



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL EFECTO DE LA COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS AGUDAS EN HUMANOS.

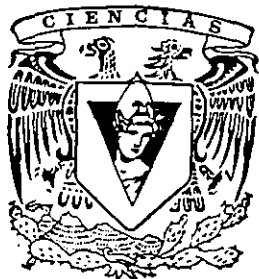
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

RICARDO RODRÍGUEZ CALDERÓN



DIR. TESIS: DRA. GUADALUPE JANETTE FURUZAWA CARBALLEDA



298741



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:

"Análisis histológico e inmunohistoquímico del efecto de la colágena-Polivinilpirrolidona en la cicatrización de heridas agudas en humanos".

realizado por Ricardo Rodríguez Calderón

con número de cuenta 9319711-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. Guadalupe Janette Furuzawa Carballeda

Propietario Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez

Propietario M. en IBB. Saúl Cano Colín

Suplente Dr. Emilio Rojas del Castillo

Suplente M. en C. Josefina Herrera Santoyo

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



DRA. PATRICIA RAMOS MORALES  
COORDINADORA DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLÓGIA

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Tejido  
Conjuntivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM,  
bajo la dirección de la Dra. Janette Furuzawa Carballeda,  
el Dr. Edgar Kröttsch Gómez y del Dr. Lino Díaz de León  
Hernández<sup>†</sup> y con el apoyo de ÁSPID, S.A. de C.V.**

A Luis, Amelia y María Eugenia,  
por soportarme en todos los  
sentidos y direcciones:  
Por ser mi Familia,  
**Gracias.**

A ustedes.  
A mis muertos y a mis vivos;  
¡aunque algunos se pasan de vivos!

A mis sinodales: Dra. Janette Furuzawa Carballeda,  
Dr. Edgar Kröttsch Gómez, M. en IBB Saúl Cano Colín,  
Dr. Emilio Rojas del Castillo, y M. en C. Josefina Herrera  
Santoyo, gracias por criticar y enriquecer con ello mi trabajo.

A la IQ Nantzin Martínez de Leal y al Ing. Leopoldo Leal Fleischer,  
por su confianza y apoyo permanentes.

A ti Janette por enseñarme y permitirme incidir,  
en un micrómetro de todo lo que significas.

Al extinto Dr. Lino Díaz de León  
por permitirme ser parte de su  
grupo.

A todos mis compañeros del ahora  
extinto Laboratorio de Tejido Conjuntivo del  
IIBm por brindarme su amistad y  
conocimientos.

A ti Edgar, por las preguntas sin respuestas y viceversa.

A la Fundación Alberto y Dolores Andrade, I.A.P.,  
por apoyarme y compartir siempre una sonrisa.

A Javier Calderón A. ("Lobo"), a su señora esposa  
y a la flota de la Unidad de Informática, por los  
momentos y el servicio que me brindaron.

A todos mis ("n") amigos.

**¡ Muchas Gracias!**  
RROCA

**“No cesaremos de explorar  
y el final de toda nuestra exploración  
será llegar al punto de partida  
y reconocer el lugar por primera vez.”**

**T.S. Eliot**

**“Si la luz es  
y todo es pensamiento,  
no olvido que la luz,  
también genera sombra.”**

**RROCA**

## ÍNDICE

↳ ABREVIATURAS.....	4
↳ RESUMEN.....	6
↳ INTRODUCCIÓN.....	8
LA PIEL.....	8
EL PROCESO DE LA CICATRIZACIÓN.....	13
FASES DE LA CICATRIZACIÓN.....	14
INFLAMACIÓN.....	14
REPARACIÓN.....	17
REMODELACIÓN.....	17
EL PAPEL DE LAS CITOCINAS DURANTE EL PROCESO DE LA CICATRIZACIÓN.....	19
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL- ALFA (TNF- $\alpha$ ).....	19
INTERLEUCINA-1 (IL-1).....	20
ACCIÓN CONJUNTA DEL TNF- $\alpha$ Y LA IL-1 $\beta$ .....	21
FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- BETA (TGF- $\beta$ ).....	22
FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF).....	23
 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR PARTICIPANTES EN EL PROCESO CICATRIZAL.....	24
VCAM-1 Y VLA-4.....	25
 LOS COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR PARTICIPANTES EN EL PROCESO CICATRIZAL.....	32
LA SUPERFAMILIA DE LAS COLÁGENAS.....	33
LA ELASTINA.....	36
METALOPROTEASAS Y SUS INHIBIDORES.....	36
 ↳ ANTECEDENTES.....	41
LA COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA (clg-pvp).....	42
↳ JUSTIFICACIÓN.....	43
↳ IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	44
↳ HIPÓTESIS.....	45
↳ OBJETIVOS.....	45
OBJETIVO GENERAL.....	45
OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
 † MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
GENERACIÓN DE HERIDAS Y OBTENCIÓN DE BIOPSIAS.....	46
CRIOCONSERVACIÓN.....	46
CORTES POR CONGELACIÓN.....	48
EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS INFLAMATORIOS POR ESCALA VISUAL ANÁLOGA.....	49

TINCIONES HISTOLÓGICAS.....	49
TRICRÓMICA DE MASSÓN.....	49
PICROPOLICRÓMICA DE HEROVICI.....	50
MÉTODO DE VERHOEFF PARA FIBRAS ELÁSTICAS .....	50
INMUNOHISTOQUÍMICA.....	50
CONTEO DE INMUNORREACTIVIDAD CELULAR.....	53
FOTOGRAFÍA EN MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO.....	53
RESULTADOS.....	54
OBTENCIÓN DE BIOPSIAS.....	54
PÁRAMETROS CLÍNICOS (TABLAS DE ESCALAS VISUALES ANÁLOGAS).....	55
TINCIONES HISTOLÓGICAS.....	57
TRICRÓMICA DE MASSÓN.....	57
PICROPOLICRÓMICA DE HEROVICI.....	59
MÉTODO DE VERHOEFF.....	61
INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	63
CITOCINAS.....	63
TNF- $\alpha$ .....	64
IL-1 $\beta$ .....	65
TGF- $\beta$ .....	66
PDGF-AB.....	67
INMUNORREACTIVIDAD CELULAR A CITOCINAS	
A 7 Y 28 DÍAS POST-CIRUGÍA.....	68
MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR (MACs).....	69
VLA-4.....	70
VCAM-1.....	71
INMUNORREACTIVIDAD CELULAR A MACs	
A 7 Y 28 DÍAS POST-CIRUGÍA.....	72
METALOPROTEASA-1 Y SU INHIBIDOR.....	73
MMP-1.....	74
TIMP-1.....	75
INMUNORREACTIVIDAD CELULAR A MMP-1 Y TIMP-1	
A 7 Y 28 DÍAS POST-CIRUGÍA.....	76
DISCUSIÓN.....	77
CONCLUSIONES.....	85
PERSPECTIVAS.....	87
APÉNDICE.....	88
REFERENCIAS.....	93



## ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácidos (residuos de aminoácidos).
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos básico ("basic fibroblast growth factor").
<b>CD</b>	Molécula de diferenciación celular ("cluster differentiation").
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario (complementary deoxyribonucleic acid).
<b>CI</b>	Células inflamatorias.
<b>CIR(%)</b>	Porcentaje de células inmunorreactivas.
<b>clg</b>	Colágena.
<b>clg-pvp</b>	Colágena-polivinilpirrolidona.
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico ("epidermal growth factor").
<b>FACIT</b>	Colágenas asociadas a fibrillas con triples hélices Interrumpidas ("Fibril-associated collagens with interrupted triple helices").
<b>FN</b>	Fibronectina.
<b>GFs</b>	Factores de crecimiento ("Growth factors").
<b>GFRs</b>	Receptores de factores de crecimiento ("Growth factor receptors").
<b>HMVEC's</b>	Células endoteliales de la microvasculatura dérmica humana ("Human dermal microvascular endothelial cells").
<b>HUVE</b>	Endotelio de vena umbilical humana ("Human umbilical vein endothelium").
<b>HUVEC's</b>	Células endoteliales de vena umbilical humana ("Human umbilical vein endothelial cells").
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular ("Intercellular adhesion molecule").
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta ("Interleukin-1 $\beta$ ").
<b>kD</b>	Kilodaltones.
<b>KGF</b>	Factor de crecimiento de queratinocitos ("Keratinocyte growth factor").
<b>LFA-1, 2 y 3</b>	Antígeno de función leucocitaria-1, 2 y 3 ("Leucocyte Function Antigen-1, 2 and 3").
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido (endotoxina bacteriana).
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal ("monoclonal antibody").
<b>MACs</b>	Moléculas de adhesión celular.
<b>MEC</b>	Matriz extracelular.
<b>mg</b>	Miligramos ( $1 \times 10^{-3}$ gramos).
<b>MHC-I y II</b>	Complejo principal de histocompatibilidad I y II ("major histocompatibility complex- I and II").
<b>min</b>	Minuto(s).
$\mu$ l	Microlitros ( $1 \times 10^{-6}$ litros).
ml	Mililitros ( $1 \times 10^{-3}$ litros).
<b>MMPs</b>	Metaloproteasas ("matrix metalloproteinases").
<b>MMP-1</b>	Metaloproteasa-1 o colagenasa intersticial.
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero (messenger ribonucleic acid).
<b>nm</b>	Nanómetros ( $1 \times 10^{-9}$ metros).

<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas ("platelet derived growth factor").
<b>PMNs</b>	Células polimorfonucleares.
<b>pvp</b>	Polivinilpirrolidona.
<b>RGD</b>	Secuencia de los aminoácidos Arginina-Glicina-Acido aspártico.
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante - beta ("transforming growth factor- $\beta$ ").
<b>TIMP-1</b>	Inhibidor tisular de metaloproteasas- 1 ("Tissue inhibitor of metalloproteinases 1").
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa ("tumor necrosis factor - $\alpha$ ").
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión celular vascular -1 ("vascular cell adhesion molecule-1").
<b>VLA-4</b>	Antígeno tardío de activación- 4 ("very late activation antigen -4"; integrina $\alpha 4\beta 1$ )

## RESUMEN

La reparación de un tejido requiere de una serie de procesos celulares y bioquímicos que culminan en la producción de una cicatriz íntegra y resistente. Por lo que los esfuerzos de la investigación básica, clínica y de la industria farmacéutica se han enfocado en optimizar la calidad y eficiencia de la cicatrización de heridas. Debido a ello, se evaluó el efecto de la colágena-polivinilpirrolidona (clg-pvp) como cicatrizante de heridas incisionales. Lo anterior se basa en las propiedades reguladoras que presenta el biofármaco sobre el proceso inflamatorio, ya que se ha demostrado que al usarse en el tratamiento de algunas patologías fibrosantes dérmicas induce una disminución de la expresión de algunas citocinas proinflamatorias/fibrogénicas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF), así como de moléculas de adhesión celular (VCAM-1, ELAM-1). Para este estudio se obtuvieron biopsias de piel de la parte anterior del brazo izquierdo de 11 voluntarios sanos, tratados según el Acuerdo de Helsinki y quienes otorgaron su consentimiento informado. Seis de estas heridas se trataron con 0.2 ml de clg-pvp (en solución amortiguadora de citratos) y las restantes con 0.2 ml de la solución amortiguadora de citratos (placebo). A los 7 días post-cirugía se tomaron 5 biopsias finales de las heridas cicatrizadas, de las cuales 3 correspondieron al tratamiento de clg-pvp y 2 al de placebo, mientras que a los 28 días post-cirugía se obtuvieron 6 biopsias: 3 de las heridas tratadas con clg-pvp y 3 con placebo. Los tejidos se procesaron para obtener cortes por congelación, los cuales se evaluaron con técnicas histológicas para evidenciar el arreglo de las fibras de colágena, elastina, así como el infiltrado inflamatorio (Técnicas de Herovici, de Verhoeff y Tricrómica de Massón, respectivamente). Por un método inmunohistoquímico (inmunoperoxidasa) se analizó el porcentaje de células reactivas a TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , PDGF-AB, VCAM-1, VLA-4, colagenasa intersticial (MMP-1) y su inhibidor (TIMP-1), tanto en vasos sanguíneos como en células dispersas. Los resultados mostraron que a los 7 días post-cirugía, la clg-pvp indujo una disminución de TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 en células dispersas mientras que a los 28 días, de PDGF-AB y TGF- $\beta$ 1 en vasos sanguíneos y células dispersas, respectivamente. Además, indujo una fibrogénesis moderada revelada por el arreglo de las fibras elásticas y de colágena, el cual es semejante al de la piel normal. Por otro lado, a los 7 días VLA-4 aumentó en vasos sanguíneos, mientras que VCAM-1 disminuyó en células dispersas, lo que correlaciona con una disminución de los infiltrados inflamatorios. La

colagenasa y su inhibidor no mostraron cambio en su expresión. En contraste, los individuos tratados con el placebo presentaron un arreglo histológico semejante al de una cicatriz normal (con distribución de fibras de colágena y elastina paralelas a la epidermis), con mayor infiltrado inflamatorio y haces gruesos de componentes fibrilares. En conclusión, la clg-pvp mejoró la calidad de la cicatriz y aceleró el proceso de la cicatrización.

## INTRODUCCIÓN

### LA PIEL

La piel es un órgano importante en los organismos vertebrados que poblamos la Tierra, ya que ella y sus derivados recubren la parte externa de la superficie corporal, siendo el órgano más grande del cuerpo, que en los seres humanos representa entre el 15 y el 20% de la masa corporal total. Así, la piel está formada por dos capas principales:

La EPIDERMIS, compuesta por un epitelio estratificado plano queratinizado, y ;

la DERMIS, compuesta por tejido conjuntivo.

También existe una zona denominada hipodérmis que contiene cantidades variables de tejido adiposo, tejido conjuntivo subcutáneo más laxo que la dermis y que yace por debajo de ésta.

Los derivados epidérmicos de la piel incluyen las siguientes estructuras orgánicas y productos tegumentarios:

Folículos pilosos y pelo.

Glándulas sudoríparas.

Glándulas sebáceas.

Uñas.

Glándulas apócrinas.

La piel tiene numerosas funciones esenciales relacionadas con su localización sobre la superficie externa del organismo. Entre ellas se incluyen (ROSS *et al*, 1997):

La **función de barrera** que protege contra agentes físicos, químicos y biológicos del medio externo.

La **función homeostática**, que contribuye a mantener constante el ambiente interno, al regular la temperatura corporal y evitar la deshidratación.

La **función sensorial**, que brinda información sobre el ambiente externo, por lo que es informativa y protectora al mismo tiempo.

La **función excretora**, a través de las glándulas sudoríparas, sebáceas y apócrinas.

Además, ciertas sustancias liposolubles se pueden absorber a través de la piel, y si bien no es una de sus funciones, esta propiedad puede representar ciertas ventajas para la administración de agentes terapéuticos. También, secreta las moléculas precursoras de la vitamina D, las cuales al recibir la radiación solar se convierten en las formas activas (ROSS *et al.* 1997).

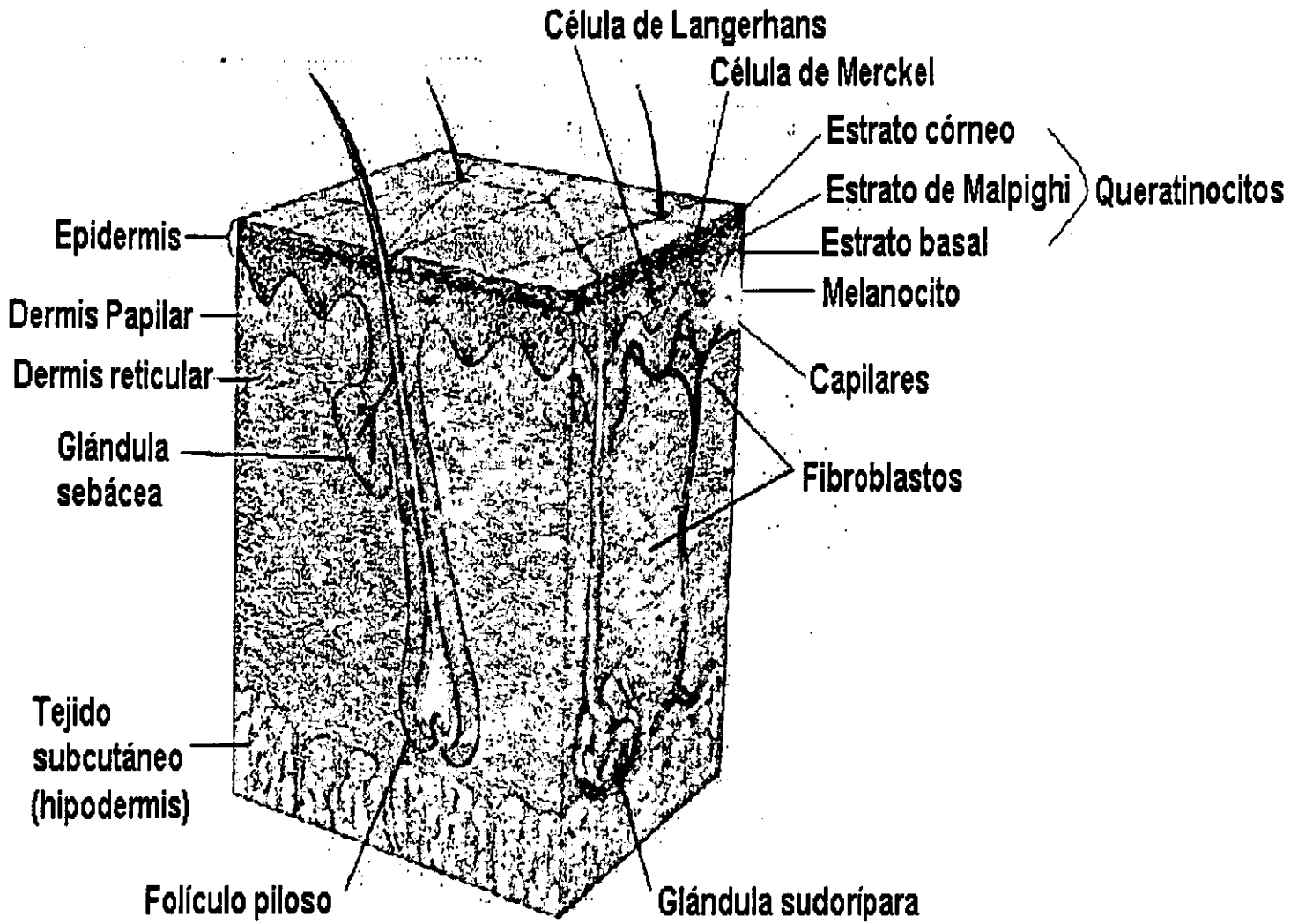
## LA EPIDERMIS

La epidermis está compuesta por epitelio plano estratificado queratinizado y se pueden identificar cuatro capas bien diferenciadas. En el caso de la piel gruesa, se observa una quinta capa. Así, de la capa más profunda hacia la superficie se tienen los siguientes estratos (**Fig 1**):

El **estrato basal**, también denominado estrato germinativo, representado por una única capa de células que descansa sobre la lámina basal que es una matriz extracelular especializada, que se organiza en delgadas y continuas capas que subyacen a las superficies y conductos epiteliales, compuesta fundamentalmente por colágena tipo IV, proteoglicanos y laminina. Éste estrato contiene las células madre o "stem cells" quienes dan origen a las células nuevas, los queratinocitos; por esta razón se le denomina estrato germinativo. Las células son de forma cuboide o cilíndrica, cuyos núcleos están muy agrupados entre sí. Esta característica, combinada con su citoplasma basófilo, imparte una notable basofilia al estrato basal (ROSS *et al.* 1997).

A medida que, por división mitótica, aparecen en esta capa los nuevos queratinocitos, éstos avanzan hacia la próxima capa y comienza el proceso de migración hacia la superficie.

El **estrato espinoso** tiene de 5 a 10 capas celulares. Las células son poligonales y presentan abundantes prolongaciones citoplasmáticas que se unen mediante uniones intercelulares denominadas desmosomas, a las similares de las células vecinas, por lo que debido a su aspecto se les denomina células espinosas. A medida que las células maduran y avanzan hacia la superficie, se hacen más planas y paralelas a ésta; especialmente las



**FIGURA 1. ESQUEMA DE PIEL** (Modificado de Green, 1991).

células espinosas más superficiales, donde los núcleos se hacen más alargados, en lugar de ovoides, a semejanza de la forma plana adquirida por la célula. Los espacios intercelulares contienen queratina y el cemento intercelular, que es una emulsión formada por proteínas, glicosaminoglicanos, ácidos grasos, entre otros (LEVER y SCHAUMBURG-LEVER, 1990).

El **estrato granuloso** es la capa más superficial de la porción no queratinizada de la epidermis. Esta capa varía entre una y diez células de espesor, siendo proporcional al espesor de la capa córnea (LEVER y SCHAUMBURG-LEVER, 1990). Y se le considera como la zona queratógena de la epidermis, debido a que sus células contienen abundantes gránulos queratohialinos de tamaño y forma variables, que almacenan proteínas ricas en histidina y cisteína, haciéndolos fácilmente visibles en los cortes histológicos debido a su intensa coloración basófila (LEVER y SCHAUMBURG-LEVER, 1990; ROSS *et al.* 1997).

A los tres estratos anteriores se les suele denominar como estrato de Malpighi, ubicándoseles como la epidermis nucleada y viable (LEVER y SCHAUMBURG-LEVER, 1990).

El **estrato lúcido** es considerado como una subdivisión del estrato córneo, que es más evidente en las áreas del cuerpo con piel gruesa, por ejemplo de las plantas de los pies y las palmas de las manos. Vista en el microscopio óptico presenta un aspecto refringente y se colorea poco, ya que contiene células eosinófilas en las cuales está muy avanzado el proceso de queratinización. El núcleo y los organelos citoplasmáticos se degradan y desaparecen a medida que la célula se llena gradualmente con la queratina intracelular (ROSS *et al.* 1997).

El **estrato córneo** es la capa que más varía en espesor, y es más ancha en la piel gruesa. El espesor de esta capa es la principal diferencia entre la epidermis de la piel fina y de la piel gruesa. Esta capa córnea se hace más gruesa en los sitios que son objeto de mayor fricción, como la formación de callos en las palmas de las manos y en los extremos de los dedos (ROSS *et al.* 1997).

Por lo general, hay una abrupta transición entre las células nucleadas del estrato granuloso y las células anucleadas, planas, desecadas y eosinofílicas del estrato córneo. La membrana plasmática de estas células queratinizadas está engrosada y recubierta, al menos en las porciones más profundas de la capa, por un glicolípido que representa el principal constituyente de la barrera contra el agua (LEVER y SCHAUMBURG-LEVER, 1990).



Cabe indicar que aún cuando los queratinocitos son la estirpe celular predominante de la epidermis, siendo los responsables de la queratinización, debido a la formación de los gránulos queratohialinos (LEVER y SCHAUMBURG-LEVER, 1990), también existen otros tipos celulares como los melanocitos, y aquellos que constituyen el grupo de las células dendríticas de la epidermis: las células de Langerhans y las células dendríticas indeterminadas (LEVER y SCHAUMBURG-LEVER, 1990; ROSS *et al.* 1997). Por su parte, los melanocitos epidérmicos están diseminados entre las células del estrato basal y su cantidad varía dependiendo de la región corporal y de la exposición continua a la radiación ultravioleta; debido a que producen melanina son responsables de la coloración de la piel junto con otros factores (ROSS *et al.*, 1997). Por otro lado, las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos que participan en la iniciación de las reacciones de hipersensibilidad cutánea por contacto, las cuales poseen un núcleo que se tiñe intensamente con hematoxilina y el citoplasma aparece claro. Y es más probable que se deriven inicialmente del mesénquima y que formen parte del sistema fagocítico mononuclear.

Las células de Merkel son células epidérmicas modificadas que se encuentran en el estrato basal, y son abundantes en la piel donde la percepción sensorial es aguda (LEVER y SCHAUMBURG-LEVER, 1990).

## LA DERMIS

La dermis está constituida por dos capas con estructuras diferentes: la papilar y la reticular. La **capa papilar**, más superficial, consiste en tejido conjuntivo laxo ubicado inmediatamente por debajo de la epidermis, caracterizado por fibras de colágena menos gruesas que las de la porción más profunda, y por fibras elásticas filiformes organizadas de una forma reticular e irregular. La capa papilar es más fina e incluye a las papilas y las crestas dérmicas. Contiene vasos sanguíneos que irrigan pero no penetran a la epidermis; además de prolongaciones nerviosas, algunas de las cuales finalizan en la dermis y otras perforan la lámina basal y penetran en el comportamiento epitelial, así, tanto los vasos sanguíneos como las terminaciones nerviosas sensoriales están muy concentradas, por lo que son muy visibles en las papilas dérmicas.

La **capa reticular** subyace a la capa papilar; su espesor varía en las distintas partes de la superficie corporal, pero siempre es considerablemente más gruesa y menos celular que la capa papilar. Se caracteriza por presentar haces gruesos e irregulares de fibras de colágena y fibras elásticas más gruesas. Ambos tipos de fibras no tienen una orientación aleatoria, sino que forman líneas regulares de tensión en la piel, denominadas líneas de Langer, por lo que las incisiones cutáneas paralelas a ellas se curan con cicatrices mínimas (ROSS *et al.* 1997).

Debajo de la dermis reticular existe una capa de tejido adiposo de espesor variable, la cual sirve como capa aislante y de almacenamiento de metabolitos de alta energía. Esta capa y el tejido conjuntivo laxo constituyen la **hipodermis**.

En la dermis, la estirpe celular predominante es una célula pleiomórfica denominada fibroblasto, siendo el responsable primario de la síntesis de colágena, glicosaminoglicanos y de elastina, entre otras. Donde los fibroblastos en estado de reposo o fibrocitos tienen escaso citoplasma y un núcleo que se tiñe con hematoxilina. Mientras que los fibroblastos activos poseen un núcleo oval y son descritos como estelados, pero pueden cambiar de forma, dependiendo de las circunstancias del entorno (PEACOCK y VAN WINKLE, 1970).

Sin embargo, en la dermis también se encuentran células endoteliales, formando los vasos sanguíneos, y melanocitos dérmicos caracterizados por ser células esteladas con largas prolongaciones y un núcleo también alargado, ubicados en determinadas regiones de la superficie corporal, siendo más abundantes en los sitios donde el tejido conjuntivo exhibe cierto grado de pigmentación.

## EL PROCESO DE LA CICATRIZACIÓN

Un gran número de especies de invertebrados y anfibios tienen la capacidad de restaurar el tejido dañado o perdido mediante una réplica exacta o casi exacta del tejido original, cuyo proceso se denomina regeneración. Sin embargo, a través de la escala evolutiva se ha perdido la capacidad de reparación tisular por medio de la regeneración, lo cual se evidencia en las diferentes especies de mamíferos. No obstante, existen órganos como el hígado o tejidos como el epitelio, que sí presentan esta capacidad reparativa (MAST y SCHULTZ, 1996).

Para el caso específico del daño tisular en mamíferos, la cicatrización se efectúa a partir de un rápido reemplazo del tejido dañado o perdido con una cicatriz de colágena que actúa

como una unión fibrosa ("fibrotic spot-weld") más que como una regeneración del tejido, proceso que en general se efectúa lentamente. Así, la cicatrización de las heridas de la piel, en los mamíferos, pudo haber evolucionado para minimizar las complicaciones que pusieran en riesgo la vida, tales como las infecciones, mediante la rápida reparación de la piel con una cicatriz fibrosa, aún cuando no semeje o se recupere su apariencia y función. Sin embargo, en algunas heridas, la reparación del daño se torna patológica al resultar en distorsiones fibrosas excesivas, ya sean de apariencia o de función (contracturas, cicatrices queloides o hipertróficas, etc.) o en el depósito insuficiente de tejido, condicionando así una herida crónica no reparada, como en el caso de las úlceras (MAST y SCHULTZ, 1996).

## **FASES DE LA CICATRIZACIÓN**

La cicatrización de la piel es un proceso biológico muy complejo donde diferentes estirpes celulares, además de moléculas como las citocinas, proteasas, y componentes de la matriz extracelular (MEC) participan de manera coordinada para restaurar la integridad del tejido dañado. De esta forma, durante la cicatrización ocurren procesos celulares, bioquímicos y moleculares en un tiempo continuo, los cuales para su estudio y descripción se acostumbra dividirlos en tres fases generales: (1) inflamación, (2) reparación, y (3) remodelación. Estas fases no suceden, necesariamente, una a continuación de la otra, pueden ser simultáneas en algún momento y la culminación de este proceso requiere de varios meses (MAST y SCHULTZ, 1996).

### **Inflamación**

El proceso de cicatrización comienza desde el momento en que se presenta un daño en el tejido, ya sea éste de origen intencional, como una incisión quirúrgica o circunstancial, como un trauma. De esta manera, los vasos sanguíneos dañados inician una cascada hemostática de coagulación sanguínea, agregación y desgranulación plaquetaria. El coágulo formado sella la herida protegiendo al organismo de la contaminación bacteriana y de la pérdida de fluidos. Lo más importante radica en la desgranulación de las plaquetas, porque genera el primer paso regulador en la reparación. Así, ocurre la liberación de moléculas contenidas en

los gránulos alfa de las plaquetas, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento semejante a insulina tipo I (IGF-I), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1), los cuales difunden rápidamente, del sitio de la herida, hacia los tejidos adyacentes y al torrente sanguíneo. El TGF- $\beta$ 1 liberado por las plaquetas y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), producido por las células endoteliales de los vasos sanguíneos, por los queratinocitos y fibroblastos del área dañada atraen, por quimiotaxis, células inflamatorias hacia la zona afectada. Así se inicia la fase de inflamación, cuyo pico máximo se presenta entre el segundo y tercer día posteriores al traumatismo (MOULIN, 1995).

La fase de inflamación aguda está caracterizada por la presencia abundante de neutrófilos; mientras que los macrófagos predominan después de las 24 horas. Los neutrófilos comienzan a fagocitar y destruir microorganismos, a secretar más citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  y algunas interleucinas), y a liberar proteasas (elastasa y colagenasa de neutrófilos) para remover los componentes dañados de la MEC. Esta actividad proteolítica temprana en la herida es muy distinta a la que se efectuará durante la fase de remodelación, donde participan las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) (MAST y SCHULTZ, 1996). Los monocitos circulantes son atraídos quimiotácticamente al interior de la herida, a través del efecto del TGF- $\beta$  o de fragmentos de fibronectina (FN), lo cual induce su diferenciación a macrófagos. Éstos también secretan citocinas pro-inflamatorias, incluyendo al TNF- $\alpha$  y a la interleucina-1 (IL-1), fagocitan y procesan microorganismos y sustancias antigénicas; además sintetizan y secretan otros factores (MAST y SCHULTZ, 1996), como el TGF- $\beta$ 1, TGF- $\alpha$ , PDGF, IL-1, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), y el factor de crecimiento epidérmico unido a heparina (HB-EGF) (MAST y SCHULTZ, 1996)

En condiciones normales, los neutrófilos desaparecen de la herida cerca del tercer día, tal vez a partir de un proceso de apoptosis, momento en que la inflamación aguda comienza a declinar. Sin embargo, los factores de crecimiento secretados por los macrófagos, localmente, en la herida continúan estimulando la migración de fibroblastos, células epiteliales, y células endoteliales vasculares hacia el sitio de la lesión iniciándose la siguiente fase (Fig 2).

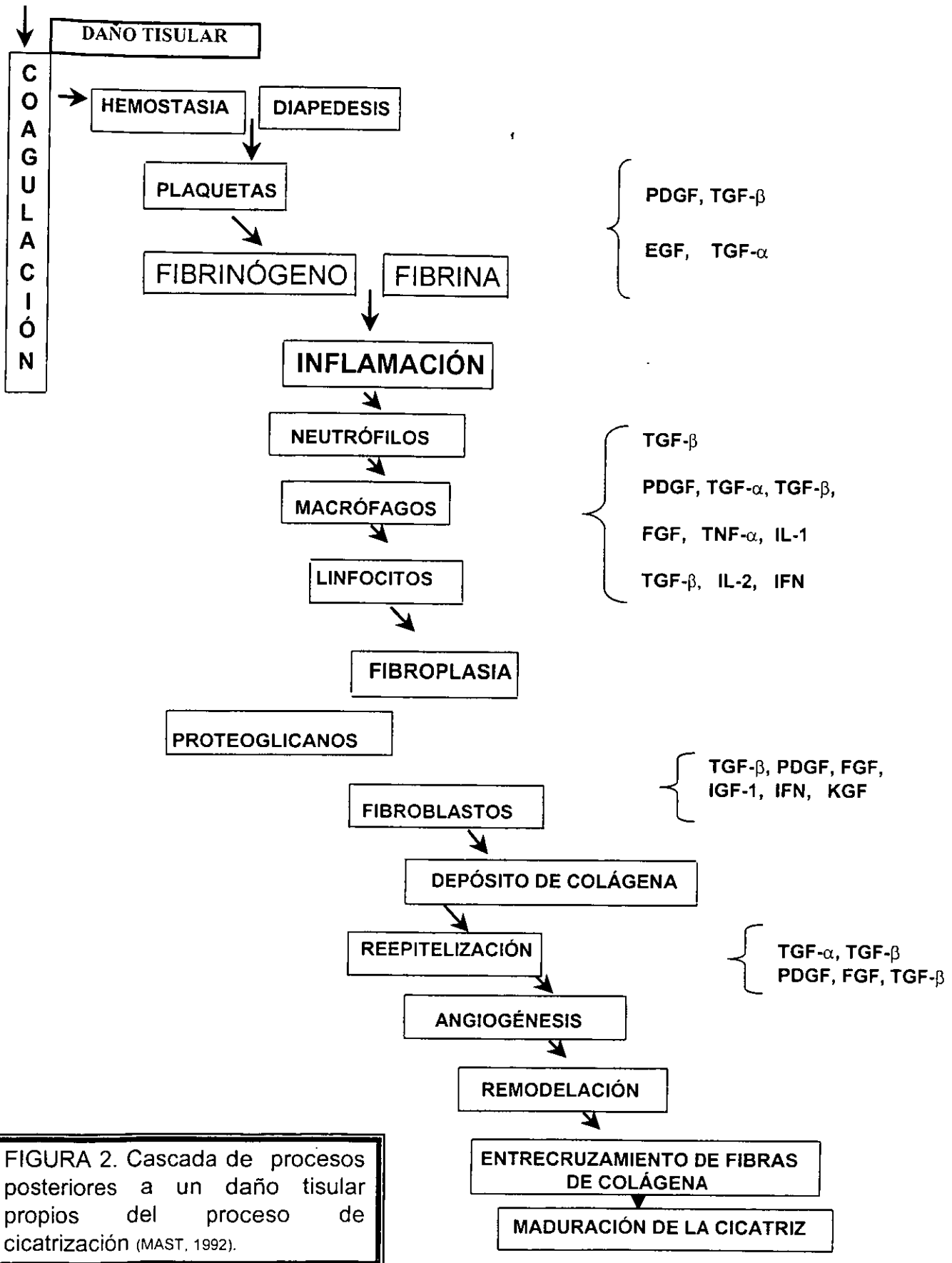


FIGURA 2. Cascada de procesos posteriores a un daño tisular propios del proceso de cicatrización (MAST, 1992).

## Reparación.

Durante la fase inflamatoria se forma una MEC provisional constituida principalmente de fibrina, fibronectina y glicosaminoglicanos, entre ellos el ácido hialurónico. Además, los fibroblastos de la dermis adyacente a la herida que no han sufrido ningún daño son estimulados por citocinas, los cuales comienzan a expresar receptores de tipo integrina que reconocen específicamente a la fibrina ( $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_3$ ). Estos fibroblastos migran hacia la matriz provisional de fibrina y fibronectina, al igual que las células endoteliales, de tal forma que al estar en contacto con dicha matriz, aumenta la celularidad como producto de su proliferación (MAST y SCHULTZ, 1996).

En la fase de reparación los macrófagos declinan paulatinamente, por lo que se reclutan otras estirpes celulares que sintetizan diversos factores de crecimiento. Los fibroblastos secretan IGF-I, bFGF, TGF- $\beta$ , PDGF y el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); las células endoteliales producen factor de crecimiento derivado de endotelina vascular (VEGF), bFGF y PDGF, y; los queratinocitos sintetizan TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 y KGF. Estos factores de crecimiento continúan estimulando la proliferación, la síntesis de proteínas de la MEC y la angiogénesis. Durante esta fase de reparación, que comprende generalmente varias semanas, la matriz provisional es reemplazada por una matriz permanente constituida principalmente de colágena, además de los glicosaminoglicanos y proteoglicanos tales como el sulfato de condroitina y el sulfato de dermatán, constitutivos de la matriz inicial (**Fig 2 y 3**).

## Remodelación

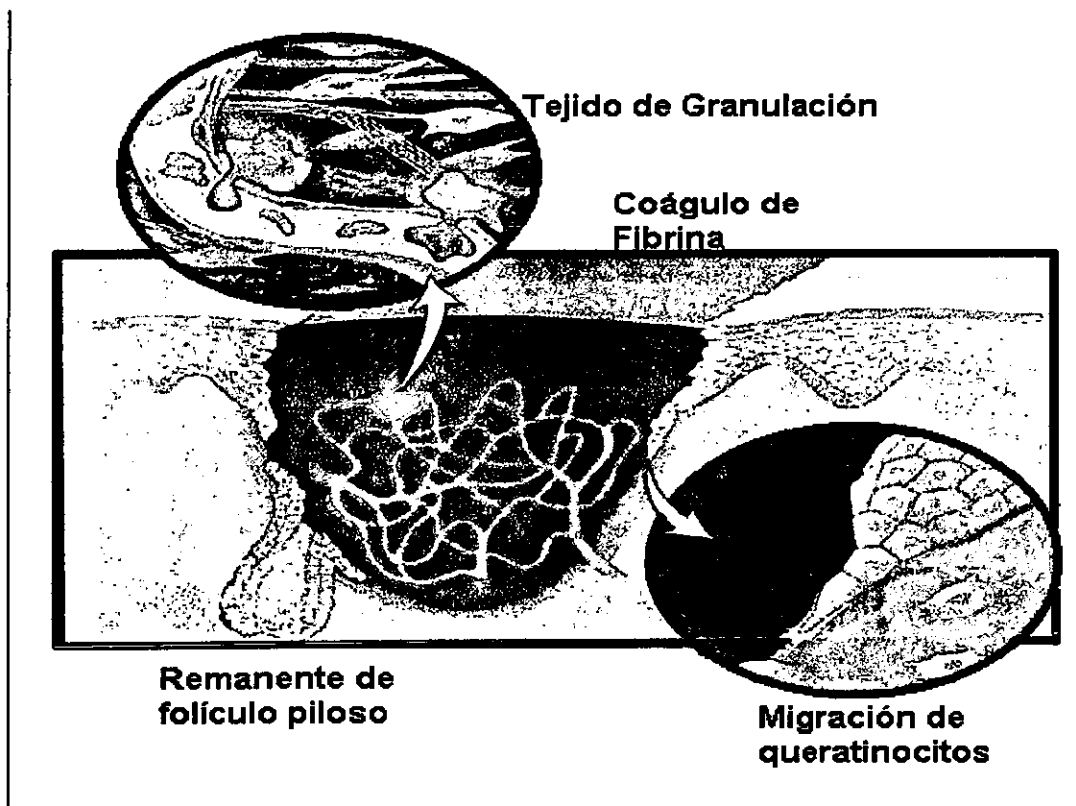
Después de la formación de la cicatriz inicial, culmina la proliferación y la neovascularización, de tal forma que la herida entra en una etapa de remodelación, la cual puede durar varios meses (MAST y SCHULTZ, 1996) (**Fig 2**), donde se alcanza un balance entre la síntesis de los nuevos componentes de la matriz cicatrizal y su degradación mediante las MMPs tales como la colagenasa intersticial, la gelatinasa y la estromelisinina (MAST y SCHULTZ, 1996).

En esta fase, los fibroblastos son los responsables iniciales de la síntesis de los componentes de la MEC (colágena, elastina y proteoglicanos), además también son una

fuente importante de MMPs que degradan dicha matriz y de sus inhibidores (TIMPs) (MAST y SCHULTZ, 1996).

Además, la angiogénesis termina y la densidad capilar en el sitio de la herida disminuye hasta estadios muy avanzados de la cicatrización y, eventualmente, el tejido cicatrizal alcanza el equilibrio, pero jamás una cicatriz madura se podrá comparar con una piel sin daño.

Así, para que una herida progrese de un coágulo gelatinoso hasta una herida reparada con una cicatriz fibrosa, es necesario que ocurran diversas interacciones entre citocinas pro-inflamatorias, proteasas, inhibidores y componentes de la MEC. Lo anterior propicia la regulación y mediación de la actividad celular y por último el depósito de matriz y el cierre de la herida (MAST y SCHULTZ, 1996).



**FIGURA 3.** Procesos clave en la cicatrización de una herida en piel. El área del daño es recubierta temporalmente por un coágulo de fibrina infiltrado por células inflamatorias, fibroblastos y un plexo capilar denso de tejido de granulación. La cubierta epidérmica se reconstituye desde los bordes de la herida y de los remanentes de folículos pilosos a través de la migración de los queratinocitos. Los monocitos migran de los capilares hacia el tejido de granulación. Modificado de Martin, 1997.

## EL PAPEL DE LAS CITOCINAS DURANTE EL PROCESO DE LA CICATRIZACIÓN

Debido a que el proceso de cicatrización es muy complejo, son necesarios varios mecanismos de regulación. Uno de éstos es la interacción de diferentes células que se comunican entre sí mediante contactos directos, célula-célula, célula-MEC o por medio de la secreción de citocinas. Es bien sabido que los fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos y células inflamatorias secretan un gran número de citocinas, en los procesos inmediato posteriores a un daño tisular, cuya acción puede ser sinérgica en cada una de las fases de la cicatrización. De esta manera, la regulación del metabolismo del tejido conjuntivo por medio de las citocinas es de gran importancia para una adecuada cicatrización, además de ser responsables de la regulación de la adhesión, migración y proliferación celulares.

Aún cuando las citocinas son un grupo heterogéneo de moléculas solubles de naturaleza glicoproteica (monocinas, linfocinas, interleucinas, quimiocinas, factores de crecimiento e interferones) éstas moléculas poseen ciertas propiedades en común: son de bajo peso molecular (7-60 kD); son producidas durante la fase de activación y efectora de la respuesta inmune innata y específica, sirven para mediar y regular las respuestas inmunes e inflamatorias; actúan de forma autocrina, paracrina y/o endocrina; su secreción es breve y limitada; muchas citocinas son producidas por diversos tipos celulares; son pleiotrópicas, es decir actúan sobre diferentes tipos celulares; a menudo tienen diversos efectos en la misma célula blanco; influyen en la síntesis de otras citocinas; pueden actuar de manera sinérgica o antagónica; inician su acción al unirse a receptores específicos en la superficie de células blanco; a concentraciones nano o picomolares regulan el crecimiento, la morfología, migración, etc. La expresión de muchos receptores de citocinas está regulada por señales específicas, y muchas respuestas celulares a citocinas requieren de la síntesis *de novo* de mRNA y proteínas (ABBAS *et al.* 1994).

### FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA (TNF- $\alpha$ )

El mRNA del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  humano de 1.7 kb se traduce en una proteína transmembranal de 233 aa (26 kD). El TNF- $\alpha$  maduro es una proteína ácida y no glicosilada de 156 aa, 17 kD y un punto isoeléctrico cercano a 5, que posee un enlace



disulfuro intramolecular sencillo (GÜNTER *et al.* 1994). La molécula circulante, consiste en la asociación no covalente de 3 monómeros formando un homotrímero compacto y estable de 51 kD (ABBAS *et al.* 1994; GÜNTER *et al.* 1994).

El efecto del TNF- $\alpha$  se inicia tras la unión con sus receptores (TNFRs), de los cuales se conocen dos, uno de 55 y otro de 75 kD, codificados por genes diferentes. Su afinidad a ellos es muy baja, sin embargo, esta citocina se sintetiza en grandes cantidades y puede saturar a sus receptores fácilmente (ABBAS *et al.* 1994).

Existe un gran espectro de estirpes celulares productoras de TNF- $\alpha$ , tanto hematopoyéticas, siendo la principal la de monocitos/macrófagos, como no hematopoyéticas, por ejemplo la de los fibroblastos y queratinocitos (GÜNTER *et al.* 1994; RAPALA *et al.* 1997). Así, los efectos del TNF- $\alpha$  dependen del tipo celular, la concentración y su interacción con otras citocinas.

## INTERLEUCINA -1 (IL-1)

Existen dos clases de moléculas de interleucina-1, la IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , cada una codificada por un gen diferente, con el 26% de homología pero que se unen a receptores de superficie celular comunes (MAUCH *et al.* 1994; CORK y DUFF, 1994). Ambos polipéptidos están involucrados en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias (CORK y DUFF, 1994). Las dos isoformas de IL-1, altamente conservadas entre las especies, se traducen inicialmente como precursores de 31 kD (pro IL-1) las cuales son escindidas mediante proteasas en la porción del C-terminal para producir la IL-1 madura de 17 kD. Ambas formas maduras son biológicamente activas, sin embargo, también lo es la pro IL-1 $\alpha$ , mientras que la pro IL-1 $\beta$  presenta muy poca actividad (CORK y DUFF, 1994; ABBAS *et al.* 1994). La IL-1 $\beta$  es la forma activa que se encuentra más comúnmente en circulación (ABBAS *et al.* 1994).

Existen dos receptores de IL-1 (IL-1R). El IL-1R1 que es una glicoproteína de 80 kD que se encuentra en células T, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, sinoviocitos, condrocitos y hepatocitos. En tanto que el IL-1R2 tiene un peso molecular de 68 kD y se le encuentra en células B, neutrófilos y células de la médula ósea. Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y existe un 28% de homología en sus dominios extracelulares (CORK y DUFF, 1994).

## Acción conjunta del TNF- $\alpha$ y la IL-1 $\beta$

La aparición de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  durante el proceso de cicatrización es temporalmente distinta, pues sus picos máximos se alcanzan al día 3 y 8 respectivamente, además combinada con el hecho de que la síntesis de IL-1 $\beta$  es inducida por el TNF- $\alpha$  en fibroblastos humanos, provee evidencia sólida acerca de la participación del TNF- $\alpha$  en la iniciación de la cascada pro-inflamatoria y la inducción de la síntesis de IL-1 $\beta$  durante la cicatrización (MAST *et al.* 1996).

La aplicación exógena de TNF- $\alpha$  (0.6 a 20 ng) en heridas regula moderadamente la síntesis de la colágena, evidenciado por una disminución del 50% en los niveles de hidroxiprolina, contribuyendo a una cicatrización de mejor calidad. De esta forma, las inyecciones de TNF- $\alpha$  evitan en un 40% el aumento de hidroxiprolina inducido por el TGF- $\beta$  (MAST y SCHULTZ, 1996). Por lo tanto, los niveles bajos de TNF- $\alpha$  ( $\leq 100$  ng) producidos por el tejido de granulación en heridas de piel sin infección, pueden mejorar la cicatrización, pero su exposición a niveles elevados (50,000 ng) reduce la resistencia de la herida a la tensión. Esto puede deberse a la inducción de MMPs y a una abrupta disminución de la síntesis del mRNA de procolágena y de la proteína, esta última relacionada con una posible regulación postraduccional, tal como una disminución de la hidroxilación de sus aa prolina y lisina (MAST y SCHULTZ, 1996).

Por otro lado, el TNF- $\alpha$  regula de manera positiva su propia síntesis en macrófagos y también induce la producción de IL-1 que puede actuar sinérgicamente con él para modular la síntesis de colágena, MMPs y TIMPs. La autoinducción de TNF- $\alpha$  prolonga y aumenta sus efectos durante la fase temprana de la herida, además de que éste como la IL-1 $\beta$  son mitogénos de fibroblastos. Sin embargo, a pesar de los efectos benéficos de los niveles bajos de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en la cicatrización de heridas, se continúa especulando que éstos pueden promover la fibrosis de manera indirecta y un nivel bajo de inflamación en enfermedades, tales como la fibrosis pulmonar, escleroderma, artritis reumatoide y cirrosis hepática (MAST y SCHULTZ, 1996). Asimismo, la modificación del depósito de matriz durante la reparación tisular, puede llevarse a cabo por la presencia de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ya que estimulan directamente la síntesis de MMPs por fibroblastos, células inflamatorias, epiteliales y endoteliales; mientras que disminuye simultáneamente la síntesis de TIMPs; mostrándose así, que esta regulación sobre las MMPs y los TIMPs tiene efectos secundarios sobre el

metabolismo del tejido conjuntivo, como por ejemplo, en el recambio de la colágena (MAST y SCHULTZ, 1996; RAPALA et al. 1997).

Ambas citocinas aumentan la mitosis de fibroblastos (MAST y SCHULTZ, 1996), y en éstos la IL-1 además estimula la producción de PDGF (CORK y DUFF, 1994). Se ha reportado que la IL-1 $\beta$  aumenta la proliferación de las células de músculo liso y de las células endoteliales, además de ser un quimioatrayente de neutrófilos y macrófagos. Su aplicación en heridas agudas infectadas de ratas, promueve un aumento significativo de la cicatrización; tal vez debido a que se incrementa la síntesis de MMPs en fibroblastos y macrófagos y/o a la disminución de la síntesis de colágena. Lo anterior fue reproducible en un estudio de fase II, aleatorio, con placebo, doble ciego; tras la aplicación diaria de 0.5 mg de IL-1 $\beta$  en heridas quirúrgicas realizadas en voluntarios sanos, donde las heridas tratadas cicatrizaban más rápido, independientemente de la dosis con respecto a las placebo (MAST y SCHULTZ, 1996).

## FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- BETA 1 (TGF- $\beta_1$ )

El TGF- $\beta$  representa a una familia de gran homología de, por lo menos, 5 polipéptidos homodiméricos que comparten muchas actividades biológicas y son parte de una superfamilia (WAHL, 1994). Las isoformas del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) son sintetizadas como precursores de 390 a 412 aa con una secuencia señal hidrofóbica de 20 a 30 aa en el amino-terminal. Después de la degradación proteolítica, el TGF- $\beta$  es procesado a la forma de 12.5 kD, la cual dimeriza con otra similar para generar el TGF- $\beta$  activo de 25 kD que permanece asociado a un complejo latente mediante una proteína de unión. Este complejo es incapaz de unirse al receptor del TGF- $\beta$  por lo que debe disociarse de la proteína para activarse totalmente, lo cual se logra mediante acción proteolítica o bajo condiciones ácidas (MAUCH et al. 1994; WAHL, 1994). Este TGF- $\beta$  activado presenta diversos efectos en diferentes tipos celulares, dependiendo de la cantidad del factor presente (MAUCH et al. 1994), así como de su interacción con otras citocinas.

Así, el TGF- $\beta$  es un factor regulador multifuncional de efectos pleiotrópicos (una gran diversidad de diferentes efectos) sobre la diferenciación, crecimiento, morfogénesis y cicatrización. Es liberado por los gránulos alfa de las plaquetas humanas cuando éstas se

agregan en el sitio de la herida, aunque también otros tipos celulares lo sintetizan y secretan, como los linfocitos T y B, macrófagos, fibroblastos, células renales y tumorales (MAUCH *et al.* 1994; WAHL, 1994); promueve el depósito de matriz *in vivo*, al estimular la síntesis de colágena tipo I y III, fibronectina y glicosaminoglicanos (RAGHOW *et al.* 1987), y puede acelerar la cicatrización en heridas dérmicas en algunos modelos animales; pero a concentraciones locales elevadas produce desórdenes fibroproliferativos (WAHL, 1994; MESSADI *et al.* 1998). Al expresarse localmente, incrementa la angiogénesis, la quimiotaxis de neutrófilos, macrófagos y fibroblastos, la adhesión y activación de leucocitos (WAHL, 1994). Basado en su capacidad para regular el crecimiento celular, el depósito y degradación de la MEC y las respuestas inflamatorias, así como del proceso de señalización intracelular mediado por integrinas (ROBERTS *et al.* 1992; WAHL, 1994), el TGF- $\beta$  tiene gran importancia en la inmunobiología de muchos tejidos, incluida la piel (WAHL, 1994).

## FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

El PDGF está constituido por dos cadenas peptídicas codificadas por diferentes genes, denominadas A y B, de aproximadamente 16 y 14 kD, respectivamente, y con 60% de homología en sus residuos de aminoácidos. Con dichas cadenas se pueden generar tres isoformas de 30 kD: el heterodímero PDGF-AB y los homodímeros PDGF-AA y PDGF-BB, tales dímeros se encuentran unidos mediante enlaces disulfuro (HELDIN *et al.* 1990; ANSEL *et al.* 1994). Cabe indicar que el dímero PDGF-BB está asociado predominantemente a la membrana celular, mientras que el PDGF-AA se secreta libremente (ANSEL *et al.* 1994).

Existen múltiples niveles de control de la producción celular del PDGF, como el transcripcional, la síntesis alternativa de mRNA, la composición y procesamiento de los dímeros, así como la interacción con proteínas de unión y/o con la MEC, degradación proteolítica y especificidad de la distribución y expresión del receptor del PDGF en sus células blanco (ANSEL *et al.* 1994).

El PDGF activa a las células blanco a partir de la unión, de alta afinidad, con sus receptores, los cuales pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas; cuyo receptor maduro de alta afinidad consiste de dos péptidos denominados subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor, de 170

y 190 kD respectivamente. Y también existen las 3 isoformas posibles del receptor dimérico, donde la subunidad  $\alpha$  tiene aproximadamente 40% de homología con la subunidad  $\beta$  (ROSS y RAINES, 1990; ANSEL *et al.* 1994). Entonces el PDGF-BB puede unirse a cualesquiera de las tres combinaciones de las subunidades del receptor ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\beta$ ); el PDGF-AB puede unirse tanto al receptor  $\alpha\alpha$  como  $\alpha\beta$  y; el PDGF-AA sólo puede unirse al receptor  $\alpha\alpha$  (ANSEL *et al.* 1994).

Además, el PDGF es un regulador peptídico ubicuo en los tejidos mesenquimáticos, sin embargo, su nombre se debe a que se aisló originalmente de plaquetas, también puede ser sintetizado y secretado por una gran variedad de tipos celulares incluyendo células endoteliales, fibroblastos, células de músculo liso, macrófagos, monocitos, astrocitos, células gliales, queratinocitos y células neoplásicas (ROSS y RAINES, 1990; ANSEL *et al.* 1994). En procesos cicatrizales es un potente quimioatrayente para neutrófilos, monocitos y fibroblastos estimulando en éstos la síntesis de fibronectina, colagenasa y otros factores de crecimiento (PIERCE *et al.* 1989; MAUCH *et al.* 1994). También es el principal mitógeno para células de tejido conjuntivo en cultivo (HELDIN *et al.* 1990; MAUCH *et al.* 1994). Otra de sus propiedades biológicas es la inducción de la migración celular, la vasoconstricción, modula la producción de citocinas de la célula T y activa células del mesénquima, para secretar componentes de la MEC, tanto colágena como colagenasa, mediando los procesos de cicatrización y reparación tisular (ANSEL *et al.* 1994). También cabe decir que muchas enfermedades fibroproliferativas pueden estar asociadas con el PDGF, al inducir la expresión de otras citocinas fibrogénicas.

## **MÓLECULAS DE ADHESIÓN CELULAR PARTICIPANTES EN EL PROCESO CICATRIZAL**

A partir de que se desencadena una respuesta inmune y un proceso inflamatorio, se suscitan varios cambios en los leucocitos (ROSALES y JULIANO, 1995), y en los monocitos (YUROCHKO *et al.* 1992) que les permiten adherirse al endotelio vascular para poder migrar, a través de los tejidos, hacia los focos inflamatorios, ya que normalmente transitan libremente por el torrente sanguíneo. Tales cambios comprenden la expresión de diversas moléculas de adhesión celular (MAC). Inicialmente las células mononucleares y polimorfonucleares interactúan con

las MACs pertenecientes a la familia de las selectinas, provocando su lento rodamiento por las paredes de los vasos sanguíneos, momento en el cual se induce la activación de las integrinas, que median la migración transendotelial y a través del tejido conjuntivo, hacia los sitios inflamados. Estas interacciones de las células inflamatorias (CI) con otras células y componentes diversos de la MEC producen respuestas celulares diferentes que contribuyen al control de la inflamación y, en consecuencia, al proceso de cicatrización.

## VCAM-1 Y VLA-4

Las células endoteliales vasculares delimitan la luz de los vasos sanguíneos y normalmente exhiben una baja afinidad por los leucocitos circulantes. Sin embargo, la liberación de citocinas en los sitios de inflamación provoca su activación que lleva a la expresión elevada de antígenos en su superficie celular (ELICES *et al.* 1990).

Muchos de los receptores de superficie celular que median el contacto célula-célula, son coestimuladores del proceso de activación celular y colaboran para que se expresen diversas funciones efectoras de las células. Otros receptores modulan el contacto célula-MEC y el reconocimiento de sus ligandos ha permitido dilucidar por qué las células mononucleares se anclan en un determinado tejido, constituyendo un foco inflamatorio. Así, las uniones establecidas entre célula circulante-célula del endotelio vascular, CI-MEC y CI-CI se llevan a cabo por las interacciones intermoleculares de las distintas moléculas de adhesión celular y sus ligandos (LAFFÓN, 1992). Las cuales se agrupan en tres familias: La familia de las **integrinas**, importante para la regulación dinámica de la adhesión y migración; la superfamilia de las **inmunoglobulinas**, que incluye los receptores antígeno-específicos de los linfocitos T y B; y las **selectinas** que tienen una importancia crucial en la interacción entre linfocitos y neutrófilos con las células del endotelio vascular.

**La familia de las integrinas** son un grupo de 21 glicoproteínas que se agruparon a partir de la homología estructural que existe entre determinados receptores leucocitarios de adhesión y otras moléculas de superficie encargadas de la adhesión célula-MEC (LAFFÓN, 1992; HYNES, 1992). Una propiedad clave de las integrinas es que pueden asumir múltiples estados funcionales, aunque se desconocen muchos de los factores celulares que controlan estas

actividades (MASUMOTO y HEMLAR, 1993); tienen amplia distribución celular y un alto grado de conservación a través de la evolución (ELICES *et al.* 1990).

Estructuralmente, son heterodímeros compuestos de dos cadenas polipeptídicas transmembranales denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  que están asociadas de forma no covalente (**Fig 4**).

Debido a que la subunidad  $\beta$  puede asociarse con diferentes subunidades  $\alpha$ , su clasificación se basa en tres subfamilias (LAFFÓN, 1992; ELICES *et al.* 1990):

- 1)  $\beta 1$  o VLA ("very late activation antigens") compuesta por una subunidad  $\beta 1$  común y una de 8 subunidades  $\alpha$  diferentes ( $\beta 1/\alpha 1-8$ ,  $\alpha V$ );
- 2)  $\beta 2$  o integrinas específicas leucocitarias, formada por una subunidad  $\beta 2$  común y tres subunidades  $\alpha$  diferentes ( $\beta 2/\alpha L$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha X$ );
- 3)  $\beta 3$  o citoadhesinas ( $\beta 3/\alpha IIb$ ,  $\alpha V$ ).

Las subunidades  $\alpha$  son glicoproteínas transmembranales con un dominio extracelular cuya porción N-terminal contiene 7 secuencias repetidas homólogas de aproximadamente 60 residuos de aa. El dominio citoplásmico posee entre 15 y 53 aa, para  $\alpha-IIb$  y  $\alpha-L$ , respectivamente (LAFFÓN, 1992). Su peso molecular varía de 120 a 180 kD (HYNES, 1992).

Las diferentes subunidades  $\beta$  ( $\beta 1-8$ ) son glicoproteínas transmembranales de entre 90 y 110 kD (HYNES, 1992), con dominios extracelulares de 700 a 730 residuos de aminoácidos. La porción citoplásmica interacciona con el citoesqueleto y parece que también interviene en la señalización intracelular (LAFFÓN, 1992).

Particularmente, las moléculas de la subfamilia  $\beta 1$  ó VLA se expresan en gran número de estirpes celulares y se conocen al menos 9 heterodímeros, la mayoría de los cuales son receptores para proteínas de la MEC, como la FN, laminina y colágena en células de tejido conjuntivo y leucocitos (SONNENBERG, 1993; GAU e ISSEKUTZ, 1997; SHANG *et al.* 1998). VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ ) es una integrina de amplia distribución celular que se expresa en la superficie de linfocitos T y B, monocitos, timocitos, eosinófilos y basófilos (GARCÍA, 1992; LAFFÓN, 1992). La FN es uno de sus ligandos naturales, reconoce el segmento CS-1 peptídico en una forma de empalme alternativo (ELICES *et al.* 1990; PULIDO *et al.* 1991; MASUMOTO y HEMLER, 1993; CHULUYAN *et al.* 1995; GAU e ISSEKUTZ, 1997; SHANG *et al.* 1998); así como la laminina y la colágena y la MAC perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, VCAM-1.

Además, VLA-4 contribuye a la agregación celular de leucocitos, a través del traslape de los epítomos de los sitios de unión a FN y VCAM-1, lo anterior demostrado mediante el empleo de un mAb anti-epitopo B2 de  $\alpha_4$  que induce la agregación de células homotípicas y puede también inhibir la unión celular a FN y VCAM-1 (PULIDO *et al.* 1991).

Por otro lado, cuando VLA-4 reconoce a VCAM-1 se produce una agregación homotípica entre leucocitos, citólisis de células "blanco" por parte de células T citotóxicas y adhesión de leucocitos a células del endotelio vascular activado por citocinas.

También, la activación de linfocitos conduce a un aumento en la expresión de LFA-1 y VLA-4 y, en células T, de VLA-1 y VLA-2. Además, se producen cambios conformacionales hacia las formas activas de VLA-4, VLA-5 y VLA-6 que incrementan la especificidad y afinidad por sus respectivos ligandos celulares o proteínas de la MEC.

De esta manera, los linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos utilizan VLA-4 para unirse a VCAM-1, ésta inducida en la superficie de células endoteliales en cultivo después de 2 a 4 horas tras el estímulo con IL-1 y TNF- $\alpha$  (GARCÍA, 1992). Sin embargo, con EDTA se pueden inhibir casi completamente las funciones de adhesión de las integrinas, lo cual demuestra que son moléculas que requieren de cationes divalentes para llevar a cabo la función de adhesión; la naturaleza de los cationes puede afectar tanto la especificidad como la afinidad por los ligandos (HYNES, 1992). Para el caso de VLA-4, sus actividades para los dos ligandos son muy semejantes, de tal forma que existe una diferencia en la dependencia a cationes divalentes entre VCAM-1 ( $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ ) y el péptido CS-1 de la FN ( $Mg^{2+}$ ). Esto indica que cambios fisiológicamente relevantes en las concentraciones de iones calcio y magnesio pueden regular la especificidad de VLA-4 por sus ligandos. En condiciones normales, la concentración del  $Mg^{2+}$  excede aproximadamente 15 veces a la del  $Ca^{2+}$  intracelular, pero el calcio predomina extracelularmente. Sin embargo, bajo condiciones de daño tisular se puede desencadenar la liberación de  $Mg^{2+}$  intracelular o quelación del  $Ca^{2+}$  extracelular, alterándose así radicalmente el balance normal. Consecuentemente, se puede facilitar la unión de VLA-4 a FN, mientras que puede no afectarse la adhesión a VCAM-1, siendo claro que la adhesión a FN está regulada, por la presencia de cationes divalentes, y esto quizá sea suficiente para controlar la interacción con VLA-4 constitutivamente activo. Así, la adhesión de VLA-4 al péptido CS-1 puede inhibirse más fácilmente que la interacción con VCAM-1. No existe similitud de secuencias de residuos de aminoácidos entre los sitios de unión a VLA-4 en FN



(una secuencia EILDVPST), y en VCAM-1 (en dominios 1 y 4) (HYNES, 1992; MASUMOTO y HEMLER, 1993), sin embargo, se sabe que las últimas 3 ó 4 secuencias repetidas de las siete existentes en las subunidades  $\alpha$ , con secuencias DxDxDGxxD contribuyen en las propiedades de unión del catión divalente de estas subunidades al formarse el heterodímero (HYNES, 1992). También cabe destacar que la actividad de VLA-4 para unirse a sus ligandos varía dependiendo de la estirpe celular.

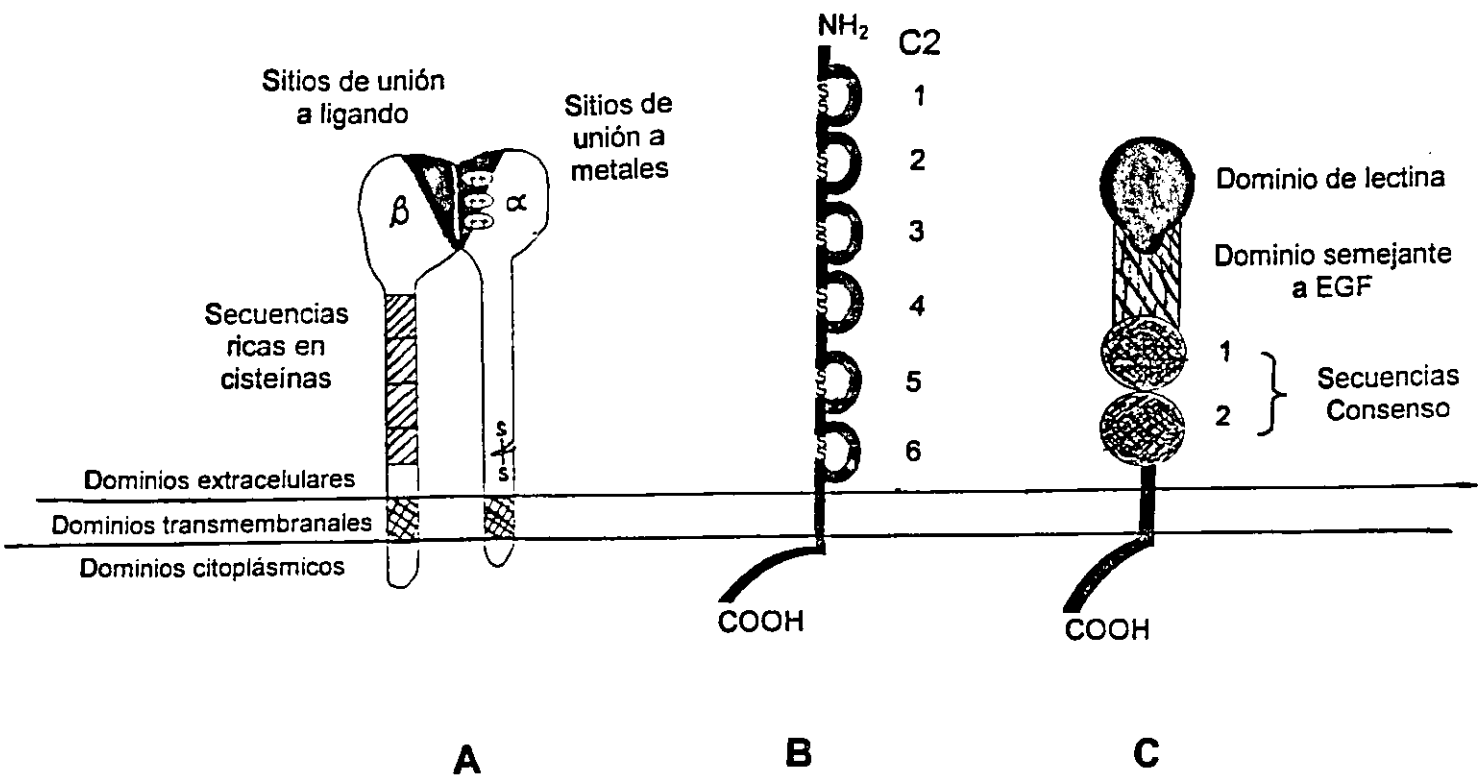


FIGURA 4. Moléculas de adhesión celular (MAC). **A.** Subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  características de las MAC pertenecientes a la familia de las integrinas. **B.** Estructura de la MAC perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, constituida por unidades homólogas semejante a la Ig de la subclase C2. **C.** MAC perteneciente a las selectinas caracterizada por el dominio de lectina y el semejante a EGF, con número variable de secuencias consenso (HYNES, 1992; VESTWEBER, 1993; DeLISSER *et al.* 1993).

Por otro lado, **la superfamilia de las inmunoglobulinas** está formada básicamente por el receptor de la célula T (TcR), receptor de la célula B, las moléculas del MHC de clase I y II, las moléculas CD4, CD8, LFA-2 (CD2), LFA-3 (CD59), ICAM-1 (CD54), ICAM-2, VCAM-1 y CD31 (LAFFÓN, 1992)(Fig 4).

VCAM-1 es una molécula de adhesión expresada *in vitro* en las células del endotelio activado por citocinas e *in vivo* en las células del endotelio vascular inflamado, así como en células dendríticas y en macrófagos de otros tejidos normales e inflamados. Actúa como molécula de adhesión para leucocitos que expresan su contrarreceptor VLA-4, y como transductora de señales (PEPINSKY *et al.* 1992), es quimiotáctica y haptotáctica en células de endotelio alto de vena umbilical (HUVECs), de la microvasculatura dérmica (HMVECs) y en la MEC (KOCH *et al.* 1995).

VCAM-1 mantiene la adhesión no sólo de monocitos, sino también de linfocitos, eosinófilos, basófilos, células NK y de células tumorales y media la migración dependiente de VLA-4 en algunas de estas células (PEPINSKY *et al.* 1992; CHULUYAN *et al.* 1995).

Cabe señalar que la secuencia peptídica de VCAM-1 está altamente conservada entre las especies (PEPINSKY *et al.* 1992). Sin embargo, puede expresarse en las células endoteliales en dos isoformas obtenidas por empalme alternativo de su mRNA. La forma principal (VCAM-7D) tiene siete dominios de homología con las inmunoglobulinas y dos sitios de unión homólogos para VLA-4; mientras que la isoforma (VCAM-6D) pierde el cuarto dominio funcional, dejando sólo un sitio de unión simple para VLA-4. Además, existen 2 regiones de VCAM-1 localizados en los dominios 3-4 y otro en el 5, que son muy sensibles a proteólisis

El dominio 1 y 3 son suficientes para su función adhesiva y su capacidad para iniciar la activación de las células T (PEPINSKY *et al.* 1992; CHULUYAN *et al.*, 1995). Posiblemente los 3 primeros dominios (y quizá sólo los dos primeros dominios NH- terminales) de VCAM-1 sean suficientes para efectuar, tanto la función de activación como la de adhesión celular dependiente de VLA-4 en linfocitos T (McEVER, 1992; PEPINSKY *et al.* 1992).

Para la migración de monocitos mediada por VLA-4 se requiere parcialmente de VCAM-1 en HUVECs, ya que inicialmente se induce por la acción de otros factores quimiotácticos, como la integrina  $\beta 2$  que se expresa en moléculas de superficie (CD11/CD18) en leucocitos (CHULUYAN *et al.* 1995). Resultando entonces que, la vía de migración VLA-4/VCAM-1 es

complementaria a la migración transendotelial del monocito efectuada mediante la interacción de los receptores CD11/CD18 con sus ligandos (McEVER, 1992; HOGG, 1993; CHULUYAN *et al.* 1995; SHANG *et al.* 1998). Sin embargo, los dominios 1 y 4 de VCAM-1 son necesarios para mediar la migración del monocito a través de HUVE activado con IL-1, por la vía del VLA-4; de tal forma que resulta, igualmente efectivo bloquear VLA-4 que los dominios 1 y 4 de VCAM-1 para impedir la migración. Además, es posible que no se requiera, en la mayoría de los fenómenos migratorios, la interacción de VLA-4 con el segmento CS-1 de FN o con las secuencias RGDs, conservadas evolutivamente en muchas de las moléculas de matriz (SONNENBERG, 1993; CHULUYAN *et al.* 1995); sin embargo, VLA-4 *in vivo* puede mediar la migración monocítica independiente de CD11/CD18 a un sitio de inflamación en el peritoneo, piel o en articulaciones artríticas.

De esta manera se ha reconocido que la migración de los leucocitos tiene un componente importante conferido por la célula endotelial. El mecanismo involucra la activación de esta estirpe celular por citocinas como la IL-1 y TNF- $\alpha$  o el lipopolisacárido de la endotoxina bacteriana (LPS). En este proceso, las células endoteliales sufren alteraciones funcionales profundas y expresan moléculas de adhesión para leucocitos, tales como la selectina-E, ICAM-1 y VCAM-1 (KRUTMANN, 1994). Estos estímulos no inducen directamente la migración de PMN, pero se ha demostrado que estos agentes de activación celular producen tal efecto en células endoteliales vasculares *in vitro* aumentando la adhesión y migración transendotelial de PMN (VONDEHEIDE y SPRINGER, 1992; CHULUYAN e ISSEKUTZ, 1993; KOCH *et al.* 1995; SHANG *et al.* 1998).

A pesar de que VLA-4 se expresa en precursores de PMN en la médula ósea, no se ha detectado en PMN de sangre periférica; sin embargo, se ha observado la expresión de niveles bajos de VLA-4 movilizado desde gránulos intracelulares a la membrana plasmática en PMN de sangre humana, a partir de una apropiada activación celular o durante la migración transendotelial (GAU e ISSEKUTZ, 1997). En ese sentido, VLA-4 puede incorporarse a gránulos intracelulares durante la maduración mielóide, donde estará disponible para cuando se requiera la adhesión y migración de PMN a través de las barreras del tejido conjuntivo (GAU e ISSEKUTZ, 1997)

*In vivo* la infiltración y la migración del monocito a través del endotelio activado por citocinas, ocurren rápidamente por lo que pueden estar actuando, simultáneamente, el mecanismo dependiente de la célula endotelial y el dependiente del factor quimiotáctico del monocito o el

independiente mediado por la inducción de la síntesis de factores quimiotácticos para PMN y monocitos, por parte de las células del tejido conjuntivo (CHULUYAN e ISSEKUTZ, 1993).

En la presencia de un endotelio activado, el complejo CD11/CD18 (integrina  $\alpha_{L,m,x}/\beta_2$ ) no se requiere para la migración mientras que, posiblemente, VLA-4 pueda participar como elemento de un mecanismo alternativo para la migración de monocitos, siendo VLA-4 necesaria en la migración de monocitos deficientes de CD11/CD18, pues no se inhibe tras la aplicación de un mAb anti-CD18 (CHULUYAN e ISSEKUTZ, 1993).

Cabe señalar que la presencia de una subunidad  $\alpha_4$  funcional es importante para la migración de PMN a través de la dermis humana, junto con VLA-5 y VLA-6 e integrinas  $\beta_2$  (CD18); aunque *in vitro* la migración de PMN a través de monocapas de fibroblastos es independiente de CD18 (GAU e ISSEKUTZ, 1997).

Entonces, es posible que al menos dos vías del VLA-4 estén implicadas en la migración de PMN, así como en la migración transendotelial del monocito mediada por esta integrina, que son VLA-4/CS-1 de la FN y VLA-4/VCAM-1 (GAU e ISSEKUTZ, 1997); en el último caso es destacable la buena correlación entre la expresión de VLA-4 y la unión a VCAM-1, pero posiblemente los leucocitos mononucleares positivos a VLA-4 regulen independientemente estas dos funciones adhesivas, durante una respuesta inflamatoria *in vivo*, siendo posible la unión al endotelio activado por medio del ligando celular (VCAM-1) o, alternativamente, a la FN depositada en los sitios de la inflamación (ELICES et al. 1990). Además, se ha comprobado que la interacción *per se* de VLA-4/VCAM-1 juega un papel importante en el desarrollo de algunas enfermedades como asma, alergia, artritis reumatoide, escleroderma, aterosclerosis y encefalomiелitis autoinmune (MASUMOTO y HEMLER, 1993), por lo que su bloqueo podría repercutir en la atenuación de la expresión clínica de tales patologías (WARD y MULLIGAN, 1994; CHIQUET-EHRISMANN, 1995).

Por su parte, **las SELECTINAS**, comparadas con las otras MACs se diferencian en dos aspectos: primero, las tres selectinas (L, E y P) están implicadas en la unión de los leucocitos (y algunas células metastásicas) a las células endoteliales vasculares, sin relacionarse con la morfogénesis de un organismo, y; segundo, funcionan como proteínas de unión a carbohidratos, en contraste con los miembros de las otras familias de MACs ya que lo hacen mediante una interacción proteína-proteína (VESTWEBER, 1992).

Así, las selectinas participan, tempranamente, en la cascada de procesos moleculares propios de la adhesión de los leucocitos con el endotelio vascular, haciéndose posible, posteriormente, su extravasación. En este sentido, las selectinas permiten la entrada de los neutrófilos y monocitos en los sitios de inflamación.

Por otro lado, su organización estructural es muy similar entre ellas, caracterizada por la existencia de un dominio de lectina sencillo en la posición N- terminal, que contiene al sitio de unión a carbohidratos, seguido por un dominio semejante al EGF y varias secuencias repetidas similares a las de proteínas de unión al sistema de complemento. Éstas secuencias varían de acuerdo a la proteína, así, la selectina-P tiene nueve, mientras que la selectina-E presenta seis y solamente dos se ubican en la selectina-L (VESTWEBER, 1992) (**FIG 4**).

## **COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR PARTICIPANTES EN EL PROCESO CICATRIZAL**

La MEC es un componente complejo supramolecular compuesto de fibras insolubles, microfibrillas y una amplia variedad de proteínas solubles. Su principal función es la de dotar a los tejidos de sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas específicas, además de proveer de un sustrato para la adhesión y la migración celular, así como de poseer un carácter informacional para las células (BATEMAN *et al.* 1996).

La composición de la MEC varía de acuerdo a los requerimientos funcionales de los tejidos (BATEMAN *et al.* 1996), pero también se presentan cambios en ésta debido a la exposición a agentes que la dañen o alteren, o por efecto del mismo proceso de reparación (LATHA *et al.* 1999). Pero a pesar de ello, las proteínas más abundantes de la MEC y, por ende, del cuerpo de los vertebrados son los miembros de la familia de la colágena, los cuales forman los elementos estructurales principales del tejido conjuntivo. Entre ellas, las más comunes son las colágenas tipo I, II y III que forman los paquetes fibrilares más grandes, en muchos de los tejidos. Sin embargo, el tejido conjuntivo no es homogéneo en composición y la expresión específica de muchas otras glicoproteínas resulta en sus características funcionales y biológicas. Dentro de estas otras proteínas constitutivas se incluyen los miembros de la

familia de los proteoglicanos, la elastina y los componentes asociados a las microfibrillas, fibronectina, trombospondina y otros componentes de matriz especializados, tales como la laminina, la tenascina, etc., además del glicosaminoglicano, ácido hialurónico (BATEMAN *et al.* 1996).

## LA SUPERFAMILIA DE LAS COLÁGENAS

El término colágena es usado genéricamente para denominar una amplia variedad de proteínas que forman las estructuras supramoleculares de la MEC y que poseen una conformación espacial de tres cadenas polipeptídicas enrolladas en una triple hélice característica. Se han identificado 19 tipos de colágena diferentes, comprendidas en al menos 33 cadenas polipeptídicas individuales distintas genéticamente (BATEMAN *et al.* 1996). Las colágenas tienen una estructura general de  $(\text{Gly-X-Y})_n$ , donde los otros residuos en la secuencia, X y Y, son frecuentemente los iminoácidos prolina e hidroxiprolina. El número de secuencias repetidas,  $n$ , varía dependiendo del tipo de colágena. En el caso de las colágenas formadoras de fibrillas, la secuencia (Gly-X-Y) que forma la hélice es continua, en aproximadamente 1000 residuos de aminoácidos (aa) de longitud de cada una de las tres subunidades de la molécula, mientras que las colágenas no fibrilares contienen comúnmente interrupciones de origen no colagénico en la secuencia helicoidal (BATEMAN *et al.* 1996).

Otra característica de las colágenas es la hidroxilación enzimática post-traducciona de los residuos de prolina y lisina, y la modificación adicional, por glicosilación, de algunas hidroxilisinias. Cabe indicar que la formación de la hidroxiprolina es importante debido a que estabiliza la estructura de la triple hélice de colágena, a partir del establecimiento de más puentes de hidrógeno (BATEMAN *et al.* 1996).

Los diferentes tipos de colágena muestran distribuciones tisulares específicas, y se pueden clasificar de acuerdo a sus características de organización en: colágenas formadoras de fibrillas, asociadas a fibrillas, no fibrilares, de la membrana basal, de fibrillas de anclaje y microfibrilares (BATEMAN *et al.* 1996) (TABLA 1).

TABLA 1. LA SUPERFAMILIA DE LAS COLÁGENAS

Tipo de colágena	Especies moleculares (cadenas)	Organización de agregados moleculares	Distribución	Función
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ $[\alpha 1(I)]_3$	Formadoras de fibrillas gruesas.	Todos los tejidos conjuntivos (piel, tendón, ligamentos, hueso, etc, excepto en membrana basal y cartilago hialino.	Soporte de fibras; provee fuerza tensil y resistencia tisulares; reconocida por receptores de tipo integrina y sindecanos de superficie celular.
II	$[\alpha 1(II)]_2$	Formadoras de fibrillas delgadas.	Cartilago hialino; otros tejidos cartilaginosos, discos intervertebrales, y humor vítreo.	Soporte fibrilar.
III	$[\alpha 1(III)]$	Formadoras de fibrillas delgadas.	Tejido conjuntivo, piel, tejidos vasculares, pulmón, hígado, músculo cardíaco, útero, etc.	Soporte de fibras pequeñas; forma copolímeros con la colágena tipo I.
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ $[\alpha 1(IV)]$	Capas en red (membrana basal).	Membranas basales.	Soporte en red; contiene múltiples sitios de unión.
V	$[\alpha 1(V)]$ $[\alpha 1(V)]_2, \alpha 2(V)$ $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	Formadora de fibrillas delgadas; puede formar moléculas con las cadenas tipo XI.	Todos los tejido conjuntivos, excepto las membranas basales; abundante en tejidos vascularizados y en el estroma de la córnea.	Fibras pericelulares pequeñas de soporte; posiblemente funciona como centro para moléculas de tipo I; <i>In vitro</i> interactúa con macromoléculas extracelulares como la trombospondina, heparina, decorina, biglicano y sulfato de heparán.
VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	Filamentos ó microfibrillas.	Esencialmente todos los tejidos conjuntivos (cartilaginosos y no cartilaginosos) excepto las membranas basales.	Posible interface entre las colágenas fibrilares principales y las células; contiene múltiples secuencias RGD que son reconocidas por integrinas.
VII	$[\alpha 1(VII)]_1$	Fibrillas de anclaje	Lámina densa de la membrana basal hasta las placas de anclaje en la dermis.	Anclaje de las células epiteliales al estroma subyacente de la piel.
VIII	Desconocidas, aunque, según ensayos con cDNA pueden ser $\alpha 1(VIII)$ y $\alpha 2(VIII)$ .	Capas en red	En cultivo de: células endoteliales, subendotelio de vasos sanguíneos grandes, membrana de Descemet, placa de crecimiento de cartilago, etc.	Desconocida.
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Colágenas asociadas a fibrillas con triples hélices interrumpidas (FACIT).	Cartilago hialino y humor vítreo.	Asociación con colágena tipo II, permitiendo su asociación e interacción con proteoglicanos de cartilago.

Continuación...				
Tipo de colágena	Especies moleculares (cadenas)	Organización de agregados moleculares	Distribución	Función
X	$[\alpha 1(X)]_3$	Capas en red.	Cartilago hipertrófico.	Desarrollo de hueso endocondral; se asocia con fibras de colágena tipo II.
XI	$\alpha 1(XI), 2(XI)\alpha 3(XI)$	Probablemente formadora de fibrillas delgadas; puede formar moléculas con las cadenas tipo V.	Cartilago hialino y humor vítreo.	Posible centro de las moléculas de colágena tipo II, para regular el diámetro de las fibrillas.
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	FACIT	Tendón y piel embrionaria; ligamento peridontal.	Asociada con la colágena tipo I, permitiendo la asociación de diferentes componentes de la MEC.
XIII	Desconocidas, $\alpha 1(XIII)$	Desconocida	Producto de células endoteliales y líneas de células tumorales cultivadas; placa de crecimiento de cartilago, epidermis, folículos pilosos y células mesequimáticas de la médula ósea.	Desconocida.
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Posiblemente FACIT	Piel fetal y tendón.	Posiblemente similar a la colágena tipo XII.
XV	Desconocidas, $\alpha 1(XV)$	Desconocida	Fibroblastos, endometrio, células HeLa.	Desconocida.
XVI	Desconocidas, $\alpha 1(XVI)$	FACIT	Corazón, pulmón, páncreas, músculo esquelético, células endoteliales, placenta.	Desconocida.
XVII	Desconocidas, $\alpha 1(XVII)$	Desconocida	Unión dérmico-epidérmica de la piel en los hemidesmosomas	Enlace de las membranas basales al estroma; autoantígeno asociado con la enfermedad de piel, el pénfigo buloso.
XVIII	Desconocidas, $\alpha 1(XVIII)$	Desconocida	Pulmón, hígado y riñón.	Desconocida.
XIX	Desconocidas, $\alpha 1(XIX)$	Posiblemente FACIT	Desconocido	Posiblemente modula las interacciones de la MEC, al asociarse con las principales colágenas fibrilares.



## LA ELASTINA

El tejido elástico y las fibras elásticas son componentes de la matriz fibrosa, compuesta principalmente por la proteína elastina. Ésta posee una composición de aa característica y es una de las proteínas más hidrofóbicas que se conocen, lo cual le confiere resistencia a sustancias químicas y proteinasas (BATEMAN *et al.* 1996; AYAD *et al.* 1998). Se encuentra en todos los vertebrados, a excepción de los ciclóstomos.

Las fibras elásticas presentan un amplio espectro de distribución en los tejidos de los mamíferos, ya que se puede identificar en la MEC de muchos tejidos como fibras sólidas, ramificadas y sin ramificar, finas y gruesas, en capas concéntricas, en láminas como en los vasos sanguíneos, arregladas en redes finas de fibrillas (en el cartílago de la oreja o en la laringe), o en combinación de todas éstas, como ocurre en el caso de la piel y pulmones.

En general, las fibras elásticas se encuentran en tejidos sujetos a movimientos repetitivos de distensión/relajación o pasivos de alargamiento/acortamiento. Por lo que estas fibras confieren flexibilidad y extensibilidad a los tejidos (TORRES-PERIS y MEDINA, 1990; BATEMAN *et al.* 1996), además de promover la adhesión y la migración celulares mediante sus péptidos quimiotácticos (AYAD *et al.* 1998).

La tropoelastina, el precursor soluble de la elastina, es una cadena polipeptídica única; sin embargo, el empalme alternativo en su transcripción produce diferentes isoformas, a partir de una regulación tejido- o estadio-específica. Así, las cadenas individuales obtenidas se secretan al espacio extracelular y se ensamblan con los componentes microfibrilares elásticos para constituir el conjunto de las fibras elásticas, orientadas aleatoriamente y formando una red interconectada en muchos tejidos (AYAD *et al.* 1998).

## METALOPROTEASAS (MMP) Y SUS INHIBIDORES (TIMP)

La MEC es una red compleja y dinámica de proteínas y proteoglicanos que provee el soporte estructural a los organismos e influye profundamente en muchas actividades biológicas, tales como la diferenciación, proliferación, adhesión y migración celular, así como en la morfogénesis tisular. La integridad estructural y funcional de la MEC es modificada,

fisiológicamente, por diversas moléculas, incidiendo profundamente en el desarrollo de varios procesos celulares normales y patológicos; dentro de estas moléculas, aquellas que directamente están comprometidas con su degradación son las MMPs y los TIMPs (MATRISIAN, 1990).

Las MMPs constituyen una familia de 20 ó más endopeptidasas, cada una de las cuales proviene de un gen diferente, son sintetizadas por las células mesenquimáticas, hematopoyéticas (monocitos y macrófagos), neutrófilos, queratinocitos, etc. (INOUE *et al.* 1995; DAVIDSON, 1996; FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000), y en heridas son liberadas inicialmente por las células sanguíneas para degradar y remodelar las proteínas de la MEC, durante el proceso de cicatrización (INOUE *et al.* 1995). Sin embargo, las células del tejido *per se* comienzan a expresar rápidamente muchos tipos de proteasas, entre las cuales se encuentran las MMPs (DAVIDSON, 1996).

Los miembros de la familia de las MMPs presentan las siguientes características:

- Son proteinasas que degradan, al menos, uno de los componentes de la MEC.
- Contienen un ion de zinc y son inhibidas por agentes quelantes.
- Se secretan en una forma latente o de proenzima y requieren de activación para tener actividad proteolítica.
- Se inhiben por la acción de los TIMPs.
- Sus secuencias de aminoácidos presentan homologías (MATRISIAN, 1990; FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000).

Así, las MMPs constan principalmente de tres dominios: **a)** el del propéptido, cuya función es mantener la latencia de las MMPs hasta que sean activadas (por autocatálisis, compuestos mercuriales o por otra enzima), induciendo la escisión de la región entre el "switch de la cisteína" y el **b)** dominio catalítico, donde se activa el sitio de unión entre el zinc y las His<sub>100</sub>,<sub>209</sub>,<sub>210</sub>, pero además consta del **c)** dominio semejante a la hemopexina/vitronectina que modula la unión de los TIMPs a través de su dominio C-terminal, mientras que se desconoce la función del N-terminal, pero se ha sugerido que posee un sitio de reconocimiento de la triple hélice de colágena (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000).

Varios miembros de esta familia de proteínas tienen una estructura primaria con varias regiones conservadas evolutivamente (MATRISIAN LM, 1990), de modo que las proteinasas de cada

subgrupo poseen una homología del 70% en su secuencia de aa (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000).

Debido a la especificidad de las MMPs por sus sustratos se les clasifica en cuatro subclases (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000):

Las COLAGENASAS degradan específicamente a las colágenas intersticiales del tejido conjuntivo, provocando que las fibras pierdan su conformación helicoidal, lo que produce una gelatina desnaturalizada que es susceptible a proteólisis por parte de otras MMPs y proteasas generales (MATRISIAN, 1990). La MMP-1 ó colagenasa intersticial, es una metaloproteasa clásica que degrada las triples hélices de las colágenas tipos I, II, III, V, X y XI (ULPU *et al.* 1993; DAVIDSON, 1996), que se expresa en queratinocitos migratorios, macrófagos y fibroblastos (DAVIDSON, 1996). Además, cabe indicar que, las MMPs del tipo de las colagenasas, actualmente se consideran miembros de la familia de las matrixinas, ya que las enzimas manifiestan actividad proteolítica extracelular, su gen codifica para la secuencia proteica del "switch de cisteína" (PRCGxPD) y para el sitio de unión del zinc, además de contener una Ser/Tre después del tercer residuo de His (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000).

Por su parte, las COLAGENASAS TIPO IV/GELATINASAS degradan las colágenas de la membrana basal y tienen actividad gelatinolítica (MATRISIAN, 1990), mientras que las ESTROMELISINAS tienen un amplio espectro de especificidades por sus sustratos, degradando los proteoglicanos de la MEC, la laminina, la fibronectina, la gelatina y la porción globular de las colágenas de la membrana basal (MATRISIAN, 1990). En tanto que, la MATRILISINA o PUMP (putative metalloproteinase), es una versión truncada y más pequeña de las estromelisininas (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000).

Semejante a las MMPs, los TIMPs pertenecen a una familia multigénica. Existen tres tipos de TIMPs que han sido identificados y clonados, los cuales presentan secuencias semejantes a factores de crecimiento y poseen dos dominios: el N-terminal que reacciona con los centros reactivos de la mayoría de las MMPs y el C-terminal que participa, precisamente, en la unión a la región C-terminal de las gelatinasas. En el humano el TIMP-1 es una glicoproteína de 28.5 kD y el TIMP-2 es una proteína no glicosilada de 21 kD, ambos son sintetizados

constitutivamente por varias estirpes celulares, como las células endoteliales y las mesenquimáticas, e inclusive se ha demostrado su existencia en fluidos corporales y en extractos tisulares; sin embargo, es posible que su regulación génica sea diferente, debido a que la inducción de la expresión del TIMP-1 es controlada por diversas interleucinas (IL-1, IL-6) y factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , bFGF), mientras que se desconocen las moléculas o condiciones que inducen la del TIMP-2 (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000).

Por su parte, el TIMP-3 es una proteína de 21 kD que puede ser glicosilada y sus mRNA se expresan en gran variedad de tejidos y en diferentes estadios de desarrollo, tanto en el humano como en el ratón (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000).

Además, la unión de los TIMPs involucra numerosos puntos de interacción con las MMPs. El dominio C-terminal tiene un número de sitios de unión a la enzima, los cuales difieren de acuerdo a la MMP y actúan en conjunto para incrementar su capacidad de unión, además ésta se ve aumentada por la posibilidad de la interacción del dominio N-terminal de las MMPs con el N-terminal de los TIMPs (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000). Así, los TIMPs se unen de manera no covalente y reversible a MMPs activas en una relación equimolar e inhiben específicamente su actividad enzimática (MATRISIAN, 1990; FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 2000); no obstante, el TIMP-1 también forma un complejo con la pro-forma inactiva de 92 kD de la colagenasa IV/gelatinasa, mientras que el TIMP-2 forma específicamente un complejo con la pro-forma de 72 kD de la colagenasa IV/ gelatinasa, por lo que existe cierta especificidad en las interacciones TIMP/MMP (MATRISIAN, 1990).

La actividad de las MMPs es regulada estrictamente, lo cual se relaciona directamente con las actividades biológicas importantes que desempeñan (MATRISIAN, 1990). El patrón de expresión de las MMPs activas es específico del tipo celular y es regulado por agentes inflamatorios como citocinas y la endotoxina bacteriana (ULPU *et al.* 1993).

Los genes de las MMPs no se expresan constitutivamente en muchos tipos celulares, pero su transcripción puede inducirse por tratamiento con una variedad de agentes, tales como factores de crecimiento, citocinas, promotores tumorales y productos oncogénicos (MATRISIAN, 1990); además, muchos factores de crecimiento inducen la expresión de los productos de los proto-oncogenes c-Fos y c-Jun, los cuales parecen ser importantes reguladores positivos de

la expresión génica de MMPs (MATRISIAN, 1990) y, por otro lado, los glucocorticoides y el TGF- $\beta$  pueden regularla negativamente (MATRISIAN, 1990).

Otro de los pasos donde se puede llevar a cabo la regulación de la actividad de estas enzimas, es en la conversión de las MMPs latentes a las formas activas haciéndose posible la activación de la cascada de proteinasas. Uno de los activadores endógenos de tal conversión es la plasmina, que participa durante la coagulación y que es producida a partir del precursor del plasminógeno por acción de sus activadores; así, la regulación coordinada de las MMPs y los activadores de plasminógeno puede resultar en efectos sinérgicos que completen la degradación de la MEC.

Finalmente, la actividad de las MMPs en los substratos de la MEC es dependiente del balance entre las enzimas y sus inhibidores, los TIMPs. La expresión de los TIMPs también puede ser regulada por agentes biológicos como los factores de crecimiento (GFs). Por ejemplo, la estimulación celular con TGF- $\beta$ 1 puede inhibir la degradación de la MEC, debido a su efecto dual, al inhibir la transcripción de las MMPs, como al estimular la expresión de sus inhibidores (MATRISIAN, 1990).

## ANTECEDENTES

Los procesos de reparación tisular dependen de una gran variedad de mecanismos interrelacionados que generan cascadas de fenómenos tales como la liberación de factores solubles que median la migración de las células, la activación de algunos tipos celulares, la proliferación, la síntesis y degradación de los componentes de la MEC, siendo todos ellos cruciales para la reparación adecuada del tejido dañado. La asociación de la matriz con las células que la producen y algunas otras estirpes de transición como los macrófagos y los linfocitos, conforman el tejido conjuntivo, el cual es a su vez el marco arquitectónico y de interacción del cuerpo de los vertebrados. Así, la MEC tiene una participación fundamental en todos los aspectos de la remodelación tisular y en la mayoría de las alteraciones del proceso de cicatrización, es decir en la fibrosis del tejido. Sin embargo, el balance en la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC, particularmente de la colágena, se altera de manera temporal durante el proceso normal de reparación. La disfunción o alteración del metabolismo puede ser la responsable del exceso de fibrosis observado en la escleroderma, cicatrices hipertróficas y queloides, fibrosis pulmonar, renal, etc. Para el tratamiento de estas patologías se han desarrollado diversas terapias, en las que se evalúan compuestos biológicos y fármacos para regular el balance de las proteínas y otras moléculas que participan en la reparación del daño (BERMAN y DUNCAN, 1990; ISAJI *et al.* 1994). Algunas de las terapias más comunes son: la aplicación de glucocorticoides, análogos de prolina (azetidina, deshidroprolina), inhibidores de la glicosilación (tunicamicina), osteolátirógenos (BAPN, D-penicilamina), compuestos con propiedades antimicrotubulares (colchicina, mebendazol), etc. (SODERBERG *et al.* 1982; LAWRENCE, 1991; DARZI y CHOWDRI, 1992). Sin embargo, con todas estas terapias y muchas otras de tipo físico y químico no se ha logrado tener el efecto deseado sobre el metabolismo de la colágena, sin alterar otros procesos fisiológicos normales, así que estas alternativas quedan como temporales, paliativas, definitivamente sin éxito o incluso tóxicas.

Por otro lado, se ha comprobado que el uso de la colágena heteróloga (de cerdo y ovino) puede ser eficaz en diversas áreas de la medicina, tal es el caso de la regeneración ósea (SHIMIZU *et al.* 1978; JOSS *et al.* 1980; JOSS y VOGUEL, 1980; FORD, 1992), los implantes dérmicos (KARAM y KIBY, 1992) y las heridas en donde es difícil que el organismo se repare por sí solo en un periodo

breve, dada la disposición y la extensión de la lesión (KOEHNLEIN, 1972). Asimismo, un polímero inerte, la polivinilpirrolidona (pvp), ha mostrado tener participación en la inducción de la cicatrización (CHARLES, 1987).

La polivinilpirrolidona (pvp, povidona) es el nombre genérico para el homopolímero soluble en agua de la N-vinil-2-pirrolidona (NVP), desarrollada en la década de 1930 por el Profesor Walter Reppe. A partir de entonces se usó como un expansor del plasma sanguíneo. Sin embargo, en la actualidad tiene muchas aplicaciones en la industria, especialmente en la farmacéutica, de alimentos, de bebidas, de limpieza, cosmética y fotográfica. Lo anterior debido a su compatibilidad biológica, baja toxicidad, a que forma una película, a sus características adhesivas, comportamiento inerte hacia sales y ácidos y a su resistencia a la degradación térmica en solución. Así, de este polímero inerte es bien conocida su inocuidad carcinogénica y teratogénica (ROBINSON *et al.* 1990).

### La colágena-polivinilpirrolidona

La colágena-polivinilpirrolidona (Fibroquel<sup>MR</sup>; ÁSPID, S.A. de C.V., México) es un compuesto preparado a base de colágena tipo I "nativa" obtenida de piel de porcino pepsinizada y un compuesto inerte, la polivinilpirrolidona, en una solución amortiguadora de citratos que estabiliza el pH. Tal mezcla se esteriliza con radiación gamma en una bomba de <sup>60</sup>Co, y se especula que favorece los entrecruzamientos de la colágena y genera unión de tipo covalente entre ambas (CHIMAL-MONROY *et al.* 1998). Cada ml del producto contiene 141.3 mg de colágena-pvp equivalente a 8.3 mg de colágena.

La colágena-polivinilpirrolidona (clg-pvp) presenta actividad antifibrótica, fibrolítica, hemostática, inductora de la cicatrización, osteoestimuladora y osteorreparadora.

En relación con su actividad fibrolítica se ha demostrado que la clg-pvp disminuye la expresión de PDGF-AB, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , así como de las moléculas de adhesión celular (ELAM-1 Y VCAM-1) en la cicatriz hipertrófica tratada y clínicamente resuelta, a niveles similares a los determinados en la piel normal, mientras que en las biopsias de cicatriz hipertrófica se observan niveles de éstas moléculas muy elevados. Lo anterior sugiere una regulación de factores proinflamatorios y fibrogénicos y en consecuencia de la inflamación crónico-recurrente por la administración del biofármaco (KRÖTZSCH-GÓMEZ *et al.* 1998).

A su vez, la colágena-polivinilpirrolidona es capaz de inducir la remodelación de la fibrosis peritoneal y de modular la inflamación asociada a esta patología, a través de la disminución directa de la proliferación de fibroblastos e indirecta de la producción de proteínas de la MEC (FURUZAWA-CARBALLEDA, en prensa).

Por otro lado, en cultivos de sinovia de pacientes con artritis reumatoide cuya afección principal es la inflamación crónica, la colágena-pvp modula algunos de los parámetros asociados con la inflamación, al regular negativamente la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , ambas participantes en la inducción de la síntesis de MACs y MMPs, y de regular el metabolismo de la MEC (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 1999).

La clg-pvp también ha mostrado tener participación directa en los procesos reparativos de la piel en un modelo murino y en el humano; donde aplicada intralesionalmente induce un aumento en el tejido de granulación, al séptimo día post-cirugía, además de mejorar el arreglo tisular que conlleva a una disposición de las fibras de la colágena tipo I y III similar a la de la piel normal, con presencia de anexos cutáneos (KROTSZCH-GÓMEZ *et al.* 1993). Por otro lado, también se ha visto que implantes de clg-pvp *versus* los de colágena aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata (CHIMAL-MONROY *et al.* 1998).

Con base en las características mencionadas anteriormente en este trabajo se evaluó el mecanismo a través del cual la clg-pvp ejerce su efecto cicatrizante en heridas agudas en humanos.

## JUSTIFICACIÓN

El proceso de la cicatrización de la piel normal ha estado sujeto a una investigación intensa a través de las décadas y a partir de estos estudios histológicos, de biología celular y molecular se ha establecido, claramente, que numerosos tipos celulares y componentes de la MEC actúan de manera integral y coordinada para restablecer la integridad de algún tejido dañado por cirugía o por efecto de algún traumatismo. En los últimos años, la información obtenida acerca de los reguladores moleculares de las células en una herida y sus acciones



A su vez, la colágena-polivinilpirrolidona es capaz de inducir la remodelación de la fibrosis peritoneal y de modular la inflamación asociada a esta patología, a través de la disminución directa de la proliferación de fibroblastos e indirecta de la producción de proteínas de la MEC (FURUZAWA-CARBALLEDA, en prensa).

Por otro lado, en cultivos de sinovia de pacientes con artritis reumatoide cuya afección principal es la inflamación crónica, la colágena-pvp modula algunos de los parámetros asociados con la inflamación, al regular negativamente la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ , ambas participantes en la inducción de la síntesis de MACs y MMPs, y de regular el metabolismo de la MEC (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.* 1999).

La clg-pvp también ha mostrado tener participación directa en los procesos reparativos de la piel en un modelo murino y en el humano; donde aplicada intralesionalmente induce un aumento en el tejido de granulación, al séptimo día post-cirugía, además de mejorar el arreglo tisular que conlleva a una disposición de las fibras de la colágena tipo I y III similar a la de la piel normal, con presencia de anexos cutáneos (KROTSZCH-GÓMEZ *et al.* 1993). Por otro lado, también se ha visto que implantes de clg-pvp *versus* los de colágena aceleran la formación de hueso nuevo en defectos óseos inducidos experimentalmente en cráneos de rata (CHIMAL-MONROY *et al.* 1998).

Con base en las características mencionadas anteriormente en este trabajo se evaluó el mecanismo a través del cual la clg-pvp ejerce su efecto cicatrizante en heridas agudas en humanos.

## JUSTIFICACIÓN

El proceso de la cicatrización de la piel normal ha estado sujeto a una investigación intensa a través de las décadas y a partir de estos estudios histológicos, de biología celular y molecular se ha establecido, claramente, que numerosos tipos celulares y componentes de la MEC actúan de manera integral y coordinada para restablecer la integridad de algún tejido dañado por cirugía o por efecto de algún traumatismo. En los últimos años, la información obtenida acerca de los reguladores moleculares de las células en una herida y sus acciones

ha sido sustancialmente importante para la comprensión del fenómeno de la cicatrización de la piel; así como para poder emplear diversos compuestos y biomoléculas con fines terapéuticos que no sólo permitan acelerar, sino también mejorar la calidad del proceso de la cicatrización. Por lo que el modelo que se plantea en este trabajo provee de datos adicionales que contribuyen a entender la interacción compleja de citocinas, factores de crecimiento, componentes de la MEC, receptores, MACs, metaloproteasas y sus inhibidores, así como el efecto que presenta la clg-pvp en la cicatrización de heridas agudas y el mecanismo de acción que resulta en una reparación adecuada de la lesión.

## **IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

El empleo de la colágena-polivinilpirrolidona al ser un fármaco antifibrótico, fibrolítico, hemostático e inductor de la cicatrización, que no produce efectos colaterales o reacciones secundarias tras su administración, es de gran trascendencia para el tratamiento de afecciones humanas relacionadas con procesos de reparación.

Al analizar su efecto y posible mecanismo de acción sobre la cicatrización de heridas agudas incisionales, en piel humana normal, nos permitió determinar el efecto regulador, modulador y reparador del fármaco.

Los resultados obtenidos en humanos son alentadores para aquellos que presenten problemas de cicatrización, además de reducir los costos del tratamiento de las heridas, así como del tiempo de hospitalización. Esto tiene impacto en las perspectivas de la industria farmacéutica y del sector salud, que se han enfocado en la búsqueda de productos que aumenten la calidad y la velocidad de la cicatrización de heridas.

ha sido sustancialmente importante para la comprensión del fenómeno de la cicatrización de la piel; así como para poder emplear diversos compuestos y biomoléculas con fines terapéuticos que no sólo permitan acelerar, sino también mejorar la calidad del proceso de la cicatrización. Por lo que el modelo que se plantea en este trabajo provee de datos adicionales que contribuyen a entender la interacción compleja de citocinas, factores de crecimiento, componentes de la MEC, receptores, MACs, metaloproteasas y sus inhibidores, así como el efecto que presenta la clg-pvp en la cicatrización de heridas agudas y el mecanismo de acción que resulta en una reparación adecuada de la lesión.

## **IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

El empleo de la colágena-polivinilpirrolidona al ser un fármaco antifibrótico, fibrolítico, hemostático e inductor de la cicatrización, que no produce efectos colaterales o reacciones secundarias tras su administración, es de gran trascendencia para el tratamiento de afecciones humanas relacionadas con procesos de reparación.

Al analizar su efecto y posible mecanismo de acción sobre la cicatrización de heridas agudas incisionales, en piel humana normal, nos permitió determinar el efecto regulador, modulador y reparador del fármaco.

Los resultados obtenidos en humanos son alentadores para aquellos que presenten problemas de cicatrización, además de reducir los costos del tratamiento de las heridas, así como del tiempo de hospitalización. Esto tiene impacto en las perspectivas de la industria farmacéutica y del sector salud, que se han enfocado en la búsqueda de productos que aumenten la calidad y la velocidad de la cicatrización de heridas.

## HIPÓTESIS

La clg-pvp mejorará la calidad de la cicatriz, al modular hacia la baja:

- a) La síntesis y depósito de los componentes de la MEC (colágena y elastina)
- b) de las citocinas fibrogénicas
- c) de las moléculas de adhesión celular,
- d) de la MMP-1 y de TIMP-1  
durante el proceso de inflamación.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar la efectividad y mecanismo de acción de la clg-pvp *versus* placebo, como biofármaco inductor de la cicatrización en heridas quirúrgicas incisionales en humanos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar histomorfológicamente heridas quirúrgicas tratadas con clg-pvp a 7 y 28 días post-cirugía.
- Determinar la disposición de las fibras de colágena tipos I y III, además de las elásticas y de infiltrados inflamatorios en las heridas a 7 y 28 días post-cirugía.
- Evaluar la expresión de:
  - Las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, Y PDGF-AB;
  - Las moléculas de adhesión VCAM-1 y VLA-4;
  - la colagenasa intersticial (MMP-1) y el inhibidor TIMP-1 en las heridas quirúrgicas.

## HIPÓTESIS

La clg-pvp mejorará la calidad de la cicatriz, al modular hacia la baja:

- a) La síntesis y depósito de los componentes de la MEC (colágena y elastina)
  - b) de las citocinas fibrogénicas
  - c) de las moléculas de adhesión celular,
  - d) de la MMP-1 y de TIMP-1
- durante el proceso de inflamación.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar la efectividad y mecanismo de acción de la clg-pvp *versus* placebo, como biofármaco inductor de la cicatrización en heridas quirúrgicas incisionales en humanos.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar histomorfológicamente heridas quirúrgicas tratadas con clg-pvp a 7 y 28 días post-cirugía.
- Determinar la disposición de las fibras de colágena tipos I y III, además de las elásticas y de infiltrados inflamatorios en las heridas a 7 y 28 días post-cirugía.
- Evaluar la expresión de:
  - Las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, Y PDGF-AB;
  - Las moléculas de adhesión VCAM-1 y VLA-4;
  - la colagenasa intersticial (MMP-1) y el inhibidor TIMP-1 en las heridas quirúrgicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### GENERACIÓN DE HERIDAS Y OBTENCIÓN DE BIOPSIAS

Debido a que este trabajo es un estudio clínico fase I, fue necesario solicitar voluntarios que desearan participar en el proyecto, los cuales se trataron con base en el Acuerdo de Helsinki y otorgaron su consentimiento informado. Así a once voluntarios sanos, seis hombres y cinco mujeres, de  $40.5 \pm 21.5$  y  $40.5 \pm 18.5$  años, respectivamente, se les practicó una cirugía menor ambulatoria en la región ventral del brazo izquierdo, para lo cual se les aplicó, localmente, xilocaína simple al 2% con epinefrina y después se realizó una incisión de 2 cm de longitud para obtener una biopsia longitudinal pre-cirugía o inicial. Posteriormente, se aplicaron por irrigación y subcutáneamente 0.2 ml de una solución amortiguadora de citratos 0.1 M a dos mujeres y a tres hombres, de manera aleatoria, y a éstos se les consideró como grupo placebo, mientras que como grupo de estudio se tomó el resto de los participantes a los cuales se les aplicó clg-pvp (Fibroquel<sup>MR</sup>) de la misma forma y en la misma dosis. Tras haber realizado esta operación se suturaron las heridas con hilo nylon 6/0. Finalmente, la zona de la herida fue cubierta con una gasa estéril y los pacientes continuaron con su vida normal, aseando la herida diariamente con agua y jabón, sin utilizar ningún otro medicamento para favorecer la cicatrización.

Siete días posteriores a la cirugía se tomaron muestras a tres voluntarias (una tratada con placebo y dos con clg-pvp) y a dos voluntarios (uno con placebo y otro con clg-pvp), mediante un biopsiador circular de 6 mm, después de lo cual se les realizó un curetaje para llevar a una cicatrización adecuada.

El segundo grupo correspondió a la toma de biopsias de 28 días post-cirugía, siguiendo el mismo procedimiento que el anterior; sólo que en este caso de seis voluntarios (dos hombres y una mujer de cada uno de los tratamientos) (Fig 5).

### CRIOCONSERVACIÓN

Las biopsias obtenidas se congelaron de inmediato, mediante inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior procesamiento.

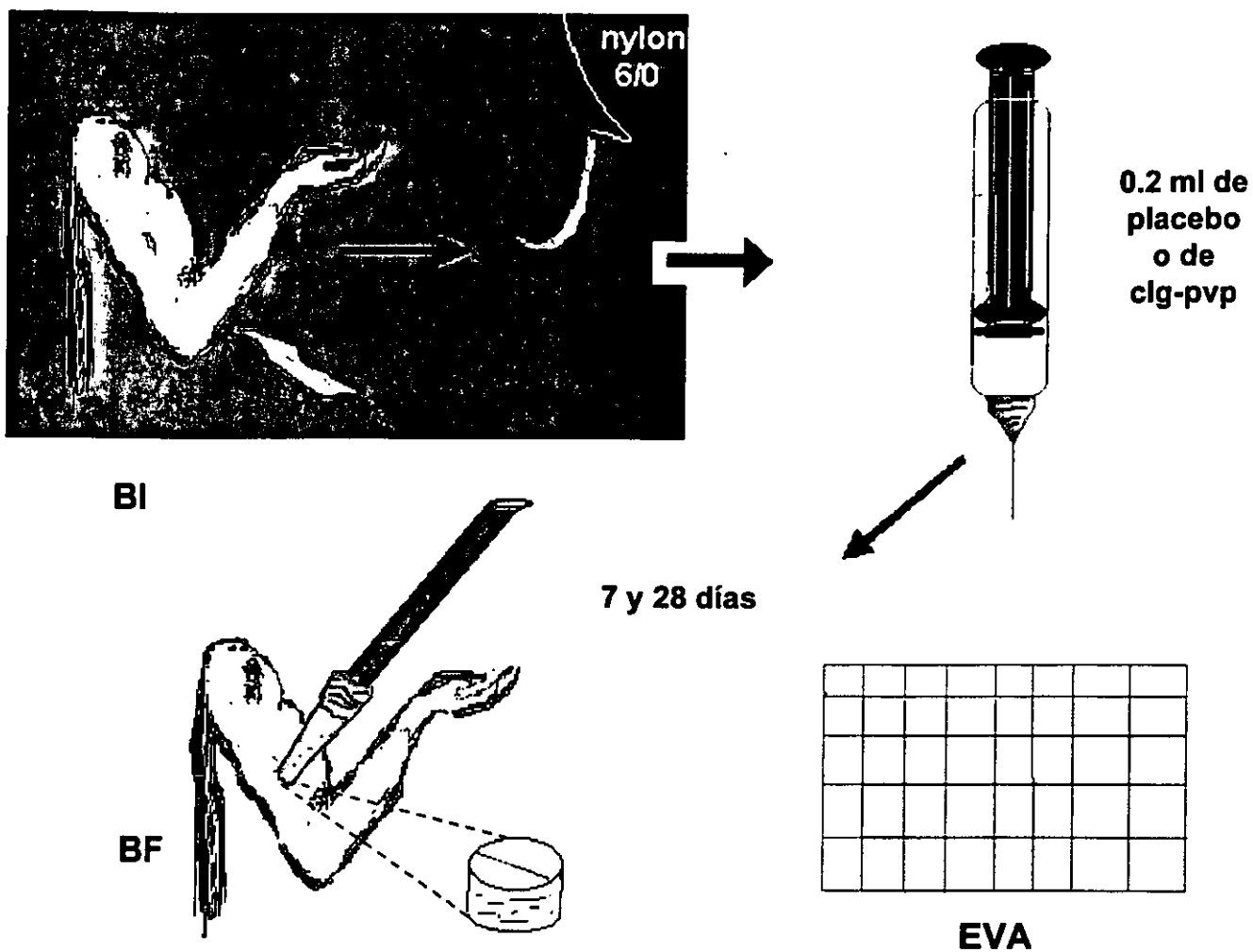
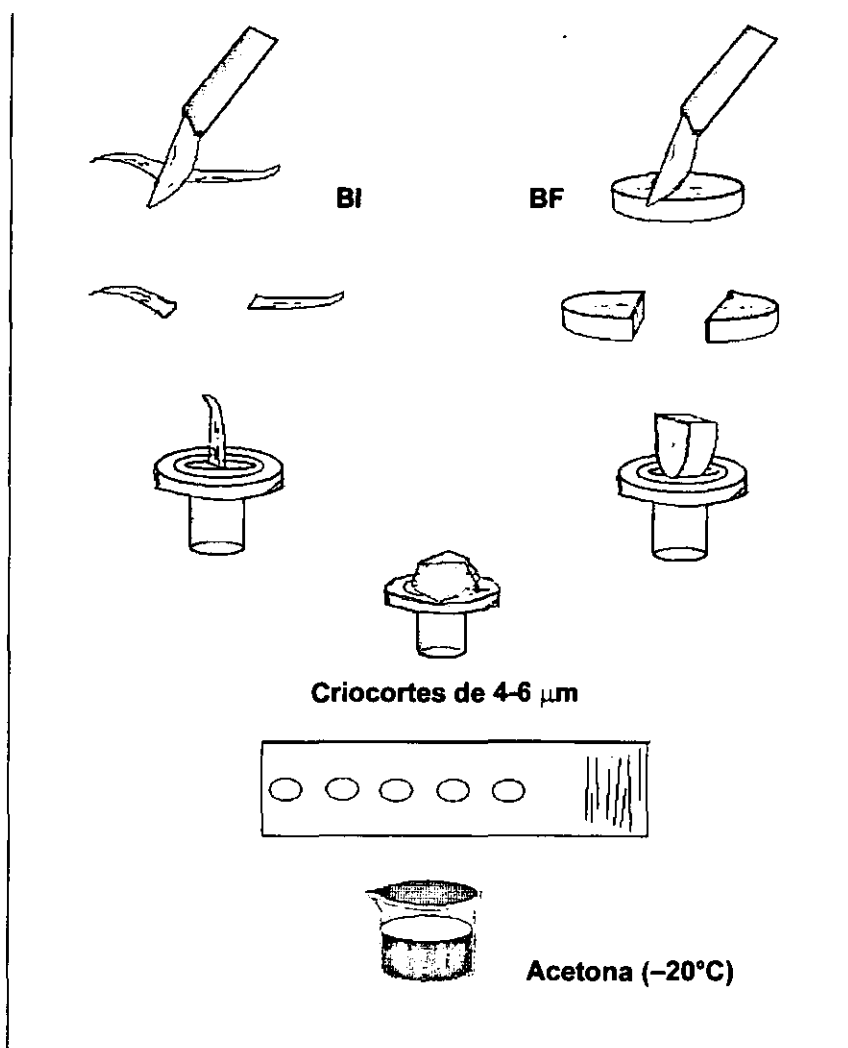


FIGURA 5. Obtención de biopsias y aplicación de los tratamientos: clg-pvp o amortiguador de citratos (placebo). Registro en tabla de escala visual análoga (EVA). Biopsia inicial (BI), biopsia final (BF).

## CORTES POR CONGELACIÓN

Los tejidos se incluyeron en un medio de congelación soluble en agua (TISSUE-TEK) (Jung Cat. # 0201 08926, Germany) y de éstos se realizaron criocortes de 4 a 6  $\mu\text{m}$  a  $-25^{\circ}\text{C}$  en un criostato semiautomático Leica CM1850. Los cortes se recibieron en portaobjetos de vidrio recubiertos con una solución de  $\gamma$ -metacriloxipropiltrimetoxisilano (SIGMA, St. Louis, MO) al 2% en acetona absoluta. Los tejidos se fijaron en acetona absoluta a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 3 min (Fig 6).



**FIGURA 6. CRIOCORTES HISTOLÓGICOS.** Secuencia de pasos para la obtención de las laminillas de trabajo con los cortes respectivos de las biopsias iniciales (BI) y finales (BF) a 7 y 28 días post-cirugía con y sin tratamiento de clg-pvp.



## **EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS INFLAMATORIOS POR ESCALA VISUAL ANÁLOGA**

La valoración de los resultados se llevó a cabo clínicamente por medio de un cuestionario semanal post-cirugía que contempló el sangrado, la inflamación a través del dolor, calor, rubor y tumor, en una escala de 0 a 5, donde cero significa nulo y cinco máximo del parámetro. Los datos se vaciaron en tablas comparativas a 7 y 28 días con y sin tratamiento a base de clg-pvp.

## **TINCIONES HISTOLÓGICAS**

En este estudio se consideraron como parámetros histomorfológicos el tipo de infiltrado celular, la vascularidad, el arreglo de las fibras de tejido conjuntivo, particularmente de colágena y elastina, evidenciados por tres diferentes técnicas de tinción: la tricrómica de Massón, la picropolicrómica de Herovici y el método de Verhoeff para fibras elásticas.

La **TINCION TRICRÓMICA DE MASSÓN** es para colágenas en general y para determinar la arquitectura tisular y para lo cual es necesario sumergir las laminillas en alumbre férrico al 5% durante 30 min a 50°C, seguido de hematoxilina de Regaud en las mismas condiciones de tiempo y temperatura, después de lo cual se lavan los tejidos con agua destilada y se diferencian en ácido pícrico hasta que los eritrocitos se tiñan en azul-verdoso, proceso que se prolonga hasta por 40 min. Después de ésto se lavan ligeramente las laminillas con agua destilada hasta eliminar el exceso del ácido, terminado este paso se sumergen en fucsina ácida por 2 min para la tinción de citoplasmas. Se enjuagan con agua para eliminar el exceso de colorante y se agrega por 5 min el ácido fosfomolibdico, se retiran las laminillas de dicha solución sin lavarlas y se sumergen durante 2 min en azul de anilina o azul de metilo filtrado. Se lavan con agua destilada, se agrega el ácido acético al 1% por 2 min, se deshidratan en alcoholes y xileno, para después montarlos con resina sintética.

Esta tinción tiñe en tonos de azul a las fibras de colágena y en rojo a las células, lo que permite evidenciar el infiltrado inflamatorio (BRADBURY y GORDON, 1992).

La **TINCIÓN PICROPOLICRÓMICA DE HEROVICI** sirve para diferenciar colágenas tipo I y III. Consiste en teñir los tejidos de las laminillas con una solución de azul celestino, para después de 5 min lavarlas con agua bidestilada. Teñirlas por 5 min con hematoxilina de Regaud, lavarlas con agua bidestilada durante 15 a 30 min, para después teñir 2 min con amarillo de metilo, posteriormente se sumergen en una solución de ácido acético para diferenciar las fibras de colágena, e inmediatamente lavar con agua. Después de esto se vira la tinción por 2 min con una solución de carbonato de litio y se sumergen las laminillas en una solución picropolicrómica. Transcurridos 2 min se sumergen en una solución de ácido acético al 1%, durante otros 2 min. Finalmente, se someten a deshidratación en alcoholes y xileno por 3 min y se montan las laminillas con resina sintética. Las colágena tipo I se tiñe en tonos de rojo, mientras que la colágena tipo III en tonos de azul, además la epidermis se tiñe en tonos de amarillo (HEROVICI, 1963).

La **TINCIÓN DE FIBRAS ELÁSTICAS** según el **MÉTODO DE VERHOEFF** permite observar principalmente fibras elásticas y otros tejidos de acuerdo a la contratinción, además de ser un método sencillo y rápido. Las laminillas se sumergen por 15 a 30 min en una solución de trabajo a base de hematoxilina, cloruro férrico y una solución de lugol. Después se lavan con agua destilada y se diferencian con cloruro férrico al 2% hasta que las fibras elásticas aparezcan de color negro sobre un fondo gris. Se lavan los tejidos con agua destilada y después con alcohol etílico al 95% para remover los grumos de yodo. Se contratiñe con eosina, van Gieson o métodos tricrómicos. Se deshidratan rápidamente mediante alcoholes, se aclaran en xileno y se montan en resina sintética. Las fibras elásticas se tiñen de color negro (BRADBURY y GORDON, 1992).

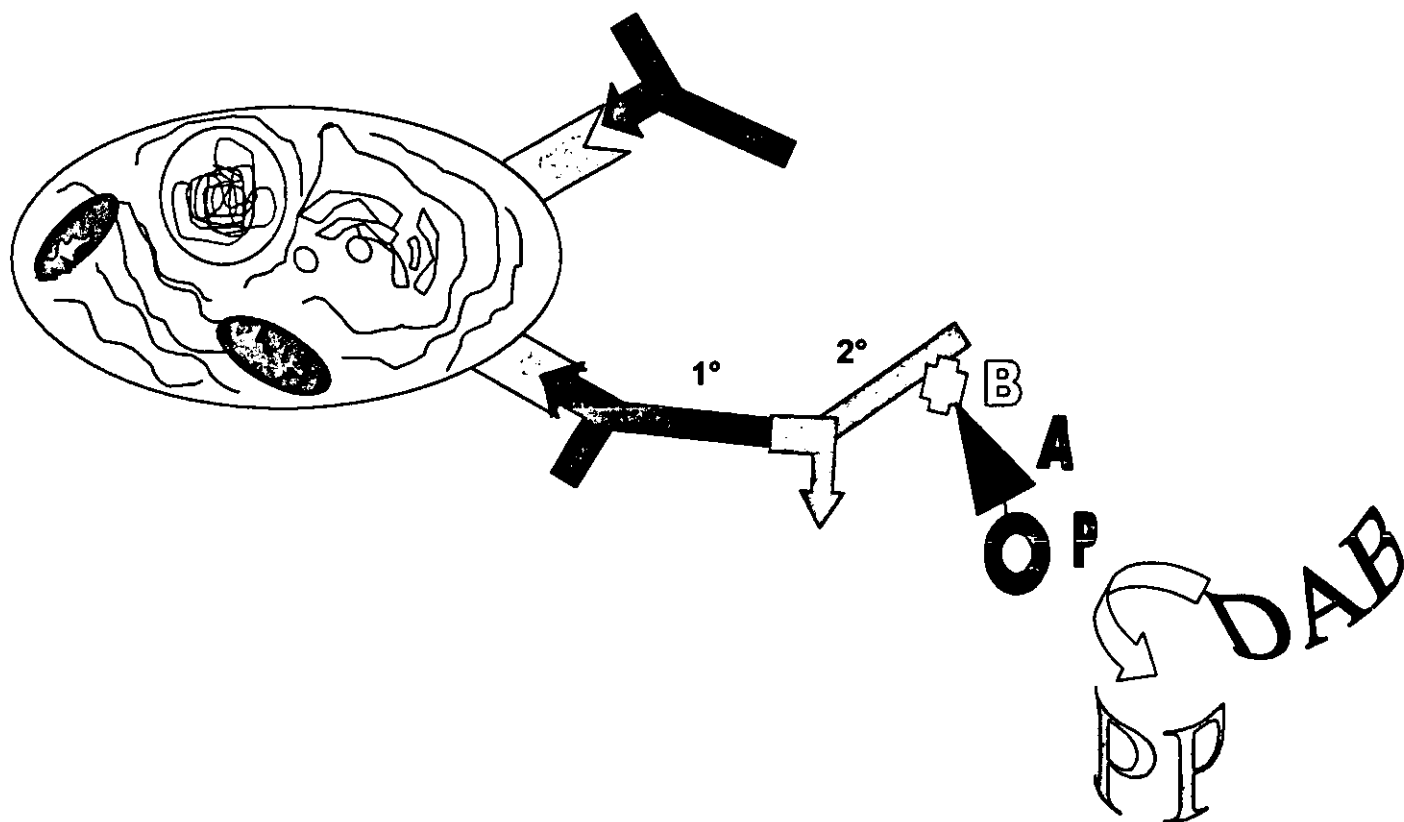
## **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Las laminillas de cada una de las biopsias se procesaron para detectar inmunorreactividad con la técnica de peroxidasa. Los tejidos se sumergieron en una solución 9:1 de metanol absoluto: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 20 min, después fue necesario lavarlas en PBS 0.01 M pH 7.2

durante 3 min. Concluido esto, se secaron tratando de eliminar el exceso de amortiguador, e inmediatamente se agregó albúmina de huevo al 4% en PBS para bloquear los sitios de pegado inespecífico y se incubaron por 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación las laminillas se enjuagaron con PBS 0.01 M pH 7.2. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario policlonal o monoclonal contra: TNF- $\alpha$  (20  $\mu$ g/ml preparado en chivo; R&D, Minneapolis, MN), IL-1 $\beta$  (20  $\mu$ g/ml preparado en chivo; R&D), PDGF (20  $\mu$ g/ml preparado en chivo; R&D), TGF- $\beta$ 1 (20  $\mu$ g/ml preparado en pollo; R&D), VCAM-1 (10  $\mu$ g/ml preparado en ratón; Chemicon, Temecula, CA), Integrina  $\alpha$ 4 (VLA-4)(10  $\mu$ g/ml preparado en chivo; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), MMP-1 (10  $\mu$ g/ml preparado en chivo; Santa Cruz Biotechnology), TIMP-1 (10  $\mu$ g/ml preparado en chivo; Santa Cruz Biotechnology). Como controles positivos (C+) se usaron cortes histológicos de piel de pacientes con escleroderma, a los cuales se les aplicó el anticuerpo primario correspondiente, mientras que en el control negativo (C-) se aplicó suero no inmune diluido 1:100. En el caso del blanco de reacción (Bco) se agregó la solución de albúmina de huevo al 4% en PBS en vez del anticuerpo primario. Así, las laminillas se incubaron con los anticuerpos respectivos, en cámara húmeda por 20 horas a 4°C. Después de ese tiempo se lavaron 4 veces con PBS durante 3 min, se eliminó el exceso de amortiguador cuidando que no se desecaran y se incubaron durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, que para el caso de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PDGF, MMP-1, TIMP-1 e integrina  $\alpha$ 4 se utilizó un anticuerpo secundario biotinado de conejo contra chivo (biotin rabbit anti goat IgG; Zymed Laboratories, San Francisco, CA); para VCAM-1 se utilizó el anticuerpo secundario biotinado de un kit de anticuerpo anti-ratón (Vectastain Elit ABC kit; Vector Lab, CA), y; para TGF- $\beta$ 1 se utilizó el biotinado de conejo anti-pollo (biotin rabbit anti-chicken IgG (H+L)(SIGMA, St. Louis, MO). Todos a una dilución de 1:50, excepto el del Kit del cual se desconoce su dilución.

Después, los tejidos se lavaron 4 veces con PBS durante 3 min. Se agregó el complejo avidina peroxidasa (Horseradish peroxidase–streptavidine (1:20); Zymed). Y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente en cámara húmeda; las laminillas se volvieron a lavar con PBS y se revelaron con una solución de 6 mg de 3'3-diaminobencidina (SIGMA) en 10 ml de Tris-HCl pH 7.6, 0.05 M y 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % a temperatura ambiente durante 10 min. Se detuvo la reacción con PBS y se contratiñó con hematoxilina de Harris durante 2

min. Se eliminó el exceso de colorante con agua corriente. Se viró la tinción con una solución saturada de carbonato de litio. Se lavó con agua corriente y se deshidrataron los tejidos en alcoholes, hasta alcohol-xileno, se limpió con xileno y se montaron las laminillas en resina sintética (Fig 7).



**FIGURA 7. INMUNOHISTOQUÍMICA.** Unión específica entre el anticuerpo primario (1°) contra un antígeno determinado expresado en la célula, al cual se une el anticuerpo secundario (2°) biotinado (B). Debido a que la biotina posee tres sitios de unión a la estreptavidina-peroxidasa (A)(P), se amplifica la reacción que puede ser observada tras la formación de un precipitado color sepia (PP) producido por la oxidación de la diaminobencidina (DAB) por la peroxidasa.

## CONTEO DE INMUNORREACTIVIDAD CELULAR

Para determinar la cantidad de células inmunorreactivas a los anticuerpos para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB, VCAM-1, integrina  $\alpha$ 4 (VLA-4), MMP-1 y TIMP-1, particularmente en células dispersas (células del mesénquima) y en vasos sanguíneos (células endoteliales y mononucleares intraluminales y perivasculares), se procedió a seleccionar, al azar, y auxiliados con un microscopio un campo a 10X, definido por debajo del estrato basal de la epidermis, específicamente en la dermis papilar, y se contaron cien células ubicadas en esa zona o hasta completar la cantidad de células, de las cuales se evaluaron las inmunorreactivas. Cabe indicar que se contaron dos campos diferentes de la misma laminilla y la evaluación fue del tipo doble ciego. Así, los resultados obtenidos se reportaron como porcentaje de células inmunorreactivas (CIR%), expresadas como el promedio más menos el error estándar (ES) donde el 100% corresponde a la inmunorreactividad inicial para cada caso. Las asociaciones entre variables cuantificables fueron determinadas usando la prueba de t de Student, según el software SIGMA-PLOT 2000 (SPSS, Inc.).

## FOTOGRAFÍA EN MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO

Los campos de las laminillas se fotografiaron en un microscopio NIKON OPTIPHOT-2 con una cámara fotográfica NIKON FX-35DX para tener la referencia visual del arreglo histomorfológico, valorado mediante las diferentes técnicas de tinción y de la expresión molecular (de citocinas, moléculas de adhesión, MMP-1 y TIMP-1) en las pruebas inmunohistoquímicas.

## RESULTADOS

Los resultados se dividen en los parámetros clínicos de inflamación posteriores a la herida quirúrgica (**Fig 8**), en las tinciones histológicas y en las pruebas inmunohistoquímicas.

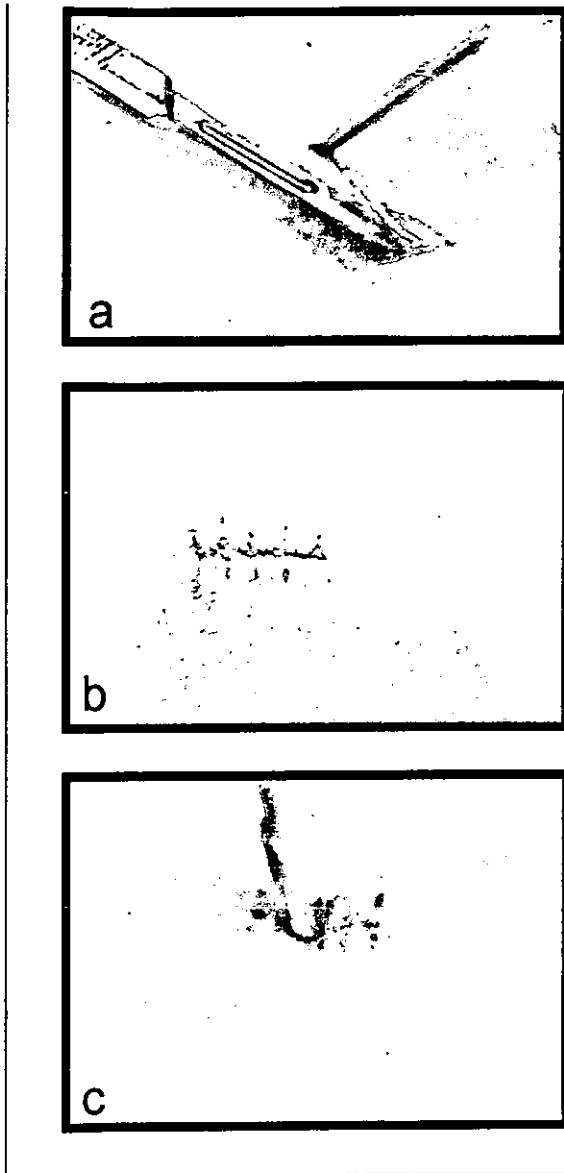


Figura 8. Técnica quirúrgica y obtención de las biopsias de piel de 11 voluntarios.

- a) Incisión quirúrgica y obtención de la biopsia inicial.
- b) Sutura de la herida.
- c) Obtención de la biopsia final a 7 ó 28 días post-cirugía.

## PARÁMETROS CLÍNICOS

La escala visual análoga (EVA) es un recurso clínico de autorreporte que permite evaluar parámetros difíciles de cuantificar, como el dolor, con base en una escala. Lo más recomendado y utilizado en la práctica clínica, por su eficacia y simplicidad es la EVA de 10 cm es decir del 0 al 10, donde 0 corresponde a la nulidad y el 10 al valor máximo, o como en este caso la del 0 al 5, que puede ser contestada por el paciente o cualquier persona que sea capaz de comprender su aplicación. La EVA permite conocer la situación particular de cualquier paciente, siendo en este caso útil para determinar la manifestación de los parámetros inflamatorios (dolor, calor, tumor, rubor).

Así, los resultados de las tablas análogas visuales nos permitieron ver que no existió gran variación en los diferentes parámetros analizados, respecto al caso placebo y el de tratamiento con la clg-pvp, a 7 (TABLA 2) y 28 días post-cirugía (TABLA 3).

**TABLA 2. ESCALA VISUAL ANÁLOGA DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS POST-HERIDA QUIRÚRGICA EVALUADA A 7 DÍAS.**

PARAMETRO	PLACEBO	DÍA			CLG-PVP	DÍA		
	# VOLUNTARIO	1	2	7	# VOLUNTARIO	1	2	7
DOLOR	1	2	1	0	3	1	1	0
	2	2	0	0	4	1	1	0
					5	0	1	0
CALOR	1	1	1	0	3	0	0	0
	2	0	0	0	4	0	0	0
					5	1	1	0
RUBOR	1	2	1	1	3	1	1	0
	2	0	1	0	4	1	1	0
					5	2	1	0
TUMOR	1	1	0	0	3	0	0	0
	2	0	0	0	4	1	0	0
					5	1	0	0

**TABLA 3. ESCALA VISUAL ANÁLOGA DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS POST-HERIDA QUIRÚRGICA EVALUADA A 28 DÍAS.**

PARÁMETRO	PLACEBO					CLG-PVP				
	# VOLUNTARIO	DÍA				# VOLUNTARIO	DÍA			
		1	2	7	28		1	2	7	28
DOLOR	6	0.5	0	0	0	9	1	0	0	0
	7	1	0	0	0	10	1	0	0	0
	8	1	3	0	0	11	0	0	0	0
CALOR	6	0	0	0	0	9	0	0	0	0
	7	1	1	0	0	10	2	0	0	0
	8	0	1	0	0	11	0	0	0	0
RUBOR	6	1	1	1	0	9	2	1	1	0
	7	1	2	0	0	10	1	1	1	0
	8	4	3	1	0	11	0	0	0	0
TUMOR	6	0	0	0	0	9	0	0	0	0
	7	1	1	0	0	10	0	0	0	0
	8	0	0	2	0	11	0.5	0	0	0

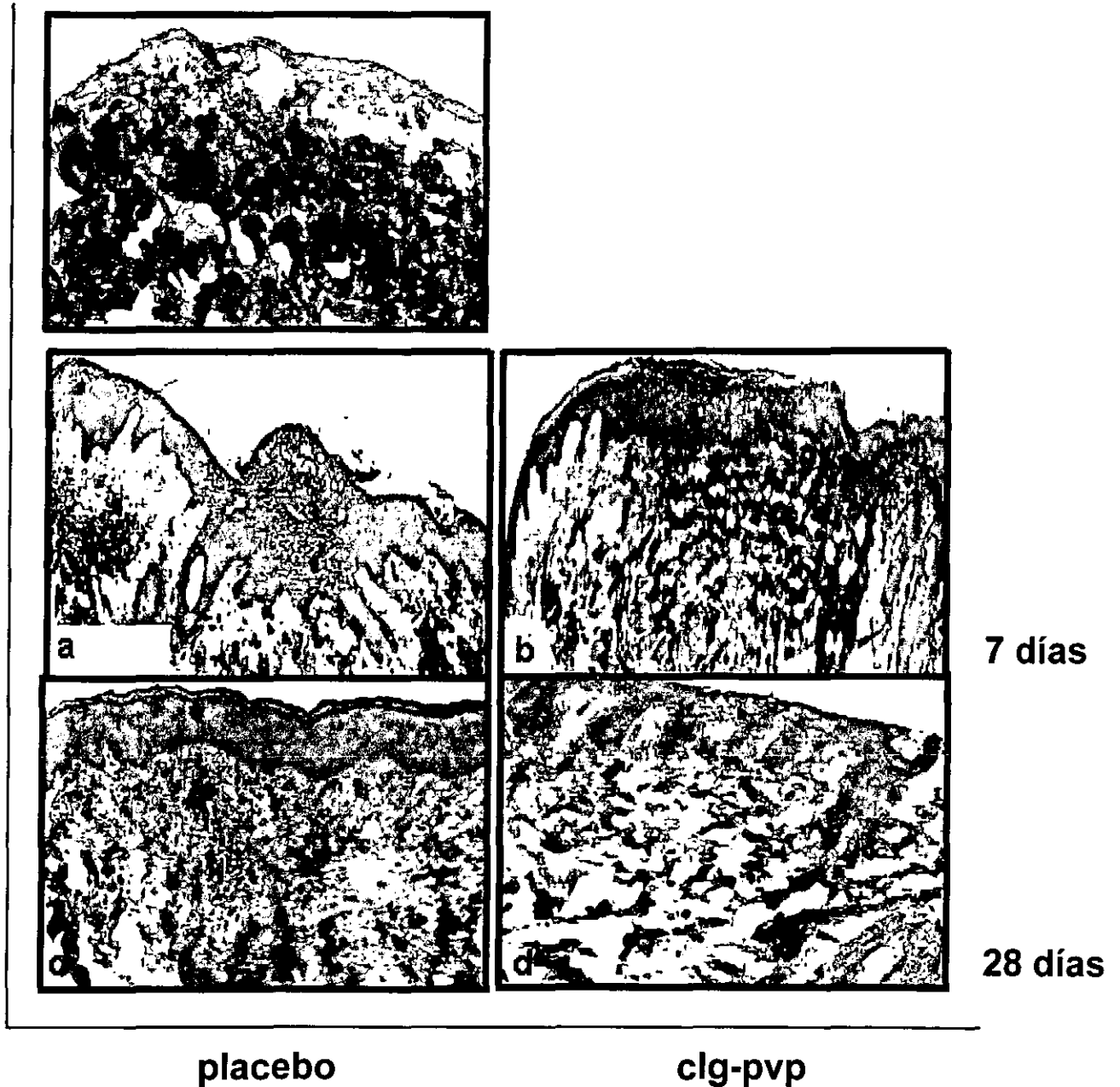


## TINCIONES HISTOLÓGICAS

### TRICRÓMICA DE MASSÓN

La tinción tricrómica de Massón nos permitió determinar el arreglo fibrilar, la presencia de infiltrados inflamatorios y la vascularidad. Particularmente, en los voluntarios de 7 días post-cirugía tratados con clg-pvp el contenido inflamatorio fue menor, compacto y localizado, entremezclado con fibras de colágena dispuestas de manera reticular, *versus* el caso placebo donde éste fue mayor en cantidad y se encontró disperso (**Fig 9**).

Para el caso placebo en los voluntarios de 28 días post-cirugía, el contenido inflamatorio fue abundante y el arreglo fibrilar fue paralelo a la epidermis, con presencia de acantosis en todos los casos. Mientras que con el tratamiento de clg-pvp la reepitelización fue evidente, con la presencia tanto de papilas dérmicas como de anexos cutáneos (foliculo piloso) y el contenido fibrilar fue típico de una piel normal, con una disposición reticular. El contenido inflamatorio fue localizado y es considerablemente menor que en los casos placebo (**Fig 9**).



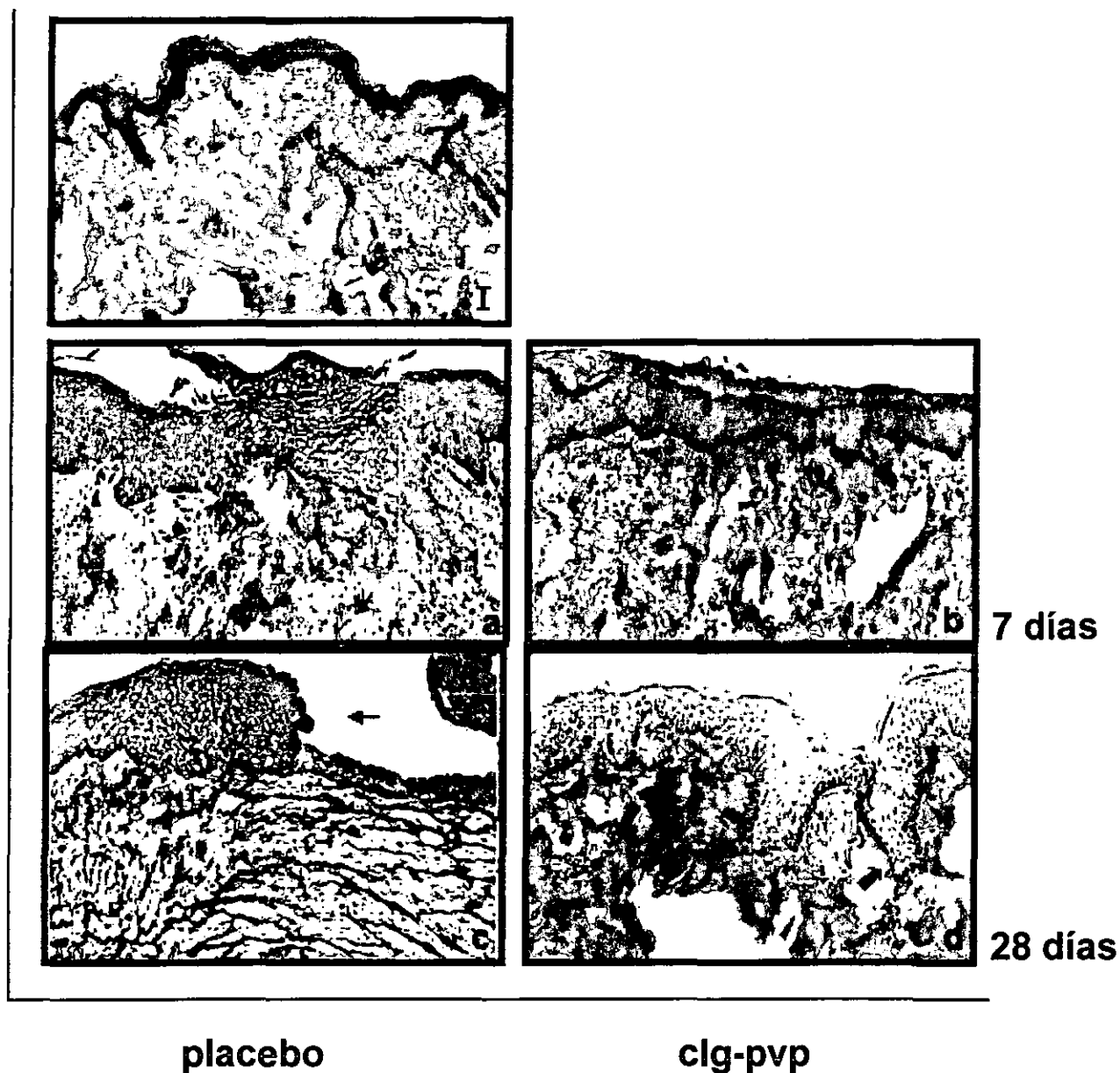
**FIGURA 9.** Tinción tricrómica de Masson de los criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Las fibras de colágena están teñidas en tonos de azul y en rojo los infiltrados inflamatorios y las células. Con  $\blacktriangleright$  se indican los anexos cutáneos (folículos pilosos), con  $\rightarrow$  la presencia de acantosis y con  $\Rightarrow$  las pápilas dérmicas. (100x).

## TINCIÓN PICROPOLICRÓMICA DE HEROVICI

Por su parte, la tinción picropolicrómica de Herovici mostró que existe un mejor arreglo tisular, tanto en los voluntarios de 7 días como de 28 días post-cirugía tratados con clg-pvp. Esto se evidenció por una mayor cantidad de fibras de colágena tipo I (en color rojo-magenta) respecto a las de tipo III (en color azul), casi similar a la proporción de una piel intacta (caso inicial), además de la presencia de mayor cantidad de tejido de granulación durante el día 7. Mientras que con el amortiguador de citratos, los voluntarios de 7 días post-cirugía presentaron mayor cantidad de fibras de colágena de tipo III (en cantidad casi similar a la clg tipo I), y el arreglo de las fibras no es reticular, sino en paquetes aislados, existiendo menor cantidad de tejido de granulación (**Fig 10**).

Para el caso de los voluntarios de 28 días post-cirugía con el tratamiento de clg-pvp, el arreglo de las fibras fue reticular y la proporción de colágena tipos I y III fue semejante al de la piel intacta, e inclusive hay presencia de anexos cutáneos.

Mientras que el grupo placebo de 28 días post-cirugía presentó un arreglo fibrilar laxo paralelo a la membrana basal., además de que la interacción dermo-epidérmica fue muy frágil, evidenciado por el desprendimiento de la epidermis (**Fig 10**).

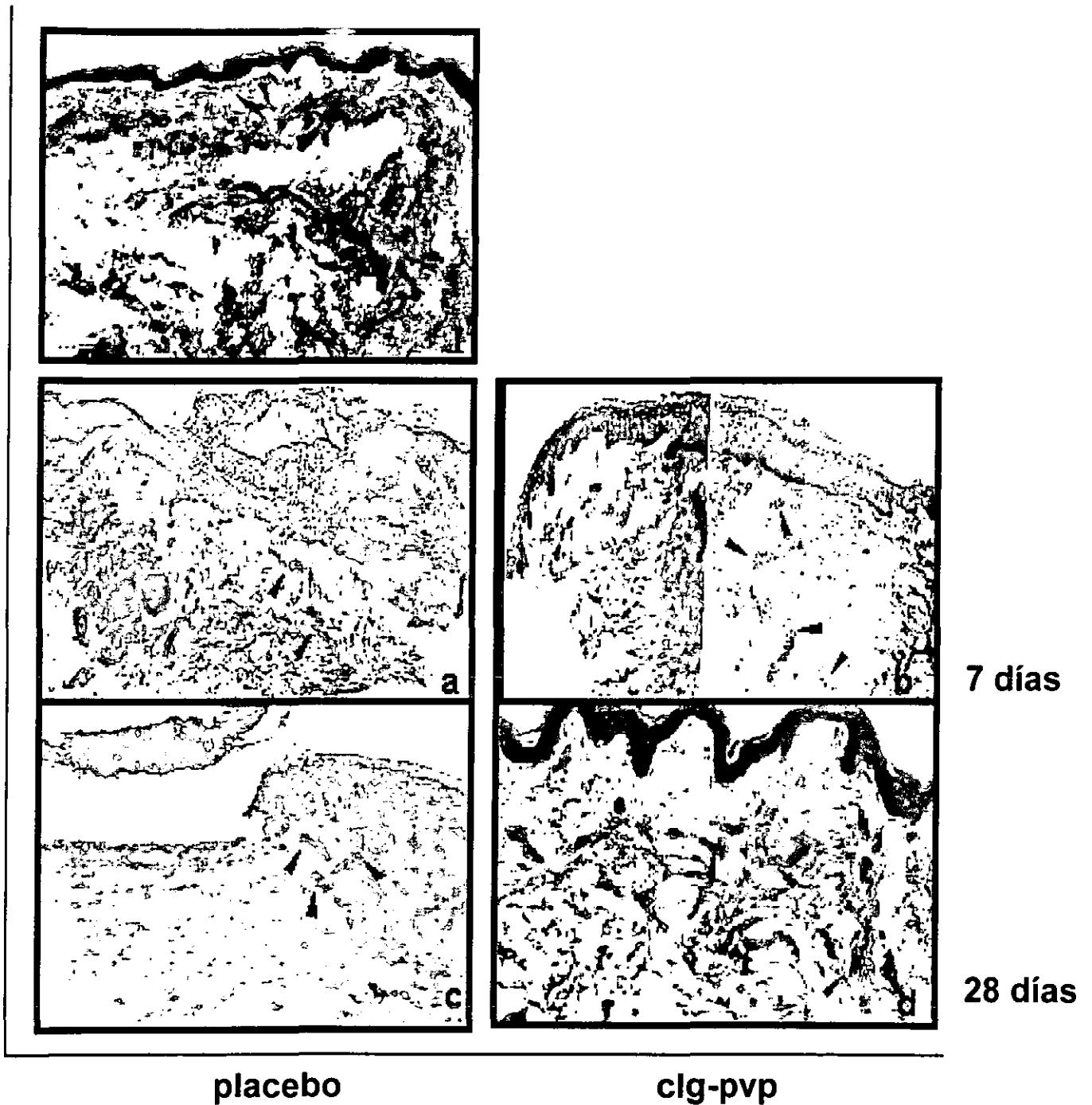


**FIGURA 10.** Tinción picropolicrómica de Herovici de los criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Las fibras de colágena tipo III están teñidas en azul y en rojo-magenta las de tipo I, mientras que las  $\blacktriangleright$  indican la presencia del tejido de granulación, las  $\blackrightarrow$  señalan a las pápilas dérmicas y la  $\rightarrow$  acantosis y fragilidad dermo-epidérmica. (100x).

## MÉTODO DE VERHOEFF

El método de tinción de Verhoeff para fibras elásticas nos permitió observar su disposición en los criocortes de piel de los grupos de estudio. En los voluntarios de 7 días post-cirugía con clg-pvp existió una mayor cantidad de fibras elásticas que en el caso placebo. Pero donde fue más evidente el arreglo fibrilar elástico, semejante al de una piel normal, fue en el caso de los voluntarios de 28 días post-cirugía con el tratamiento de clg-pvp, pues las fibrillas estuvieron bien consolidadas y la orientación de éstas fue en todas direcciones como en una piel normal. En el caso de los voluntarios de 28 días post-cirugía con placebo, dicho arreglo fue paralelo al estrato basal y además se pudo apreciar la fragilidad tisular en la interacción dermis-epidermis (**Fig 11**).

Cabe mencionar que la proporción de fibras elásticas con el tratamiento de clg-pvp a 28 días fue casi similar al caso inicial, diferente del que se presentó al cabo de 7 días post-cirugía. Y mucho mejor que en los casos placebo a ambos tiempos. Sin embargo, en estos últimos la diferencia se centró principalmente en el arreglo fibrilar distinto al de una condición inicial normal.



**FIGURA 11.** Tinción de Verhoeff para fibras elásticas de los criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Las fibras elásticas están teñidas de color violeta a negro (—) (100x).

## INMUNOHISTOQUÍMICAS

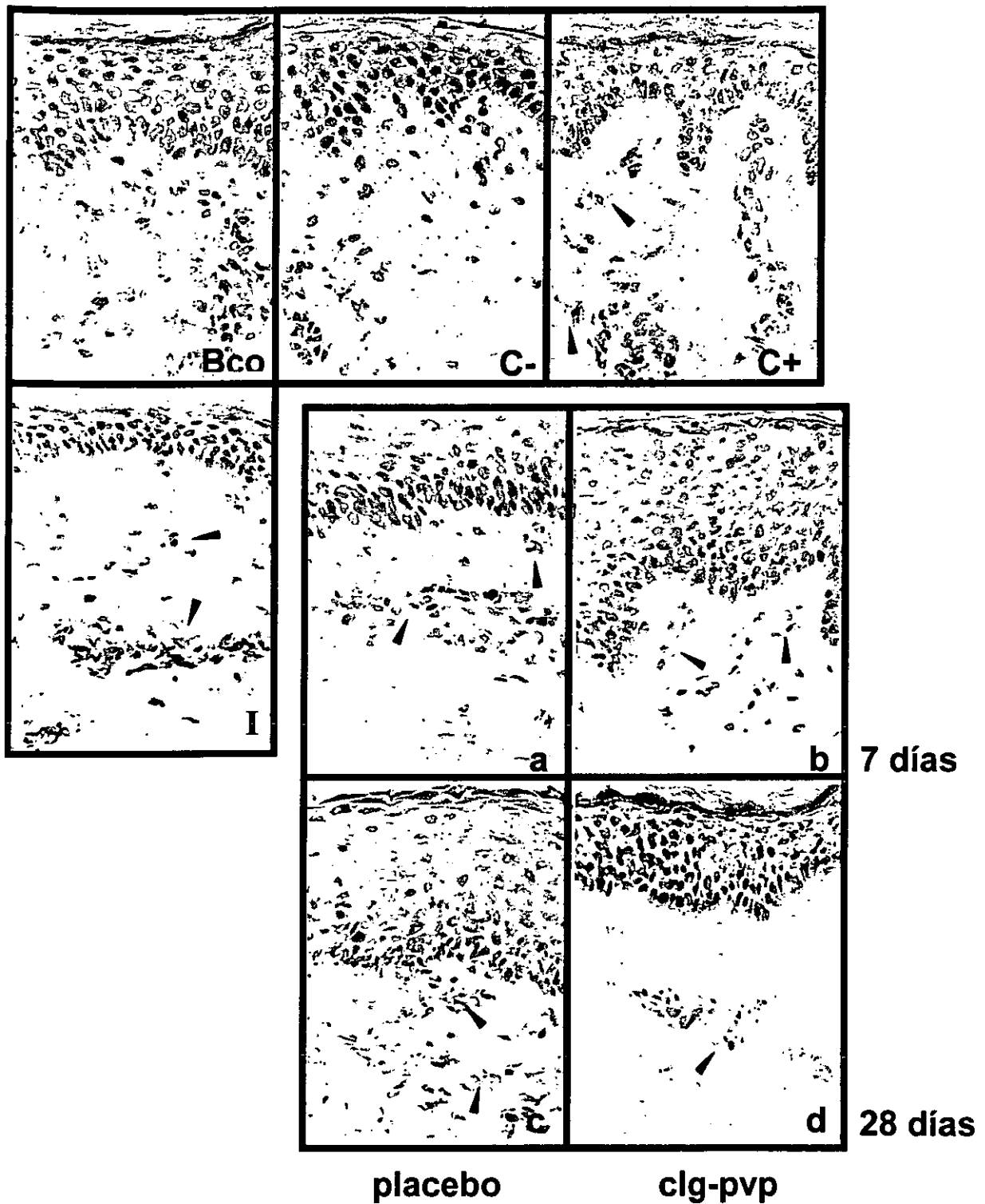
### CITOCINAS

Los resultados de las pruebas inmunohistoquímicas se dividen en el conteo de inmunorreactividad celular de las moléculas analizadas, tanto en vasos sanguíneos como en células dispersas. Pero también tales resultados se muestran en las composiciones fotográficas de las condiciones manejadas en este trabajo.

Así, de cada conteo pareado por duplicado y doble ciego se obtuvo el promedio de las muestras iniciales, que correspondió al 100% de inmunorreactividad para cada caso. El promedio del conteo final correspondió a un porcentaje inferior, igual o superior al 100%, tanto en los tejidos tratados con placebo como en los tratados con clg-pvp. Así, la inmunorreactividad a citocinas a 7 días post-cirugía, en vasos sanguíneos y células dispersas, en general, disminuyó ligeramente, tanto en los casos placebo como en los tratados con clg-pvp con respecto a la biopsia inicial. Los valores son estadísticamente significativos ( $p \leq 0.05$ ) para el TNF- $\alpha$  ( $p=0.017$ ) en células dispersas y el TGF- $\beta 1$ , tanto en células dispersas como en vasos sanguíneos ( $p=0.014$  y  $p=0.046$ , respectivamente) cuando se aplicó clg-pvp *in vivo*.

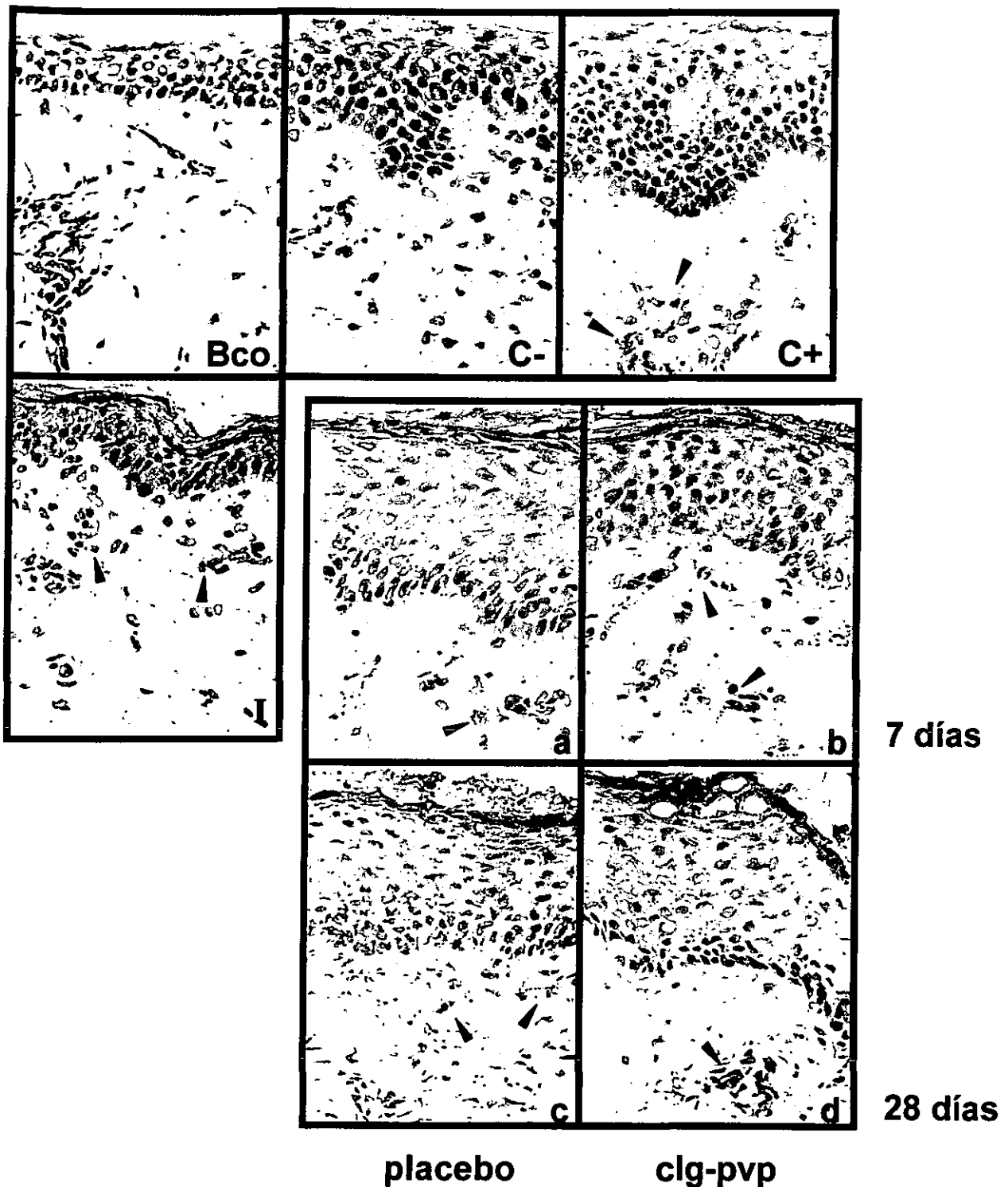
En el caso de las biopsias obtenidas a 28 días post-cirugía tratadas con clg-pvp sólo se observó que existe una disminución de células reactivas al anticuerpo anti PDGF-AB ( $p=0.019$ ) en vasos sanguíneos y de TGF- $\beta 1$  ( $p=0.05$ ) en células dispersas.

Los casos placebo presentaron inmunorreactividad dentro del margen inicial; aunque en el caso de IL-1 $\beta$  en las biopsias con y sin tratamiento, tanto en vasos sanguíneos como en células dispersas hubo menos células inmunorreactivas (CIR); sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas. Una situación similar se presentó para las CIR al anticuerpo anti PDGF-AB en las células dispersas (**Gráfica 1, Figs 12-15**).

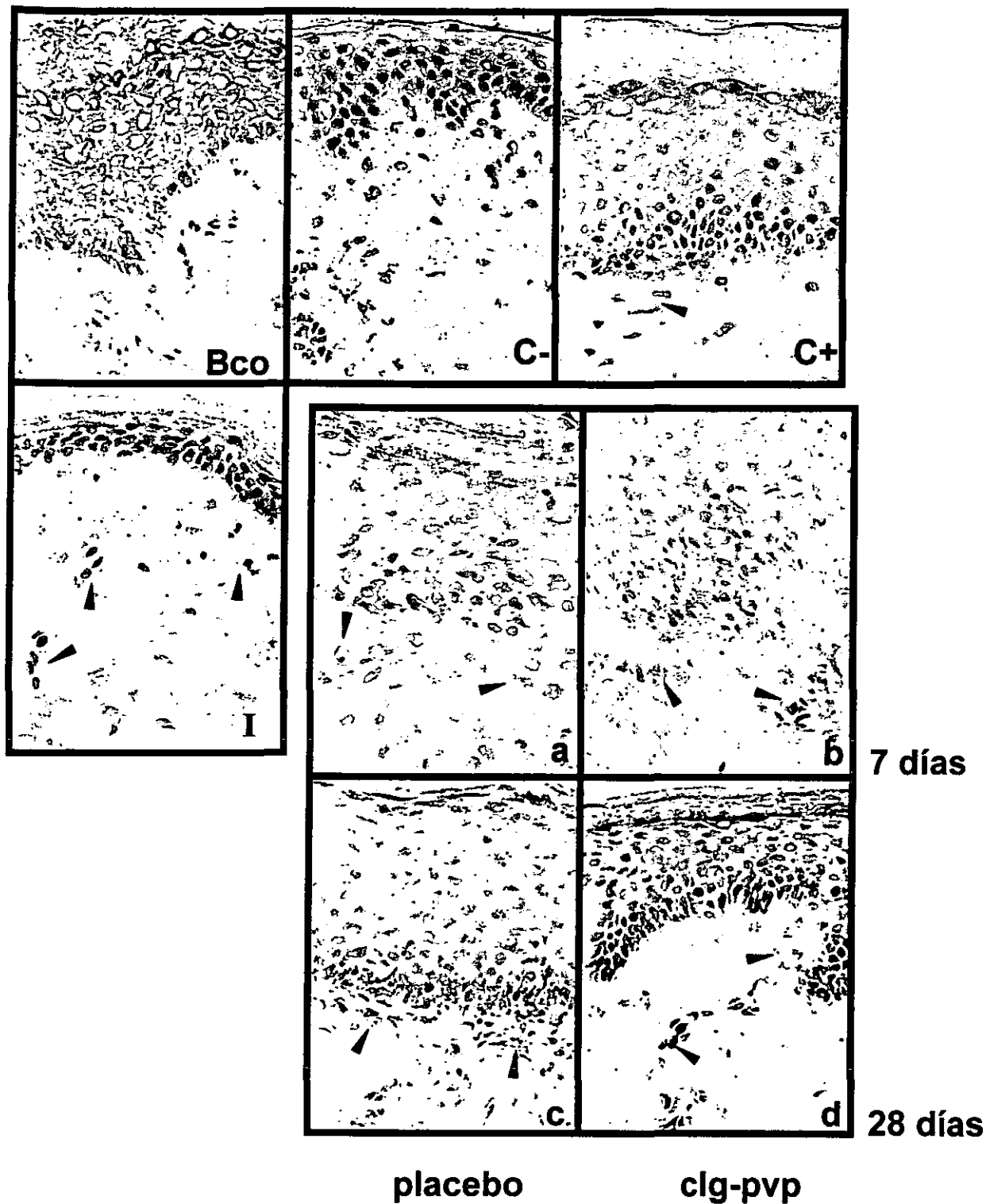


**Figura 12. Inmunorreactividad a TNF- $\alpha$  en criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), tratadas con placebo (a,c) o clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Los vasos sanguíneos y las células dispersas inmunorreactivas ( $\blacktriangledown$ ) están determinadas por gránulos color sepia. Blanco (Bco), control positivo (C+) y negativo (C-). (400x).**

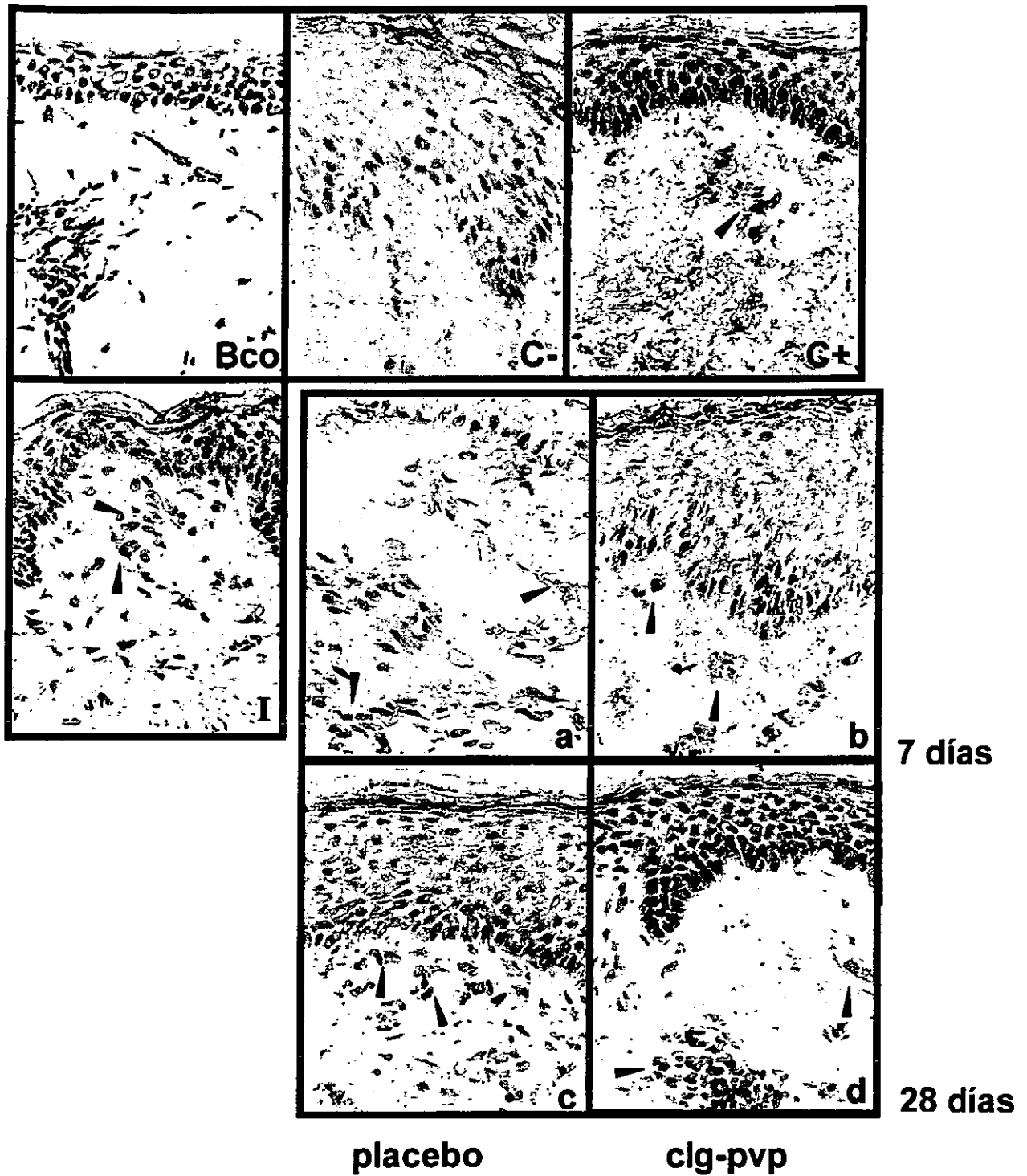




**Figura 13. Inmunorreactividad a IL-1 $\beta$  en criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), tratadas con placebo (a,c) o clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Los vasos sanguíneos y las células dispersas inmunorreactivas ( $\blacktriangledown$ ) están determinadas por gránulos color sepia. Blanco (Bco), control positivo (C+) y negativo (C-). (400x).**

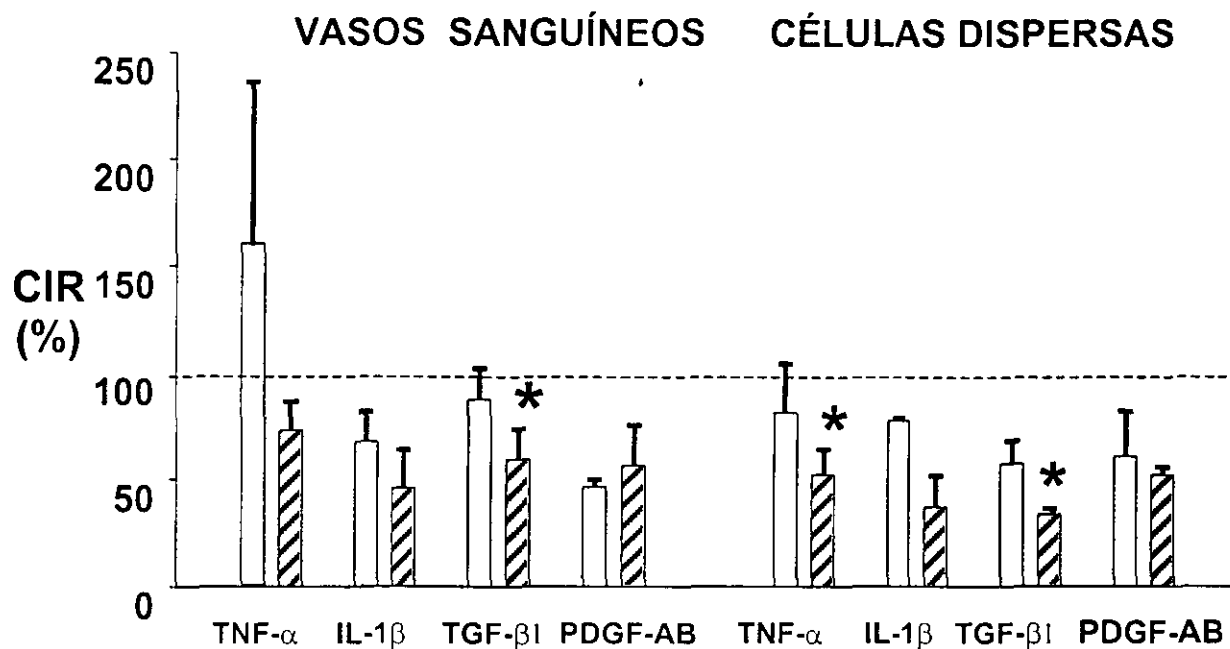


**Figura 14. Inmunorreactividad a TGF- $\beta$ 1 en criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), tratadas con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Los vasos sanguíneos y las células dispersas inmunorreactivas (  $\blacktriangledown$  ) están determinadas por gránulos color sepia. Blanco (Bco), control positivo (C+) y negativo (C-). (400x).**

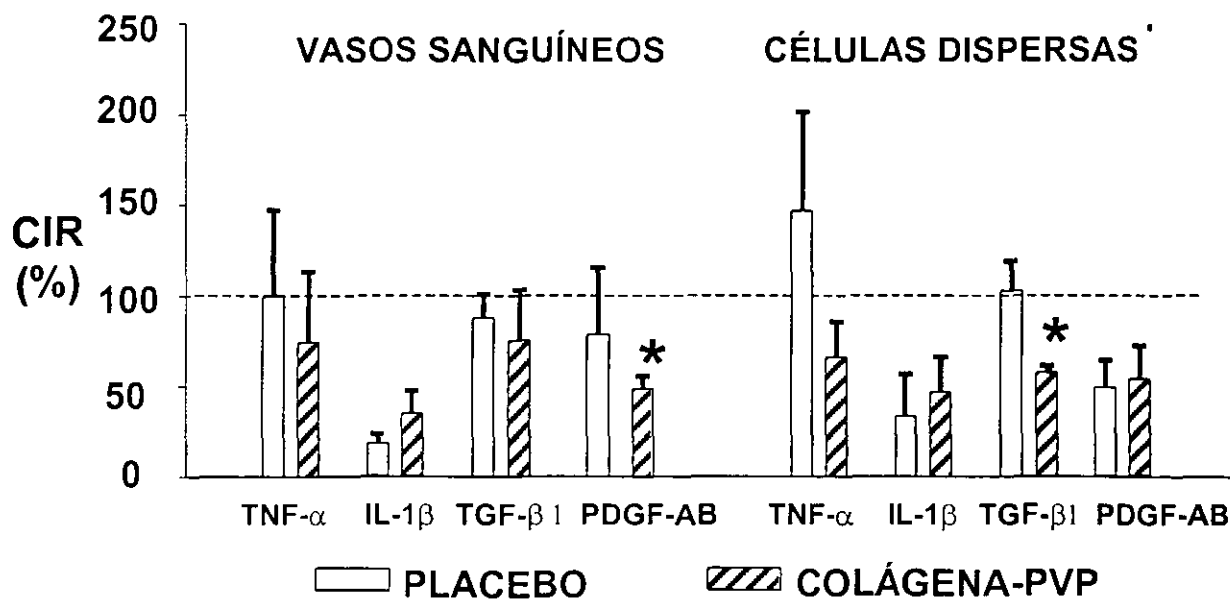


**Figura 15. Inmunorreactividad a PDGF-AB en criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Los vasos sanguíneos y las células dispersas inmunorreactivas (►) están determinadas por gránulos color sepia. Blanco (Bco), control positivo (C+) y negativo (C-). (400x).**

## 7 DÍAS POST-CIRUGÍA



## 28 DÍAS POST-CIRUGÍA



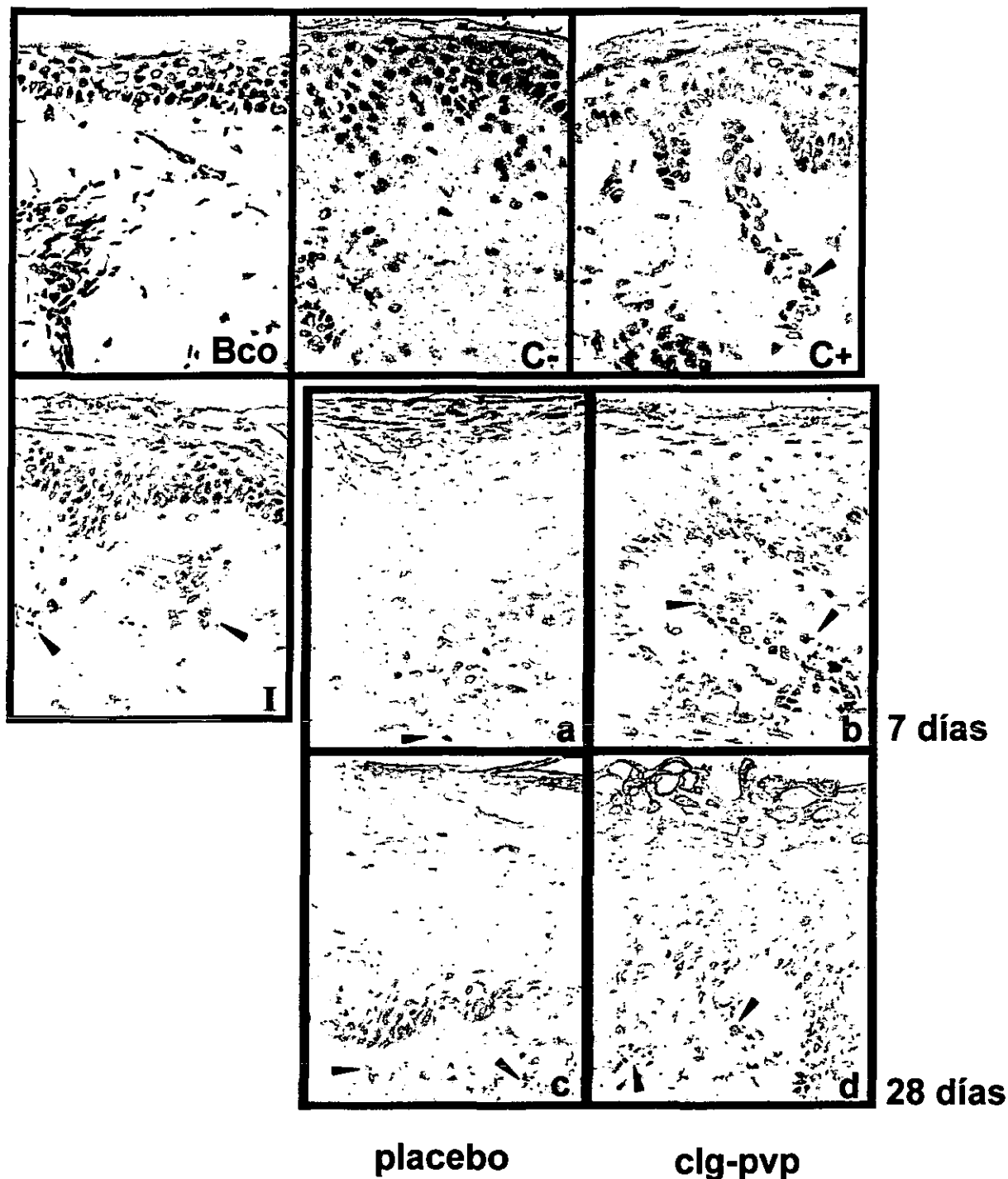
□ PLACEBO

▨ COLÁGENA-PVP

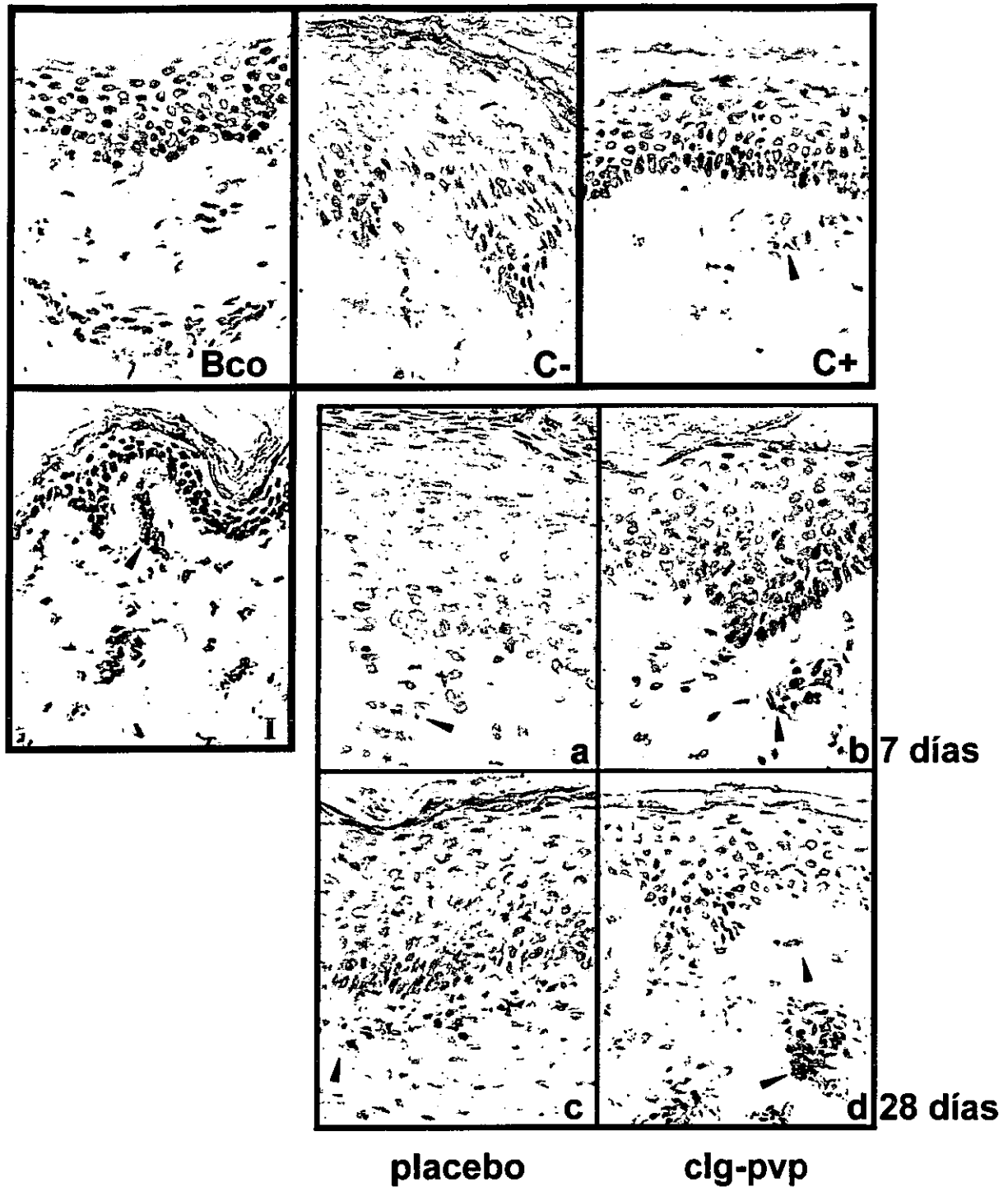
GRÁFICA 1. PORCENTAJE DE INMUNORREACTIVIDAD CELULAR (CIR%) A CITOCINAS EN VASOS SANGUÍNEOS Y CÉLULAS DISPERSAS A 7 Y 28 DÍAS POST-CIRUGÍA. El porcentaje inicial correspondiente al 100% está indicado con la línea punteada. La presencia de asterisco (\*) indica significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Las barras indican el promedio  $\pm$  el error estándar (ES).

## MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR

Las biopsias de los voluntarios tratados con clg-pvp a 7 días post-cirugía presentaron un alto porcentaje de inmunorreactividad de la molécula de adhesión VLA-4 en vasos sanguíneos ( $p=0.048$ ), en tanto que disminuyó la expresión de VCAM-1 en células dispersas ( $p=0.049$ ). No obstante, a 28 días post-cirugía no hubo cambios significativos en la expresión de ambas MACs respecto a su situación inicial (**Gráfica 2, Figs 16 y 17**).

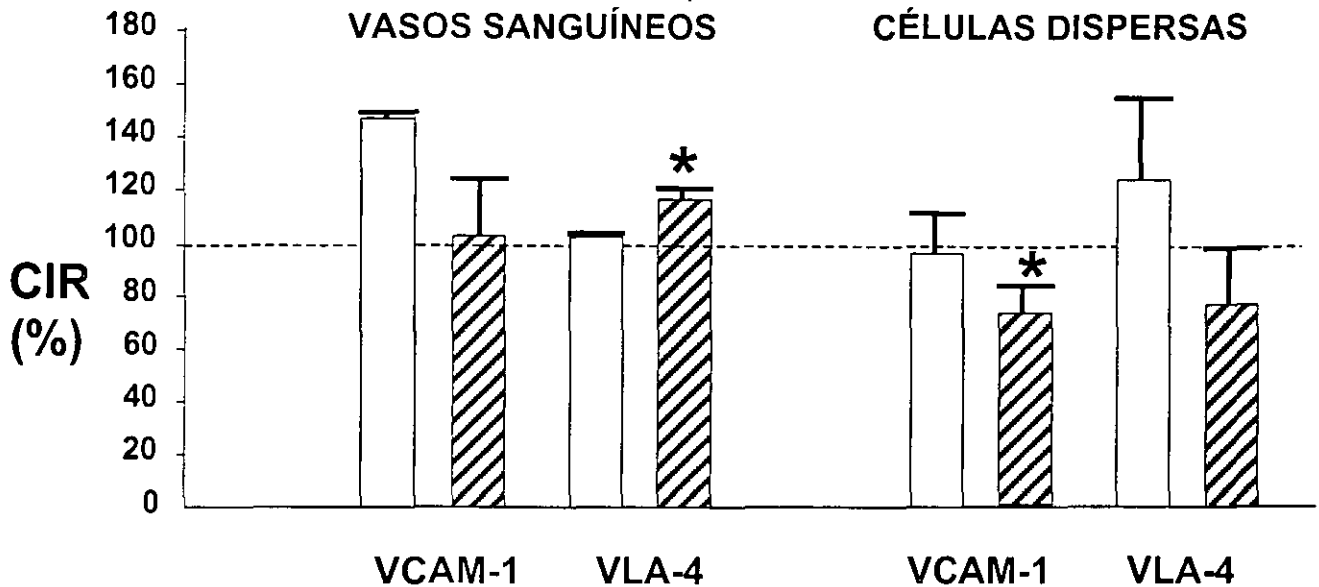


**Figura 16. Inmunorreactividad a VLA-4 en criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Los vasos sanguíneos y las células dispersas inmunorreactivas (▶) están determinadas por gránulos color sepia. Blanco (Bco), control positivo (C+) y negativo (C-). (400x).**

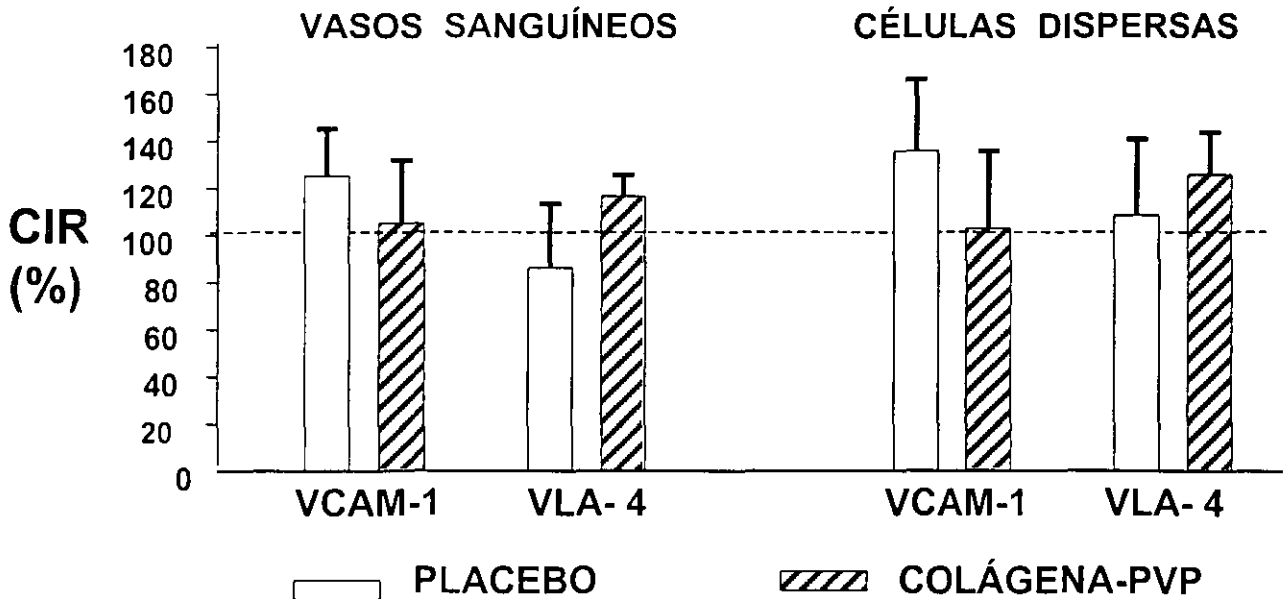


**Figura 17. Inmunorreactividad a VCAM-1 en criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), tratadas con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Los vasos sanguíneos y las células dispersas inmunorreactivas (►) están determinadas por gránulos color sepia. Blanco (Bco), control positivo (C+) y negativo (C-). (400x).**

### 7 DÍAS POST-CIRUGÍA



### 28 DÍAS POST-CIRUGÍA



GRÁFICA 2. PORCENTAJE DE INMUNORREACTIVIDAD CELULAR (CIR%) A VCAM-1 Y VLA-4 EN VASOS SANGUÍNEOS Y CÉLULAS DISPERSAS A 7 Y 28 DÍAS POST-CIRUGÍA. El porcentaje inicial correspondiente al 100% está indicado con la línea punteada. La presencia de asterisco (\*) indica la significancia estadística ( $p < 0.05$ ). Las barras indican el promedio  $\pm$  el error estándar (ES).



## METALOPROTEASA-1 Y SU INHIBIDOR TIMP-1

También en los individuos de 7 días post-cirugía la colagenasa intersticial disminuyó en vasos sanguíneos y células dispersas, con placebo o clg-pvp. Sin embargo, no hubo significancia estadística (**Gráfica 3, Fig 18**). Por su parte, el TIMP-1 no varió en relación con la inmunorreactividad celular inicial (**Gráfica 3, Fig 19**).

Lo mismo sucedió en los voluntarios evaluados a los 28 días post-cirugía, en ambas condiciones de expresión de la MMP-1 y de su inhibidor. Así, aún cuando, aparentemente, aumentó la MMP-1 en vasos sanguíneos, en las biopsias de los individuos tratados con clg-pvp, no fue significativo estadísticamente (**Gráfica 3**).

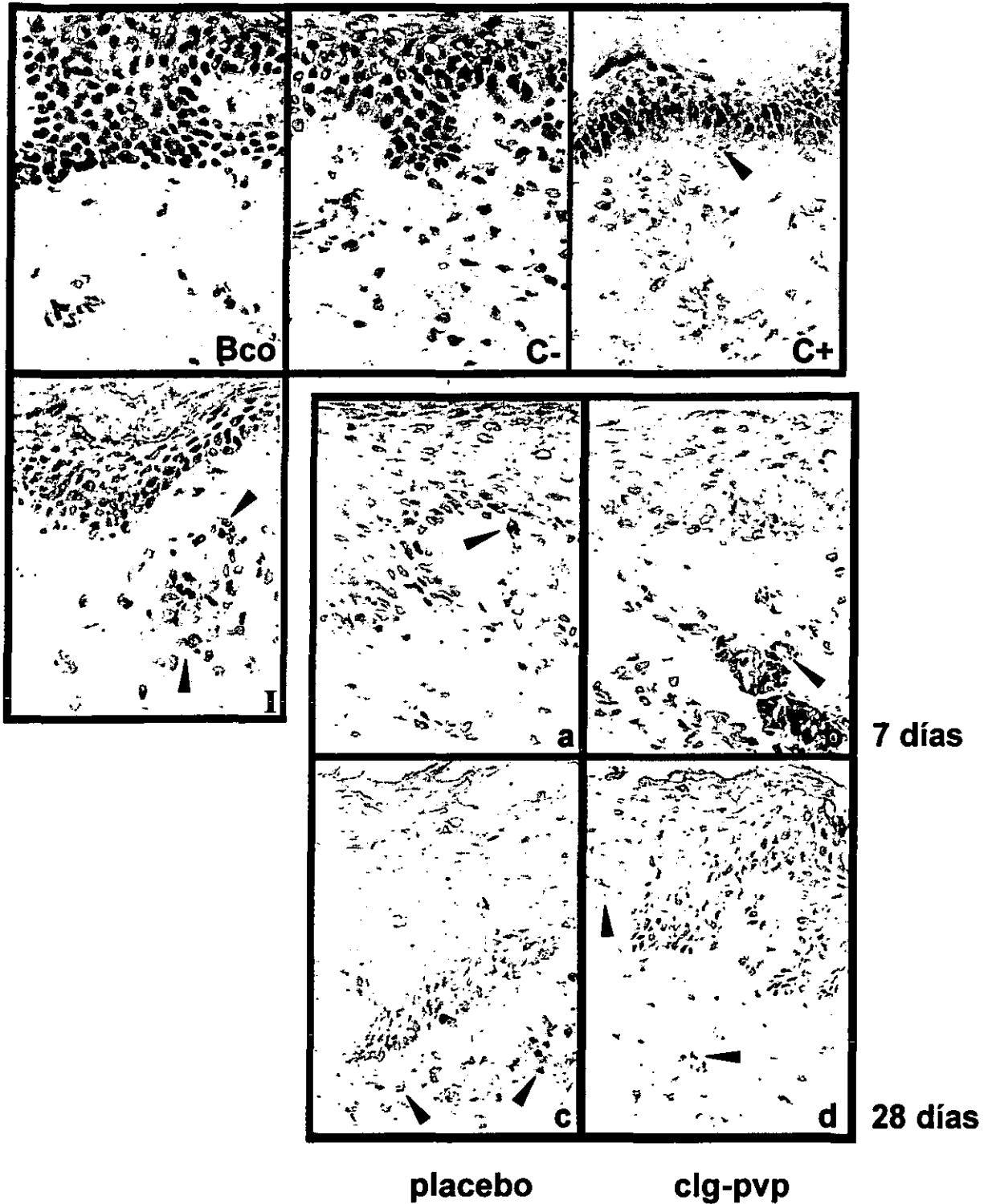


Figura 18. Inmunorreactividad a MMP-1 en criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Los vasos sanguíneos y las células dispersas inmunorreactivas (▶) están determinadas por gránulos color sepia. Blanco (Bco), control positivo (C+) y negativo (C-). (400x).

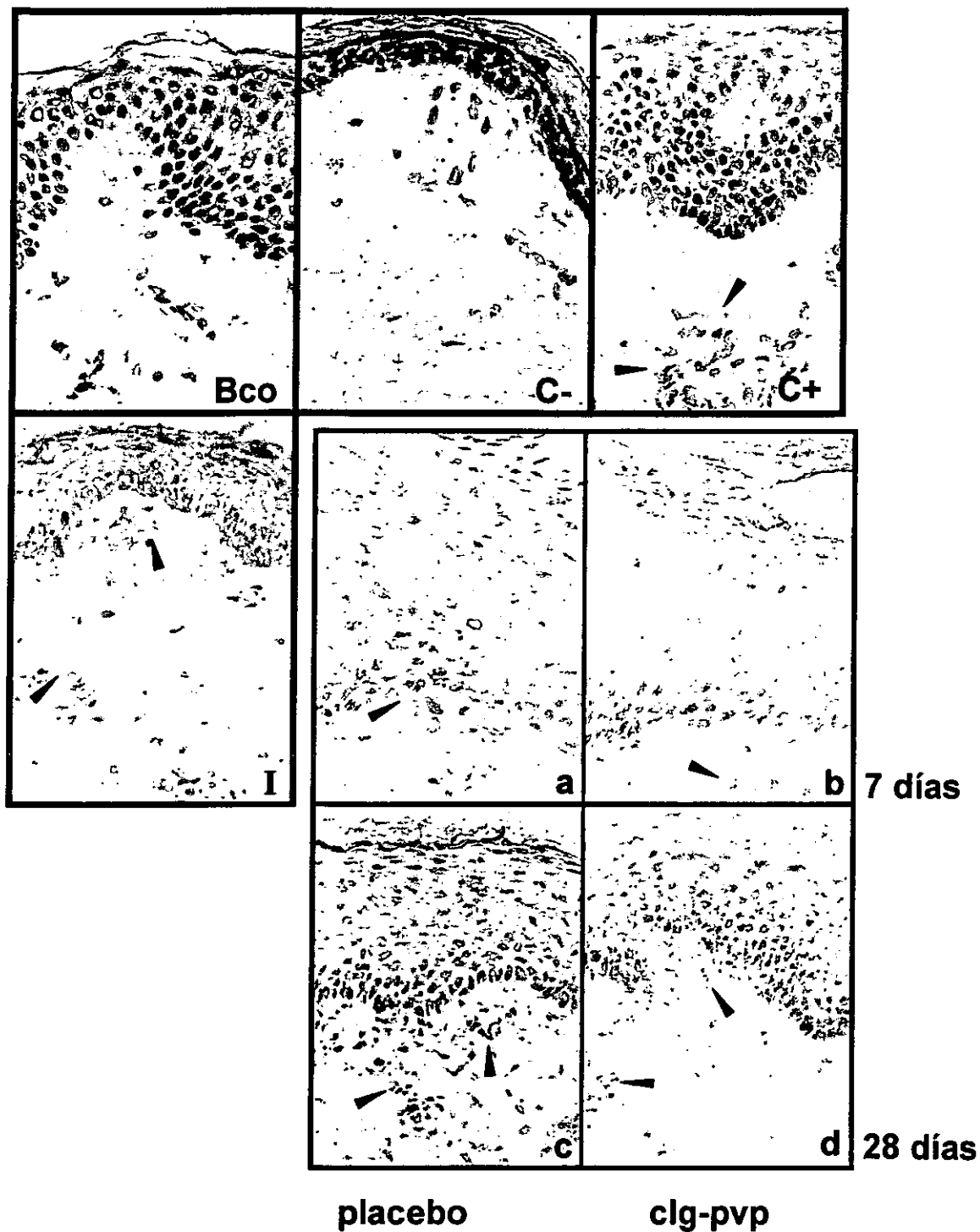
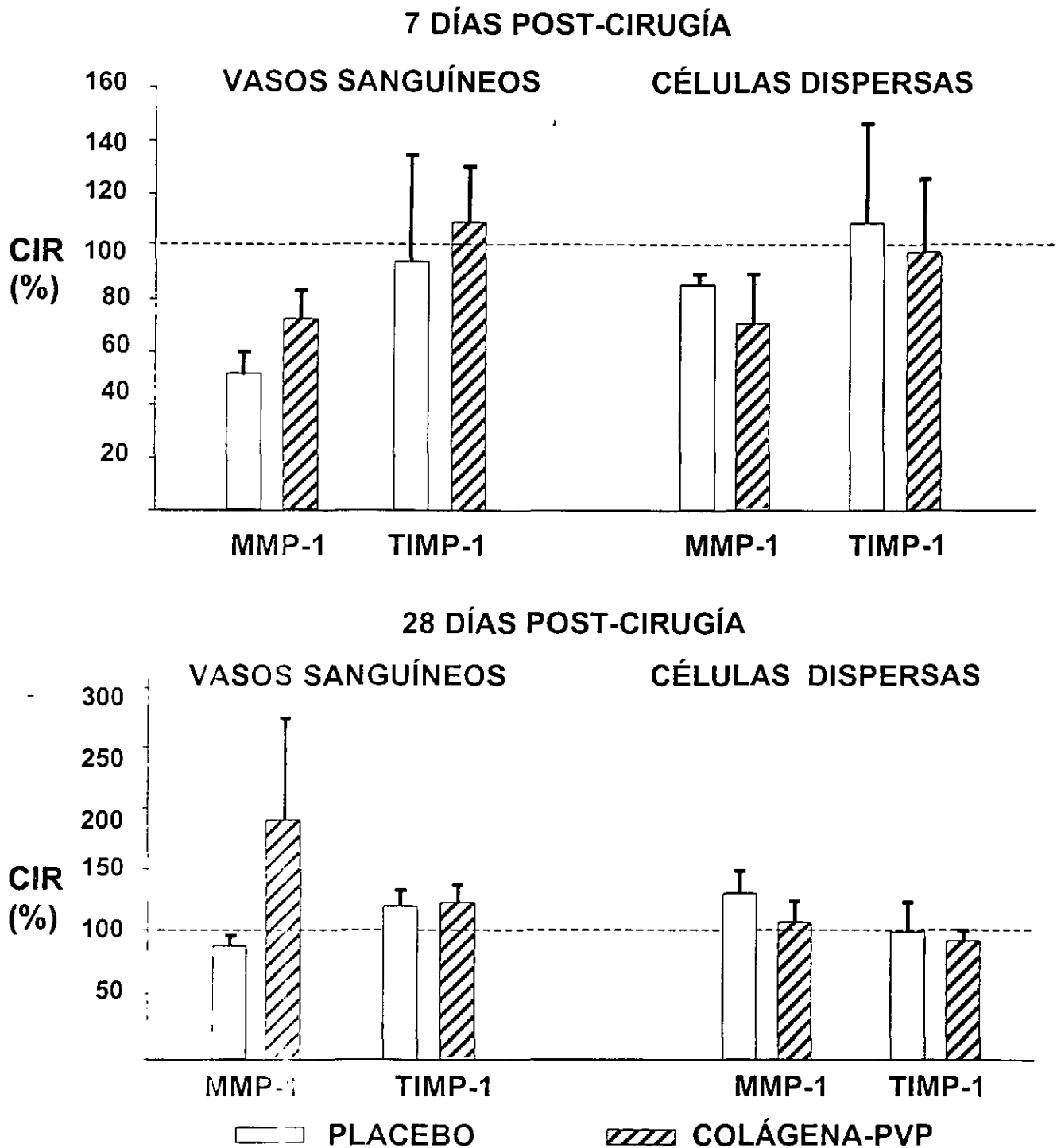


Figura 19. Inmunorreactividad a TIMP-1 en criocortes de biopsias de piel humana inicial (I), con placebo (a,c) ó clg-pvp (b,d) a 7 y 28 días postcirugía. Los vasos sanguíneos y las células dispersas inmunorreactivas (►) están determinadas por gránulos color sepia. Blanco (Bco), control positivo (C+) y negativo (C-). (400x).



GRÁFICA 3. PORCENTAJE DE INMUNORREACTIVIDAD CELULAR (CIR%) A MMP-1 Y TIMP-1 EN VASOS SANGUÍNEOS Y CÉLULAS DISPERSAS A 7 Y 28 DÍAS POST-CIRUGÍA. El porcentaje inicial corresponde al 100% indicado por la línea punteada. La presencia de asterisco (\*) indica la significancia estadística ( $p < .05$ ). Las barras indican el promedio de CIR%  $\pm$  ES.

## DISCUSIÓN

La piel es un órgano de superficie que se extiende uniformemente por la periferia del cuerpo de los vertebrados; por lo que se encuentra, a menudo, sometida a múltiples agresiones del medio como infecciones y heridas que alteran la homeostasis de la zona afectada, lo cual puede poner en riesgo sus vidas.

El término herida se usa para describir una alteración de la función y estructura anatómica resultante de un proceso patológico o traumático, que se inicia internamente o a partir de la superficie externa del órgano involucrado. Así, la cicatrización es la restauración de la continuidad del tejido después de un daño, lo que implica el cierre de la herida y la restauración de la función del tejido afectado (CALVIN, 1998).

Para que este proceso se lleve a cabo es necesario que ocurran varios fenómenos como la inflamación, quimiotaxis, migración celular, proliferación, neovascularización y síntesis de proteínas de la MEC (MARTIN, 1997) y citocinas, como el TGF- $\beta$ 1, que actúan como moduladores importantes en estos procesos. El factor mencionado es un potente promotor de la cicatrización en modelos *in vivo* (MOSES, 1990) y una vez liberado y activado actúa a concentraciones femtomolares, como quimioatrayente de monocitos, neutrófilos y linfocitos T (WAHL SM, 1994); como ocurre también con el TGF- $\beta$ 2 y con la mayoría de las citocinas (ABBAS *et al.*, 1994), por lo que su efecto biológico a estas concentraciones no es despreciable. Su expresión es muy baja en la piel normal y tiende a aumentar tras la generación de una herida, alcanzando un pico máximo a los 8 días post-operatorios (WANG *et al.*, 1998). Su importancia radica en que regula su propia expresión, así como la del bFGF, PDGF e IL-1 en monocitos (SHAH *et al.*, 1994). En el presente estudio se determinó que con el tratamiento de clg-pvp y el amortiguador de citratos no hubo un pico máximo de expresión del TGF- $\beta$ 1, en el primer caso, los niveles de esta citocina disminuyeron moderadamente, sin abatirse en su totalidad, tanto a 7 días post-cirugía en vasos sanguíneos (leucocitos, células endoteliales) y en células dispersas (neutrófilos, macrófagos y fibroblastos); como a 28 días, únicamente en células dispersas. Sin embargo, en el segundo caso, el amortiguador de citratos se sabe que retarda el proceso de la coagulación y disminuye los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, modificando así la adhesión celular a través de las integrinas, y evitando la formación del tapón plaquetario y con ello la liberación *in situ* del TGF- $\beta$ 1 durante la inflamación temprana (SHAH *et al.*, 1994); propiciando que su expresión se asemejara a la del caso inicial.

La participación del TGF- $\beta$ 1 está modulada por la clg-pvp en las heridas incisionales y no se inhibe inespecíficamente como con los citratos. Esta modulación a la baja es similar a lo que ocurre con la regeneración fetal, donde esta citocina se expresa temporalmente y a niveles bajos (MARTIN, 1997). Además, con el uso de la clg-pvp, la reepitelización fue rápida, la respuesta inflamatoria y la angiogénesis fueron moderadas, la presencia de los factores de crecimiento fue diferente, existiendo modificaciones espacio-temporales en la expresión de colágena (tipos I y III), y de otras proteínas de la MEC como la elastina, lo que culminó en la restauración de la arquitectura del tejido involucrado.

Resultados similares se obtuvieron por SHAH y cols. (1994), quienes también comprobaron la importancia de la disminución del TGF- $\beta$ 1 al aplicar un anticuerpo neutralizante, en heridas incisionales en un modelo murino, el cual presentó una disminución del infiltrado celular (macrófagos y monocitos), además se redujo la neovascularización, se disminuyó la cantidad de FN y de colágena al día 7 post-herida quirúrgica, sin menoscabo de la resistencia a la fuerza de tensión de las heridas y, lo más importante, se mejoró la arquitectura de la neodermis, de tal forma que fue similar a la dermis normal (VITELLARO-ZUCCARELLO *et al.*, 1994), reduciéndose el tejido cicatrizal (SHAH *et al.*, 1994). Asimismo, disminuyó la actividad quimioatrayente del TGF- $\beta$ 1 para fibroblastos y se inhibió la expresión y producción de PDGF y sus receptores, provocando el descenso en la proliferación de estas células. Los resultados anteriores fueron consistentes con los obtenidos en el presente estudio, ya que también observamos la disminución de PDGF-AB en vasos sanguíneos a 28 días post-cirugía con el tratamiento de clg-pvp. Así, la fibroproliferación moderada, se puede deber al efecto de la clg-pvp sobre la expresión de citocinas, particularmente en el TGF- $\beta$ 1, ya que la cadena PDGF-A, como los receptores PDGF- $\alpha$  son inducidos por el TGF- $\beta$  (WAHL SM, 1994, MOULIN V, 1995). La expresión baja de TGF- $\beta$ 1 y de PDGF-AB, así como de la fibroproliferación sugieren que la regulación de proteínas de la MEC, tales como FN y colágena I y III podría estar regulada a nivel génico, por dichos mediadores amén de que no se afectó el balance de MMP-1/TIMP-1, lo cual es propio de la acción del TGF- $\beta$ 1, resultando en un recambio modulado de la MEC.

Los resultados obtenidos con el amortiguador de citratos y la clg-pvp se pueden relacionar con una producción reducida del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1). Esto tal vez produzca que el coágulo de FN/fibrina sea menos compacto, y que de esta forma se facilite la migración celular al sitio de la herida produciéndose una MEC con un patrón más reticular,

como ocurre cuando se usa el anticuerpo neutralizante anti-TGF- $\beta$ 1 en heridas agudas (SHAH et al., 1994).

Aparentemente, el fármaco altera el perfil temprano de citocinas en el proceso de cicatrización, y con ello el recambio de la MEC, lo que resulta en una neodermis menos compacta, pero mejor organizada donde la colágena se deposita en una forma reticular, característica propia de una dermis normal. De igual forma, al disminuir moderadamente la expresión de otras citocinas como el TNF- $\alpha$  en células dispersas a 7 días post-cirugía, y el PDGF-AB en vasos sanguíneos a 28 días post-cirugía, en el caso de los voluntarios tratados con clg-pvp, probablemente se promueva que el proceso de reparación sea más controlado y ordenado, ya que puede condicionar la disminución de la proliferación y migración de fibroblastos, neutrófilos y macrófagos, además de la angiogénesis, de la síntesis de colágena, elastina y otras proteínas de la MEC, mejorando la calidad de la remodelación, e inclusive disminuyendo el tiempo de reparación.

En un estudio se mostró que en ratas con implantes de esponjas de poliuretano se incrementaron los niveles endógenos de TNF- $\alpha$  y de IL-6 al tercer día de haberse colocado, para después disminuir gradualmente en los días 5, 8, y 13. En contraste los niveles de IL-1 $\beta$  alcanzaron su pico máximo durante el octavo día, y declinó su nivel en el 13<sup>o</sup> (MAST y SCHULTZ, 1996). Sin embargo, con la aplicación de clg-pvp, observamos baja inmunorreactividad de TNF- $\alpha$ , así como de IL-1 $\beta$  en las etapas tempranas de la cicatrización, lo que sugiere que el biofármaco, así como el placebo están disminuyendo la expresión de estas citocinas. El primero, a través de un mecanismo de inmunomodulación, ya que inhibe su expresión excesiva en células inflamatorias y del estroma; mientras que el segundo lo hace por inhibición de la agregación celular, tal como lo menciona SHANG y cols., (1998).

Asimismo, es posible que al no aumentar la expresión de TNF- $\alpha$  tampoco se induzca la síntesis de IL-1 $\beta$ , como ocurre en los fibroblastos humanos en condiciones normales (MAST y SCHULTZ, 1996). Por otro lado, existen algunos estudios que demuestran que la producción crónica de concentraciones bajas de TNF- $\alpha$  favorece la remodelación tisular (ABBAS et al., 1994), lo cual podría contribuir de manera adicional, al efecto de mejor reparación en las heridas tratadas con clg-pvp.

Además, la disminución en la producción de IL-1 $\beta$ , aún cuando no fue significativa, podría estar modificando la producción de otras muchas citocinas secundarias que amplifican la inflamación, como la IL-6 e IL-8 (CORK y DUFF, 1994; ABBAS et al., 1994).

En tanto que los niveles  
ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

elevados de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  estimulan directamente la producción de MMPs, por los macrófagos, fibroblastos y queratinocitos, mientras que la producción de TIMPs es inhibida. Estas proteasas degradan esencialmente los componentes de la MEC, los receptores de integrinas, los GFs, los receptores de factores de crecimiento (GFRs), todos los cuales intervienen durante la cicatrización (MAST y SCHULTZ, 1996).

Por su parte, el PDGF estimula la síntesis de FN, ácido hialurónico y GAGs (PIERCE *et al.*, 1992), por lo que su participación es importante durante la reparación. Aunque el tratamiento con el biofármaco disminuyó moderadamente su expresión en vasos sanguíneos a 28 días post-cirugía, esto no evitó la formación de una adecuada matriz, lo cual se evidenció en este trabajo por medio de histología. Aún así la calidad de la cicatriz mejora; y quizá su expresión a 7 días contribuya a regular la fase inflamatoria aguda de reparación, como lo hace el PDGF-BB estimulando una cascada de actividades por parte de GFs basadas en su capacidad quimiotáctica de monocitos y fibroblastos (PIERCE *et al.*, 1992).

El TNF- $\alpha$  induce la expresión de nuevos receptores de superficie celular en células endoteliales (entre ellos MAC), haciéndose posible la adhesión de neutrófilos y, subsecuentemente, de monocitos y linfocitos. También actúa sobre neutrófilos para aumentar su adhesión a células endoteliales (ABBAS *et al.*, 1994). Sin embargo, con el tratamiento *in vivo* con clg-pvp se mantuvo inalterada la expresión de VCAM-1, en los vasos sanguíneos e inclusive disminuyó en células dispersas a 7 días post-cirugía, por lo que se sugiere que la presencia incipiente de TNF- $\alpha$  no contribuyó substancialmente en el incremento de la expresión de MACs celulares ni vasculares.

Además, se sabe que las integrinas pueden funcionar como receptores estimuladores para monocitos y neutrófilos; en tanto que, la adherencia de monocitos a moléculas de la MEC induce la expresión de genes que codifican para mediadores inflamatorios (HYNES, 1992). De este modo, la disminución de la expresión de VCAM-1 en células dispersas observada en las heridas tratadas con clg-pvp sugiere que la activación, adhesión y síntesis de citocinas proinflamatorias sea el resultado de la acción del biofármaco. Sin embargo, se debe considerar que existen otras vías de adhesión que pueden facilitar la migración de células inflamatorias (CI).

Así, la reducción en el tamaño y número de focos inflamatorios a 7 días post-cirugía en el tratamiento con clg-pvp, probablemente tenga origen en la disminución de la migración de CI como neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos, etc., modulada por la expresión baja de



VCAM-1 en vasos sanguíneos y en células dispersas. Esto también puede relacionarse con el hecho de que haya una disminución de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$ , por lo que no se induce la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Lo anterior no interrumpe la migración celular hacia el sitio de la herida, pero ésta es moderada, posiblemente siguiendo la vía de migración del CD11/CD18 (LFA-1 o Mac-1; contrarreceptores de ICAM-1) (HYNES, 1992; DEFILIPPI *et al.*, 1993).

Estando estrechamente relacionadas la adhesión celular y la angiogénesis, la disminución de VCAM-1 también condiciona un decremento de la neovascularización, como sucede cuando se neutraliza esta MAC y/o a la selectina E (KOCH *et al.*, 1995) como también se observó en el tratamiento con clg-pvp. Por lo que, al no sobreexpresarse esta molécula, no es posible efectuar la interacción (VCAM-1/VLA-4) y por ende la extravasación y migración celular independiente de la vía CD11/CD18 (HYNES, 1992). Por otro lado, aún cuando VLA-4 se expresó abundantemente en vasos sanguíneos, tanto de las cicatrices tratadas con clg-pvp como con el placebo, esto no indica que la integrina se encuentre en forma activa y/o en interacción con sus ligandos.

Además, la disminución de la expresión de VCAM-1 en células dispersas sugiere que aún cuando algunas CI hayan logrado extravasarse, su migración se redujo a través del tejido conjuntivo, condicionando así a que el proceso inflamatorio se controlara sustancialmente (MASUMOTO y HEMLER, 1993; SHANG, 1998). Por lo que la inflamación mínima presente a los 7 días ya no se encuentra al cabo de 28 días, alcanzando un nivel de expresión de MACs semejante al inicial.

Por otro lado, la mayoría de las lesiones en piel cicatrizan rápido y eficientemente en 1 ó 2 semanas, sin embargo, en muchos casos el producto final puede no ser ni estético ni perfectamente funcional. Generalmente, los apéndices cutáneos que se han perdido durante el daño no se regeneran, y de los remanentes, por ejemplo de los folículos pilosos, se deriva gran parte de la epidermis, no obstante, la posibilidad de que se regeneren estos apéndices y glándulas afectadas es mínima (MARTIN, 1997). La herida se repara con tejido conjuntivo cicatrizal donde la matriz de colágena se reconstituye pobremente, en paquetes densos paralelos a la epidermis (MARTIN, 1997) como en el tratamiento con citratos, diferente de la disposición en red de la colágena y elastina, mecánicamente eficiente, como ocurre con el tratamiento a partir de clg-pvp.

De esta forma, la degradación de la MEC se requiere para remover el tejido dañado y las matrices provisionales y para permitir la formación de los vasos sanguíneos y la migración celular, siendo en estos procesos de remodelación donde actúan una gran variedad de proteasas (ULPU K. *et al.* 1993), las que son secretadas por las células activadas (PARKS WC, 1996) por agentes inflamatorios, como las citocinas ó por lipopolisacáridos (ULPU K, *et al.* 1993; PARKS WC, 1996). Así, la actividad colagenolítica se encuentra íntimamente relacionada con el proceso de cicatrización (INOUE *et al.*, 1995), en el cual los queratinocitos pueden degradar la colágena dérmica o de la membrana basal por medio de las colagenasas para ayudar a la migración y promover la reepitelización, mientras que, particularmente, la colagenasa intersticial puede estar relacionada con la remodelación del tejido de granulación y la formación de la cicatriz en la dermis (ULPU *et al.*, 1993; MARTIN, 1997).

La MMP-1 expresada moderadamente en las heridas tratadas con el cicatrizante clg-pvp, parece ser suficiente para remover el tejido dañado y contribuir en la reparación tisular (ULPU *et al.*, 1993). Al parecer, el uso de la clg-pvp no produjo cambios en la expresión de la MMP-1, ello puede deberse a la migración reducida y ordenada de queratinocitos promovida por la matriz temporal provista por la clg-pvp.

En relación con lo anterior, Moulin V (1995) ha demostrado que el empleo de EGF produce una matriz donde las proporciones de clg tipo I y III son semejantes a las de una piel normal, tal y como ocurre en los voluntarios tratados con clg-pvp; mientras que se observó una excesiva síntesis de proteínas de la MEC, particularmente de clg en los casos tratados con placebo, como ocurre en cualquier situación normal.

Aunado a esto surge otra posible acción de los citratos sobre la expresión de la MMP-1, y es que al ser ésta dependiente de  $Ca^{2+}$ , quizá el amortiguador de citratos produzca una quelación transitoria y temprana similar al efectuado por el EDTA (NELLY *et al.*, 1999), que repercuta en los niveles tardíos de la MMP-1 presentes en el sitio de la herida.

Por otro lado, el arreglo fibrilar elástico a 28 días post-cirugía obtenido con el tratamiento de clg-pvp produjo paquetes fibrilares en red, con orientación multidireccional, promoviendo la flexibilidad y resistencia del tejido en acción conjunta y coordinada con las fibras de colágena (TORRES-PERIS y MEDINA, 1990); esto también ayudó a que la unión dermis-epidermis fuera adecuada y resistente, para evitar el desprendimiento tisular (MORRIS *et al.*, 1997).

Con todo esto, el tratamiento de clg-pvp contribuyó a disminuir significativamente la expresión de citocinas (TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , PDGF-AB), además de considerarse que fue similar

el efecto de la clg-pvp y del amortiguador de citratos (placebo) en el caso de MACs, MMP-1 y TIMP-1 a 28 días. Esto, tal vez porque los citratos retardan el proceso de coagulación, haciendo que el coágulo de fibrina sea menos compacto, provocando un reclutamiento celular ordenado al sitio de la herida, que condicione la homeostasis del área afectada.

Sin embargo, histológicamente, el empleo del placebo no contribuyó a restaurar íntegramente el sitio de la lesión como lo hizo la clg-pvp, pero aún con esto no se descarta el efecto de los citratos como inhibidor de la expresión de algunas moléculas, ya que en otros estudios se ha comprobado que, comúnmente, se presenta un aumento en la expresión de MMP-1 y de elastasa de neutrófilos, así como del TIMP-1 (POSTLETWAITE *et al.*, 1988; INOUE *et al.*, 1995; WEST-MAYS *et al.*, 1995; MAST y SCHULTZ, 1996; FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.*, 2000). Además, también se presenta un aumento excesivo en la expresión de citocinas proinflamatorias y fibrogénicas como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PDGF, FGF, TGF- $\beta$ , etc., en un proceso de cicatrización normal (ROBERTS *et al.*, 1992; LEVINE *et al.*, 1993; KOVACS y DIPIETRO, 1994; MOULIN, 1995; SHUKLA *et al.*, 1999), situación que tampoco ocurrió con la aplicación de citratos, debido a que, en nuestro trabajo, presentó una expresión por debajo de la inicial sin ser estadísticamente significativa.

Por otro lado, también el efecto de los citratos respecto al de la clg-pvp es similar en la expresión de MACs a 28 días en vasos sanguíneos y células dispersas, no obstante esto no sucede normalmente pues es común una elevada expresión de MACs, que resulta en una infiltración celular masiva (FURUZAWA-CARBALLEDA *et al.*, 2000) para el pronto restablecimiento de la homeóstasis del área afectada.

Así, también, se puede destacar que al no existir diferencias en los parámetros clínicos de inflamación evaluados (dolor, calor, rubor, tumor) según una escala visual análoga a 7 y 28 días post-herida quirúrgica, entre los dos tratamientos, resulta entonces que el empleo del amortiguador de citratos como vehículo del biofármaco no altera el efecto cicatrizante de la clg-pvp, siendo ésta la responsable principal de la regulación de la expresión molecular de citocinas, MACs y del balance entre la MMP-1 y el TIMP-1, además de la promoción de un arreglo fibrilar histológico semejante al de una piel normal, ya que la acción temprana del fármaco sobre las heridas incisionales es preponderante para el desarrollo ulterior ordenado de todo el proceso de cicatrización, situación que no se suscita con el empleo exclusivo del amortiguador de citratos, sin embargo éste resulta mejor que los casos reportados donde no se aplica tratamiento alguno (VAN DORP *et al.*, 1999; TAY *et al.*, 2000).

De este modo, una cicatrización deficiente no sólo está asociada con resultados estéticos desagradables, sino también con problemas funcionales y costos elevados de servicios de salud, ya que la desregulación y la cicatrización excesiva puede producir contracturas, cicatrices queloides ó hipertróficas (SCHWADE *et al.*, 2000). Por lo que este modelo incisional agudo es importante y útil para identificar los factores involucrados en este tipo de cicatrización y, así poder ayudar a mejorar las condiciones de vida de los pacientes, con el empleo de la clg-pvp como una alternativa terapéutica que podría contribuir a ello (RODRÍGUEZ-CALDERÓN *et al.* 2001). Por todo esto, existen grandes motivos para seguir investigando la biología de la cicatrización, para conseguir que las heridas sanen, por ejemplo, como lo hacen las lesiones embrionarias: sin retraso, sin cicatriz y con regeneración completa de anexos cutáneos y pelo.

## CONCLUSIONES

- ❖ La administración de clg-pvp en heridas incisionales agudas promueve una disminución moderada de TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ 1 en vasos sanguíneos y, de este último, también en células dispersas a 7 días post-cirugía. Mientras que a 28 días post-cirugía disminuye el PDGF-AB en vasos sanguíneos y el TGF- $\beta$ 1 en células dispersas.
- ❖ La clg-pvp promueve la modulación a la baja de la vía VCAM-1/VLA-4, moderadamente, y por ende, la disminución del infiltrado inflamatorio, la cual se relaciona a su vez, con la disminución de la activación del endotelio.
- ❖ La clg-pvp regula la distribución y proporción de la MEC, particularmente de las colágenas tipo I y III y de elastina.
- ❖ La clg-pvp aumenta la velocidad del proceso de cicatrización y mejora la calidad del tejido *versus* el placebo, produciendo una arquitectura tisular semejante a la normal.

## CONCLUSIÓN

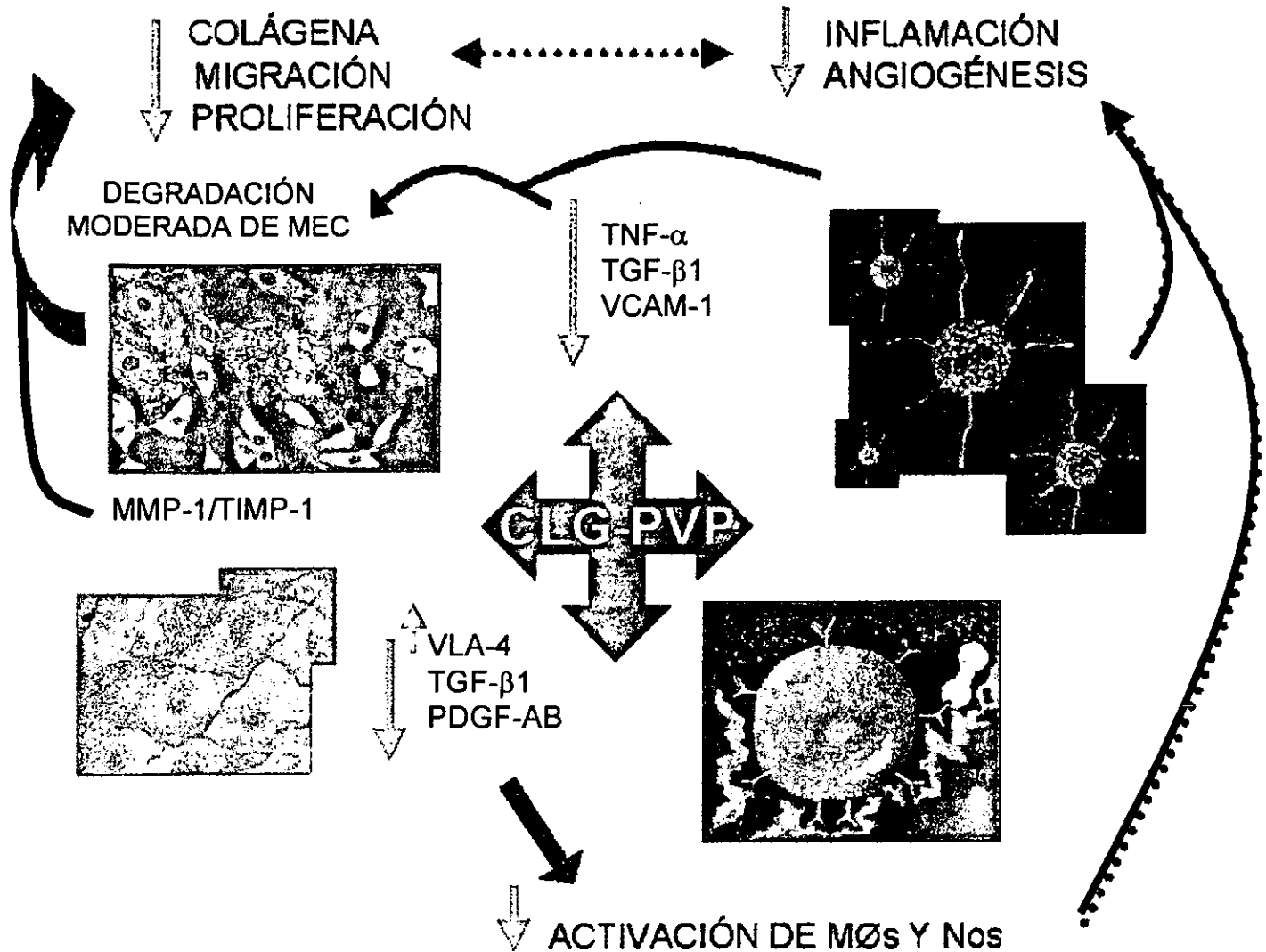


FIGURA 20. CONCLUSIÓN. Hipótesis del efecto de la clg-pvp sobre las diferentes estirpes celulares (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, neutrófilos, linfocitos), en las que disminuyó la síntesis de citocinas y la relación entre las moléculas de adhesión (VCAM-1 y VLA-4). Además de mantener inalterado el balance de MMP-1 y de TIMP-1. Condicionando así, una disminución moderada en la inflamación que repercute en la calidad y en la velocidad del proceso de cicatrización. [ $\downarrow$  disminución de CIR a los diferentes antígenos analizados, así como de otros parámetros;  $\hat{\uparrow}$  poco aumento de CIR(%);  $\rightleftarrows$  relación entre los efectos desencadenados por la acción de la clg-pvp en heridas incisionales].

## PERSPECTIVAS

Las perspectivas que se tienen después de este trabajo están enfocadas en los siguientes puntos:

- Evaluar el uso de la clg-pvp en la reparación tisular sobre otros órganos y sistemas.
- Conocer el (los) mecanismo(s) específicos de acción de este biofármaco, determinando las células blanco y efectoras de la clg-pvp en el proceso de cicatrización.
- Evaluar la participación de otras moléculas en los procesos de reparación tisular, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el endotelial vascular (VEGF), el de queratinocitos (KGF), entre otras.
- Identificar la(s) señal(es) intracelulares que podría inducir la clg-pvp.

**APÉNDICE****COLORANTES EMPLEADOS EN LA TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON.**

- a) Solución acuosa de sulfato de aluminio férrico o alumbre férrico
- |                   |          |
|-------------------|----------|
| Alumbre férrico   | 5.0 g    |
| dH <sub>2</sub> O | 100.0 ml |

Diluir el alumbre férrico en dH<sub>2</sub>O fría. Es una solución sobresaturada que requiere filtrarse.

- b) Hematoxilina de Regaud
- |                   |         |
|-------------------|---------|
| Hematoxilina      | 1.0 g   |
| Etanol al 95%     | 10.0 ml |
| Glicerol          | 10.0 ml |
| dH <sub>2</sub> O | 80.0 ml |

Disolver la hematoxilina en agua caliente, dejar enfriar y agregar etanol y glicerol. Esta solución es de color marrón. Si se desea se puede madurar 15 días o más.

- c) Ácido pícrico  
Solución saturada de ácido pícrico en etanol al 95% (Solubilidad: 1g/12 ml de etanol)

- d) Fucsina ácida
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| Fucsina ácida         | 0.5 g    |
| Ácido acético glacial | 0.5 ml   |
| dH <sub>2</sub> O     | 100.0 ml |

- e) Ácido fosfomolibdico
- |                      |          |
|----------------------|----------|
| Ácido fosfomolibdico | 1.0 g    |
| dH <sub>2</sub> O    | 100.0 ml |

- f) Azul de metilo
- |                       |          |
|-----------------------|----------|
| azul de metilo        | 2.0 g    |
| ácido acético glacial | 2.5 ml   |
| dH <sub>2</sub> O     | 100.0 ml |

Filtrar antes de usar.

- f1) Azul de anilina  
Solución saturada de azul de anilina en ácido acético al 2.5 %.



**COLORANTES PARA LA TINCIÓN PICROPOLICRÓMICA DE HEROVICI****Tinción nuclear**

## a) Azul celestino

Azul celestino	0.25g
Alumbre férrico	2.50 g
dH <sub>2</sub> O	50.0 ml

Calentar a ebullición por 3 min. Cuando el colorante se encuentre frío adicionar 10 ml de glicerol.

## b) Hematoxilina

Sulfato de aluminio	5.0 g
dH <sub>2</sub> O	100.0 ml

Calentar la solución y cuando empiece a ebullición adicionar lentamente 50 ml de una solución alcohólica de hematoxilina de Regaud al 1% (ver la preparación de la hematoxilina de Regaud).

Dejar calentar por 3 min. Enfriar y adicionar 100 ml de dH<sub>2</sub>O, 10 ml de una solución acuosa de cloruro férrico(FeCl<sub>3</sub>) al 4% y 1 ml de ácido clorhídrico (HCl) concentrado

## Hematoxilina de Regaud

Hematoxilina	1.0 g
Etanol al 95%	10.0 ml
Glicerol	10.0 ml
dH <sub>2</sub> O	80.0 ml

Disolver la hematoxilina en dH<sub>2</sub>O caliente, dejar enfriar y adicionar el etanol y el glicerol. Esta solución es de color marrón. Si se desea se puede madurar 15 días o más.

**Tinción citoplásmica**

c) Amarillo de metanilo		
Amarillo de metanilo		0.25 g
dH <sub>2</sub> O		60.0 ml
Ácido acético		250.0 $\mu$ l
d) Solución de ácido acético		
dH <sub>2</sub> O		60.0 ml
Ácido acético		250.0 $\mu$ l
e) Solución saturada de carbonato de litio		
dH <sub>2</sub> O		60.0 ml
Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>		100.0 $\mu$ l

**Tinción del tejido conjuntivo**

f) Mezcla picropolicrómica		
Solución 1.	Azul de metilo	0.05 g
	dH <sub>2</sub> O	50.0 ml
Solución 2.	Fucsina ácida	0.1 g
	Solución acuosa saturada de	
	Ácido pícrico	50.0 ml

Mezclar la solución 1 con la 2 y adicionar 10 ml de glicerol y 0.5 ml de una solución saturada de Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

**COLORANTES PARA LA TINCIÓN DE FIBRAS ELÁSTICAS SEGÚN EL MÉTODO DE VERHOEFF**

a)	Hematoxilina	5.0 g
	Etanol absoluto	100.0 ml
b)	Cloruro férrico	10.0 g
	dH <sub>2</sub> O	100.0 ml
c)	Solución de Lugol	
	Yodo	1.0 g
	Yoduro de potasio	2.0 g
	dH <sub>2</sub> O	100.0 ml
d)	Solución de trabajo	
	Solución (a)	20.0 ml
	Solución (b)	8.0 ml
	Solución (c)	8.0 ml

Adicionar en el orden anterior, agitando la mezcla entre cada adición.

**SOLUCIONES AMORTIGUADORAS (BUFFERS) PARA LAS INMUNOHISTOQUÍMICAS****Amortiguador salino de fosfatos 0.2 M (PB)**

## Solución 1.

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	6.95 g
dH <sub>2</sub> O	250.0 ml

Disolver la sal en un matraz aforado.

## Solución 2.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	53.65 g
dH <sub>2</sub> O	1000.0 ml

ó en su lugar

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	27.8 g
dH <sub>2</sub> O	1000.0 ml

Disolver la sal en un matraz aforado.

Verter la solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (fosfato de sodio monoácido hidratado) en un vaso de precipitados de 2.0 l.

Adicionar poco a poco la solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (fosfato de sodio diácido) y medir el pH, hasta llegar a 7.2. Guardar la solución a 4°C.

**PBS 0.01 M pH 7.2**

Solución de PB 0.2 M	50.0 ml
NaCl	8.5 g
dH <sub>2</sub> O	1.0 l

## REFERENCIAS

- ABBAS, A.K., A.H. LICHTMAN, J.S. PUEBER. 1994. Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders Company. USA. pp. 250-277.
- ANSEL, J.C., C.A. ARMSTRONG, C.E. HART. 1994. Platelet-derived growth factor. In: Epidermal growth factors and cytokines. Ed. T. A. LUGER & T. SCHWARZ. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 253-266.
- AYAD, S., R.P. BOOT-HANDFORD, M.J. HUMPHRIES, K.E. KADLER, C.A. SHUTTLEWORTH. 1998. The extracellular matrix. Facts Book, Academic Press. Great Britain. pp. 22-140.
- BATEMAN, J.F., S.R. LAMANDÉ, J.A.M. RAMSHAW. 1996. Collagen Superfamily. In: Extracellular matrix. Volume 2, Molecular Components and Interactions. Ed. W.D. Comper. Overseas Publishers Association. Amsterdam. pp. 22-67.
- BERMAN, B., M.R. DUNCAN. 1990. Pentoxifiline inhibits the proliferation of human fibroblasts derived from keloid, scleroderma, morphea skin and their production of collagen, glycosaminoglycans and fibronectin. Br J Dermatol. 123: 339-346.
- BRADBURY, P., K.C. GORDON. 1992. Connective tissues and stains. In: Theory and practice of histological techniques. Editors: John D. Bancroft, Alan Stevens. Churchill Livingstone. United Kingdom. pp. 119-142.
- CALVIN, M. 1998. Cutaneous wound repair. Wounds. 10 (1): 12-32.
- CORK, J.M., G.W. DUFF. 1994. Interleukin 1. In: Epidermal growth factors and cytokines. Ed. T. A. LUGER & T. SCHWARZ. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 19-44.
- CHARLES G.G. 1987. Advances in biomedical polymers. Plenum Press. USA. pp. 21-29.
- CHIQUET-EHRISMANN, R. 1995. Inhibition of cell adhesion by anti-adhesive molecules. Curr Op Cell Biol 7: 715-719.
- CHIMAL-MONROY, J., T. BRAVO-RUIZ, G.J. FURUZAWA-CARBALLEDA, J.M. LIRA, J.C. DE LA CRUZ, A. ALMAZÁN, F.E. KRÖTZSCH-GÓMEZ, G. ARELLÍN, L. DÍAZ DE LÉON. 1998. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat skull and promotes the expression of osteopontin and SPARC during bone repair of rat femora fractures. Ann NY Acad Sci. 857: 232-236.
- CHULUYAN, H.E., A.C. ISSEKUTZ. 1993. VLA-4 integrin can mediate CD11/CD18 –independent transendothelial migration of human monocytes. J Clin Invest 92(6): 2768-2777.
- CHULUYAN, H.E., L. OSBORN, R. LOBB, A.C. ISSEKUTZ. 1995. Domains 1 and 4 of vascular cell adhesion molecule – 1 (CD106) both support very late activation antigen – 4 (CD49d/CD29) – dependent monocyte transendothelial migration. J Immunol 155(6): 3135-3144.
- DARZI, M.A., N.A. CHOWDRI. 1992. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars, a 10 year follow up study. Br J Plast Surg. 45(5): 374-379.
- DAVIDSON, J.M. 1996. Proteinases in wound repair. In: Proteolysis in wound repair. Ed. G. Abatangelo, L. Donati, W. Vanscheidt. Springer-Verlag. Germany. pp. 1-12.
- DEFILIPPI, P., L. SILENGO, G. TARONE. 1993. Regulation of adhesion receptors expression in endothelial cells. Curr Topics Microbiol Immunol 184: 87-98.

- ELICES, M.J., L. OSBORN, Y. TAKADA, C. CROUSE, S. LUHOWSKYJ, M.E. HEMLER, R.R. LOBB. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4 fibronectin binding site. *Cell*. 60(4): 577-584.
- FORD, C.N. 1992. Role of injectable collagen in the treatment of glottic insufficiency: a study of 119 patients. *Ann Otorrino*. 101(3): 237-247.
- FURUZAWA-CARBALLEDA, J., J. ALCO CER VARELA, L. DÍAZ DE LEÓN. 1999. Collagen-PVP decreases collagen turnover in synovial tissue cultures from rheumatoid arthritis patients. *Ann NY Acad Sci*. 878: 598-603.
- FURUZAWA-CARBALLEDA, J., J. ALCO CER VARELA. 2000. Actualidades de las citocinas y moléculas de adhesión en la artritis reumatoide. *Sem Fund Esp Reum*. 1(5): 273-288.
- FURUZAWA-CARBALLEDA, J., J. ALCO CER VARELA. 2000. Las metaloproteasas y su impacto en la artritis reumatoide y la osteoartritis. *Sem Fund Esp Reum*. 1(3): 1-13.
- FURUZAWA-CARBALLEDA J, GONZÁLEZ-JÁCOME I, CORCHADO-GÓMEZ A, ARRELLÍN G, KRÖTZSCH E. La colágena-polivinilpirrolidona administrada localmente previene la formación de adherencias peritoneales en un modelo murino. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*. En prensa.
- GARCÍA DE VICUÑA, R., A. HUMBRÍA MENDIOLA, F. DÍAZ GONZÁLES, A. LAFFÓN. 1992. Adhesión leucocitaria al endotelio vascular: bases para la migración a la membrana sinovial inflamada. *Rev Esp Reumatol*. 19:388-398.
- GAU, J.X., A.C. ISSEKUTZ. 1997. The  $\alpha_4$ -integrin, very late activation antigen-4 on human neutrophils can contribute to neutrophil migration through connective tissue fibroblast barriers. *Immunology* 90(3): 448-454.
- GREEN, H. 1991. Cultured cells for the treatment of disease. *Sci Am* 265(5): 64-70.
- GÜNTHER, R.A., M. GRELL, P. SCHEURICH. 1994. Tumor necrosis factor. In: *Epidermal growth factors and cytokines*. Edited by: T.A. LUGER, & T. SCWARZ. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 63-83.
- HARALSON, M.A., J.R. HASSELL. 1995. The extracellular matrix. Haralson MA y JR Hassell, eds. Oxford University Press. Gran Bretaña : 4-11.
- HELDIN, C.H., L. CLAEISSON-WELSH, B. WESTERMARK. 1990. Platelet-derived growth factor and its receptors. In: *Growth Factors: from genes to clinical application*. Ed. V.R. SARA, K. HALL, H. LÖW. Raven Press. New York. pp. 41-49.
- HEROVICI, C. 1963. Polychrome stain for differentiation precollagen from collagen. *Stain Technol*. 38: 204-205.
- HOGG, N. 1993. Integrins and their ligands. *Curr Topics Microbiol Immunol* 184: 79-87.
- HYNES, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69(1):11-25.
- INOUE, M., G. KRATZ, A. HAEGERSTRAND, M. STAHL-BÄCKDAHL. 1995. Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stop at re-epithelialization. *The J Invest Dermatol* 104 (4): 479-483.
- ISAJI, M., N. ARUGA, J. NAITO, H. MIYATA. 1994. Inhibition by tranilast of collagen accumulation in hypersensitive granulomatous inflammation *in vivo* and of morphological changes and functions of fibroblasts *in vitro*. *Life Sciences* 55(15): 287-292.

- JOSS, U., D. VOGUEL. 1980. Mechanical properties of biomaterials. Collagen fleece as a biomaterial for mandibular defects. John Wiley & Sons. USA. 515-518.
- JOSS, U., G. OCHS, P.E. RIES. 1980. Influence of collagen fleece on bone regeneration. *Biomaterials*. 1: 23-25.
- KARAM, P., A.G. KIBY. 1992. Collagen injections. *Inter J Dermatol* 31(7): 467-470.
- KOCH, A.E., M.M. HALLORAN, C.J. HASKELL., M.R. SHAH, & P.J. POLVERINI. 1995. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature*. 376: 517-519.
- KOEHNLEIN, H.E. 1972. Effects of various hemostyptic drugs in rats. *Plast Reconst Surg* 50(5): 319.
- KOVACS E.J., L.A. DiPIETRO. 1994. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J*. 8: 854-861.
- KRÖTZSCH-GÓMEZ F.E., E. GUERRERO PADILLA, L. DÍAZ DE LEÓN H. 1993. Morphological studies on the effects of fibroquel during wound of surgical wounds in rats. *J. Cell Biochem*; 1993 supplement 17 E:137, R 506. (abstr).
- KRÖTZSCH-GÓMEZ F.E., J. FURUZAWA-CARBALLEDA, R. REYES MÁRQUEZ, E. QUIRÓZ-HERNÁNDEZ, L. DÍAZ DE LEÓN. 1998. Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinilpyrrolidone in hypertrophic scars. *J Invest Dermatol*. 111: 828-834.
- KRUTMANN, J. 1994. Regulatory Interactions between epidermal cell adhesion molecules and cytokines. In: *Epidermal growth factors and cytokines*. Ed. T.A. LUGER, & T. SCHWARZ. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 415-434.
- LAFFÓN, A. 1992. Moléculas de adhesión: características estructurales y funcionales. 1992. *Rev Esp Reumatol*. 19: 368-377.
- LATHA, B.,M. RAMAKRISHNAN, V. JAYARAMAN, M. BABU. 1999. Physicochemical properties of extracellular matrix proteins in post-burn human granulation tissue. *Comp Biochem Physiol B* 124: 241-249.
- LAWRENCE, W.T. 1991. In search of the optimal treatment of keloids: report of a series a review of the literature. *Ann Plast Surg*. 27 (2): 164-178.
- LEVER, W.F., G. SCHAUMBURG-LEVER. 1990. *Histopathology of the skin*. J.B. Lippincott. 7<sup>th</sup> Edition. pp. 4-34.
- LEVINE. J.H., H.L. MOSES, L.I. GOLD, L.B. NANNEY. 1993. Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3 during excisional wound repair. *Am J Pathol* 143 (2): 368-380.
- MARTIN, P. 1997. Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 276: 75-81.
- MAST, B.A. 1992. The skin. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, eds. *Wound Healing Biochemical & Clinical Aspects*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company: 344-355.
- MAST, B.A., G.S. SCHULTZ. 1996. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*. 4: 411-20.
- MASUMOTO, A., M.E. HEMLER. 1993. Multiple activation states of VLA-4. *J Biol Chem*. 268 (1):228-234.
- MATRISIAN, L.M. 1990. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *TIG*. 6(4):121-125.

- MAUCH, C., T. OONO, B. ECKES, T. KRIEG. 1994. Cytokines and wound healing. In: Epidermal growth factors and cytokines. Ed. T.A. LUGER, & T. SCHWARZ. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 325-344.
- McEVER, R.P. 1992. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Curr Op Cell Biol* 4: 840-849.
- MESSADI, D.V., A. LE, S. BERG, G. HUANG, W. ZHUANG, C.N. BERTOLAMI. 1998. Effect of TGF-beta 1 on PDGF receptor expression in human scar fibroblasts. *Frontiers in Bioscience*. 3: 16-22.
- MORRIS, D.E., L. WU, L.L. ZHAO, L. BOLTON, S.I. ROTH, D.A. LADIN, T.A. MUSTOE. 1997. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies. *Plast Reconstr Surg*. 100: 674-681.
- MOSES, H.L. 1990. The biological actions of transforming growth factor  $\beta$ . In: Growth Factors: from genes to clinical application Ed. V.R. SARA, K. HALL, & H. LÖW. Raven Press. New York. pp. 141-155.
- MOULIN, V. 1995. Growth factors in skin wound healing. *Europ J Cell Biol*. 68: 1-7.
- MURPHY, G. 1996. The biochemical and cellular functions of the matrix metalloproteinases. In: Proteolysis in wound repair. Ed. G. Abatangelo, L. Donati, W. Vanscheidt. Springer-Verlag. Germany. pp. 13-19.
- NELLY, A.N., C.E. CLENDENING, J. GARDNER, D.G. GREENHALGH, G.D. WARREN. 1999. Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Rep Reg* 7: 166-171.
- PARKS, W.C. 1996. Interstitial Collagenase in the healing epidermis. In: Proteolysis in wound repair. Ed. G. Abatangelo, L. Donati, W. Vanscheidt. Springer-Verlag. Germany. pp. 21-35.
- PEACOCK, E.E. Jr., W. VAN WINKLE, Jr. 1970. Surgery and biology of wound repair. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp. 14-16.
- PEPINSKY B., A. JAKUBOWSKY, E. PINGCHANG CHOW, C. BENJAMIN, G. CHI-RUSSO, S. LUHOWSKYJ and R. LOBB. 1992. Estructure/functions studies on vascular cell adhesion molecule-1. *J Biol Chem*. 267(25): 17820-17826.
- PIERCE, G.F., T.A. MUSTOE, J. LINGELBACH, V.R. MASAKOWSKI, G.L. GRIFFIN, R.M. SENIOR, T.F. DEUEL. 1989. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J Cell Biol*. 109: 429-440.
- PIERCE, G.F., J.E. TARPLEY, D. YANAGIHARA, T.A. MUSTOE, G.M. FOX, A. THOMASON. 1992. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor- $\beta$ 1, and basic growth factor in dermal wound healing. *Am J Pathol*. 140 (6): 1375-88.
- POSTLETHWAITE, A.E., R. RAGHOW, G.P. STRICKLIN, H. POPPLETON, J.M. SEYER, A.H. KANG. 1988. Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 $\alpha$  and  $\beta$ . *J Cell Biol* 106: 311-318.
- PULIDO, R., M.J. ELICES, M.R. CAMPANERO, L. OSBORN, S. SCHIFFER, A. GARCÍA-PARDO, R. LOBB, M.E. HEMLER, F.S. MADRID. 1991. Functional evidence for three distinct and independently inhibitable adhesion activities mediated by the human integrin VLA-4. *J Biol Chem*. 266 (16): 10241-10245.
- RAGHOW, R., A.E. POSTLETHWAITE, J. KESKI-OJA, H.L. MOSES, A.H. KANG. 1987. Transforming growth factor- $\beta$  increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 79: 1285-1288.



- RAPALA, K., J. PELTONEN, J. HEINO, H. KUJARI, J.P. PUJOL, J. NIINIKOSKI, M. LAATO. 1997. Tumor necrosis factor- $\alpha$  selectively modulates expression of collagen genes in rat granulation tissue. *Eur J Surg* 163: 207-214.
- ROBERTS, A.B., B.K. McCUNE, M.B. SPORN. 1992. TGF- $\beta$ : regulation of extracellular matrix. *Kidney International* 41: 557-559.
- ROBINSON, B.V., F.M. SULLIVAN, J.F. BORZELLECA, S.L. SCHWARTZ. 1990. PVP. A critical review of the kinetics and toxicology of polyvinylpyrrolidone (Povidone). Lewis Publishers. USA. pp. 1-21.
- RODRÍGUEZ-CALDERÓN R, FURUZAWA-CARBALLEDA J, CORCHADO A, KRÖTZSCH E. 2001. Collagen-polyvinylpyrrolidone promotes human wound healing through cytokine downmodulation. *Wound Rep Reg* 9 (2): 166.
- ROSALES, C., R.L. JULIANO. 1995. Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leuk Biol.* 57: 189-198.
- ROSS, M.H., L.J. ROMRELL, G.I. KAYE. 1997. *Histología. Texto y atlas color.* Panamericana. México, D.F. 817 p.
- ROSS, R., E.W. RAINES. 1990. Platelet-derived growth factor and cell proliferation. In: *Growth Factors: from genes to clinical application.* Ed. V.R. SARA, K. HALL, & H. LÖW. Raven Press. New York. pp. 193-199.
- SCHWADE, N.D., J.J. FOWLER, J. LEACH. 2000. The Effects of TGF- $\beta_3$  modulation on scar tissue formation in the pig. *Wounds* 12(2): 32-39.
- SHAH, M., D.M. FOREMAN, M.W.J. FERGUSON. 1994. Neutralising antibody to TGF- $\beta_{1,2}$  reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci* 107: 1137-1157.
- SHANG, X.Z., B.J. LANG, AC. ISSEKUTZ. 1998. Adhesion molecule mechanisms mediating monocyte migration through synovial fibroblast and endothelium barriers: role for CD11/CD18, very late antigen-4 (CD49d/CD29), very late antigen-5 (CD49e/CD29) and vascular cell adhesion molecule-1 (CD106). *J Immunol.* 160: 467-474.
- SHIMIZU, Y., Y. MIYAMOTO, T. TERAMATSU. 1978. Studies on composites of collagen and a synthetic polymer. *Biom Med Dev Art Org.* 6 (4).
- SHUKLA, A., N. MEISLER, K.R. CUTRONEO. 1999. Transforming growth factor  $\beta$ : crossroad of glucocorticoid and bleomycin regulation of collagen synthesis in lung fibroblasts. *Wound Rep Reg* 7:133-140.
- SODERBERG, T., G. HALLIMANS, L. BARTHOLDSON. 1982. Treatment of keloids and hypertrophic scars with adhesive zinc tape. *Scand J Plast Reconst Surg.* 16: 261.
- SONNENBERG, A. 1993. Integrins and their ligands. *Curr Topics Microbiol Immunol* 184: 7-35.
- TAY, A.G., P.T. THANG, P. SEE, L.S. TEIK, C. SONG, 2000. Cultured subconfluent keratinocytes on wound polymer dressings in the treatment of burns and chronic wounds. *Wounds* 12 (5): 123-129.
- TORRES PERIS, V., A.A. MEDINA. 1990. Fibras elásticas. *Piel.* 5: 36.45.
- ULPU, K., SAARIALHO-KERE, S.O. KOVAKS, A.P. PENTLAND, J.E. OLERUD, H.G. WELGUS, W.C. PARKS. 1993. Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *J Clin Invest* 92(6): 2858-2866.

- VAN DORP, A.G.M., M.C.H. VERHOEVEN, T.H. VAN DER NNAT-VAN DER MEIJ, H.K. KOERTEN, M. PONEC. 1999. A modified culture system for epidermal cells for grafting purposes: an *in vitro* an *in vivo* study. *Wound Rep Reg* 7: 214-225.
- VESTWEBER, D. 1993. The selectins and their ligands. *Curr Topics Microbiol Immunol* 184: 65-75.
- VITELLARO-ZUCCARELLO L., S. CAPPELLETTI, V.D.P. ROSSI, M. SARI-GORLA. 1994. Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: variability with age, sex, and body region. *The Anatom Rec* 238: 153- 162.
- VONDEHEIDE, R.H., T.A. SPRINGER. 1992. Lymphocyte adhesion through very late antigen-4: evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional  $\alpha_4$  integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J Exp Med* 175 (6): 1433-1442.
- WAHL, S.M. 1994. Regulation of tissue inflammation, repair, and fibrosis by transforming growth factor beta. In: *Epidermal growth factors and cytokines*. Ed. T.A. LUGER, & T. SCHWRAZ. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 241-252.
- WAHL, S.M. 1994. Transforming growth factor  $\beta$ : the good, the bad and the ugly. *J Exp Med* 180: 1587-1590.
- WANG, X., M. POLO, F. KO, M.C. ROBSON. 1998. Endogenous TGF- $\beta$  1 gene and protein changes during human partial thickness wound healing. *Wounds*. 10 (3): 76-82.
- WARD, P.A., M.S. MULLIGAN. 1994. Blocking of adhesion molecules *in vivo* as anti-inflammatory therapy. *Therapeut Immunol*. 1:165-171.
- WEST-MAYS, J.A., K.J. STRISSEL, P.M. SADOW, M.E. FINI. 1995. Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of an interleukin 1 $\alpha$  autocrine loop. *Proc Natl Acad Sci*. 92: 6768-6772.
- YUROCHKO, A.D., D.L. LIU, D. EIERMAN, S. HASKILL. 1992. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc Natl Acad Sci* 89: 9034-38.