticos pulsantes de 100 gauss acelera el proceso de cicatrización, cerrando la herida en días hasta en un 21 % más rápido que el grupo control.
- La aplicación diaria de zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, en presencia de campos magnéticos pulsantes de 100 gauss, en heridas de segunda intención deja una cicatriz casi imperceptible en la piel, aspecto muy importante en la cuestión estética del ser humano.
- Por lo tanto, se puede decir que el proceso de cicatrización es mejor y más rápido con el tratamiento de zeolita enriquecida con zinc y calcio al 0.5% en peso, en presencia de campos magnéticos pulsantes que en los otros grupos de estudio.

APÉNDICE

Para estudiar los elementos constitutivos de los tejidos es necesario emplear una serie de recursos prácticos individuales, que unidos forman la **técnica histológica**. En este trabajo los cortes obtenidos se tiñeron con la técnica que se menciona abajo:

- ❖ **Técnica de tinción Tricrómica de Gallego.** Se empleo fundamentalmente para teñir fibras de colágena, en este caso se tiñeron de color azul verdoso, la queratina y eritrocitos se tiñeron de amarillo y los núcleos de rojo violáceo; para conseguir estos resultados se siguió el siguiente procedimiento:
 - Las preparaciones se desparafinaron en xilol durante 6 minutos.
 - Se hidrataron en alcoholes de concentración descendente (100%, 96%, 70% y 50%) durante 3 minutos en cada uno.
 - Se lavaron con agua destilada.
 - Se tiñeron con Fucsina fenicada de Zielh (acética) durante 5 minutos.
 - Se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante.
 - Se viraron con virofijador.
 - Se lavaron con agua destilada.
 - Se tiñeron con picroindigocarmin durante 5 minutos.
 - Se deshidataron con alcoholes de 70%, 96%, 100% y 100%-Xilol durante 5 minutos en cada uno.
 - Se aclararon con xilol durante 5 minutos.
 - Se montaron con bálsamo de Canadá y se dejaron secar.

BIBLIOGRAFIA

1. Fawcett DW. (1994). *Tratado de Histología*. Interamericana - McGraw-Hill. México, D.F. 1026 pp.
2. Leeson CR, Leeson TS and Paparo AA. (1987). *Histología*. Interamericana. México, D.F. 618 pp.
3. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. (1997). *Histología Texto y Atlas Color* 3ra. Ed. Panamericana México, D.F. 817 pp.
4. Gartner LP, Hiatt, JL. (1997). *Histología Texto y atlas*. McGraw-Hill – Interamericana. 506 pp.
5. Brady RJ. (1992). *Curso programado de anatomía y fisiología de la piel*. Limusa. México D.F. 56 pp.
6. Burkitt HG, Young B. And Heath JW. (1993). *Wheater's Functional Histology. A Text and Colour Atlas*. Churchill Livingstone. New York. 407 pp.
7. Silver FH. (1994). *Biomaterials medical devices and Tissue Engineering*. Chapman & Hall. London 303 pp.
8. Clark RA and Henson PM. (1988). *The molecular and cellular biology of wound repair*. Plenum Press. New York and London. U.S.A. 597 pp.
9. Hunt TK. (1983). *Cicatrización e Infección de las Heridas: Teoría y Práctica Quirúrgica*. Manual moderno. México D.F. 302 pp.
10. Banks WJ. (1996). *Histología Veterinaria Aplicada*. Manual Moderno. México D.F. 750 pp.
11. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MWJ. (1995). The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals. *J. Anat.* 187:1-26
12. Steven FS, Ralph AH, Rhoda SP. (1990). *Small Animal Wound Management*. Lea & Febiger. Philadelphia London 252 pp.
13. Hsieh P, Chen LB. (1983). Behavior of cell seeded in isolated fibronectina matrices. *J. Cell. Biol.* 96:1208-1217

14. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. (1997). *Patología Estructural y Funcional*. Sed. McGraw-Hill - Interamericana. 1533 pp.
15. Trigo TFJ. y Mateos PA. (1993). *Patología General Veterinaria*. Interamericana - McGraw-Hill. México D.F. 242 pp.
16. Probst CW, in Slatter D. (1995). *Textbook of Small Animal Surgery*. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania 1141 pp.
17. Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook J, Yuspa S. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*. 19:245-254
18. Vicanová J, Boelsma E, Mommaas AM, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J, Egelrud T, Koerten HK, Ponc M. (1998). Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement or terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J. Invest. Dermatol.* 111:97-106
19. Fuchs E. (1990). Epidermal differentiation: The bare essentials. *J. Cell. Biol.* 111(6, Pt. 2): 2807-2814
20. Piña BMC. (1999). Biocompatibilidad de Materiales. *Rev. Mex. Fis.* 45(S1): 105-111
21. Tejeda CA. (1999). *Zeolitas ALPO enriquecidas con zinc y calcio. Obtención y caracterización*. Tesis de Licenciatura de Física. Fac. de Ciencias. UNAM. México, D.F. 58 pp.
22. González G, Piña C, Jacas A, Hernández M, Leyva A. (1998). Synthesis and characterization of ZnAPO-34 molecular sieve with CHA structure type. *Micropor. Mesopor Materials*. 25:103-108
23. Giannetto PG. (1989). *Zeolitas. Características, propiedades y aplicaciones industriales*, Innovación tecnológica. Caracas Venezuela. 169 pp.
24. Regalado HM. (2000). *Efecto de las zeolitas enriquecidas con calcio y zinc como reconstituyentes de piel en heridas*. Tesis de Licenciatura de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F. 58pp.
25. Jou D, Llebot JE, García CP. (1995). *Física para ciencias de la vida*. McGraw-Hill. México 596 pp.

26. Johannes GL. (1985). *El campo magnético*. Boixareu editores. Barcelona España. 67 pp.
27. Ottani V, De Pasquale V, Govoni P, Franchi M, Zaniol P, Ruggeri A. (1988). Effects of pulsed extremely-low frequency magnetic fields on skin wounds in the rat. *Bioelectromagnetics*. 9:53-62
28. Lednev VV. (1991). Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 12:71-75
29. Liboff AR, Williams T Jr, Strong DM, Wistar R Jr (1984). Time-varying magnetic fields: Effect on DNA synthesis. *Science* 223 (4638): 818-820
30. Bassett CA. (1993). Beneficial effects of electromagnetics fields. *J. Cell. Biochem.* 51: 387-393
31. Ryaby JT. (1998). Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clin Orthop* (355S): 205-215
32. Patino O, Grana D, Bolgiani A, Prezzavento G and Merlo A. (1996). Effect of magnetic fields on skin wound healing. Experimental study. *Medicina (B. Aires)*. 56(1) 41-44
33. Blank M. (1995). Biological effects of environmental electromagnetic fields: molecular mechanisms. *Biosystems* 35(2-3):178-178
34. Darendeliler MA, Darendeliler A, Sinclair PM. (1997). Effects of static magnetic and pulsed electromagnetic fields on bone healing. *Int. J. Adult. Orthodon Orthognath Surg.* 12(1):43-53
35. Scardino MS, Swaim SF, Sartin EA, Steiss JE, Spano JS, Hoffman CE, Coolman SL, Peppin BL. (1998). Evaluation of treatment with a pulsed electromagnetic field on wound healing, clinicopathologic variables, and central nervous system activity of dogs. *Am. J. Vet. Res.* 59(9):1177-1181
36. Leaper DJ, Foster ME, Brennan SS, Davies PW. (1985). Do magnetic fields influence soft tissue wound healing?—A preliminary communication. *Equine Vet. J.* 17(3) :178-180
37. Adey WR. (1993). Biological Effects of Electromagnetic Fields. *J. Cell. Biochem.* 51: 410-416

38. Antonopoulos A, Eisenbrandt H, Obe G. (1997). Effects of high-frequency electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 395:209-214
39. McCann J, Dietrich F, Rafferty C. (1998). The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutat. Res.* 411(1):45-86
40. Goodman R, Chizmadzhev Y, Henderson S. (1993). Electromagnetic fields and cells. *J Cell Biochem* 51:436-441
41. Sodi PD. (1994). *Magnetoterapia y Tratamiento Metabólico*. Publicaciones del autor. 3ra. Ed. 444pp.
42. Sakurai H., Okuno K., Kubo A., Nakamura K., Shoda M. (1999). Effect of 7- tesla homogeneous magnetic field on mammalian cells. *Bioelectrochem. Bionerget.* 49:57-63.
43. ASTM F. 719. (1991). *Practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation*. American Society for Testing and Material, Medical Devices, ASTM. Philadelphia, USA. Vol. 13.01
44. Estrada FE, Peralta ZL, Rivas MP. (1982). *Manual de técnicas histológicas*. AGT Editor México, D.F. 140 pp.
45. Daniel WW. (1996). *Bioestadística*. Base para el análisis de ciencias de la salud. Uteha Noriega Editores. México, D.F. 878 pp.
46. Ross J. (1994). *Simposium International Digest Antennas and Propagation Society*. Universidad de Stanford, California. USA. 1-2pp
47. Vallee BL, Falchuk KH. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73: 79-118.