



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN.

**“EFECTO DEL QUITOSÁN EN LA CICATRIZACIÓN DE PIEL UTILIZANDO
COMO MODELO, UNA INCISIÓN QUIRÚRGICA A NIVEL DE LÍNEA
MEDIA EN LA REGIÓN INFRAUMBILICAL EN PERRAS”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

P R E S E N T A N:
LUIS EDUARDO ALVAREZ YAÑEZ.
ISMAEL MADIN AMBROSIO.

ASESOR: Dra. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO.
COASESORES: M.V.Z. JORGE TORRES MARTÍNEZ.
M en C. ESPERANZA GARCIA LÓPEZ.

CUAUTITLAN, IZACALLI, ESTADO DE MEXICO 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo Cuatro, de la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos mis profesores por el apoyo y el espacio otorgados en mi formación personal.

A la Doctora Patricia Miranda Castro por la dirección, confianza y el apoyo brindados durante todo el proceso de este trabajo, ya que sin ella esto no se hubiera podido lograr.

Al MVZ. Jorge Torres Martínez por su valiosa y gran asesoría en la parte histológica de este trabajo y a su gran apoyo durante toda mi formación académica.

A la M en C. Esperanza García López porque ella me llevo a realizar este trabajo.

Al MVZ. Germán Garrido Fariña por el apoyo técnico en el tratamiento de las muestras de histológicas en el laboratorio de apoyo a histología en la FESC-4.

Al Técnico Rodolfo Robles por el apoyo técnico proporcionado en el laboratorio de Microscopia Electrónica de Campo 1.

Al Dr. Marcelino Rosas García por su valiosa ayuda en los datos estadísticos de esta tesis.

DEDICATORIA.

A dios por haberme dado la fortaleza y haberme permitido culminar con mi carrera.

A mis padres Jose Alvarez Torres y Margarita Yañez Sánchez por todo el apoyo, por todo su amor, por todo su cariño, por toda su paciencia, porque siempre estuvieron conmigo apoyándome en los buenos y malos momentos y sobre todo por toda la confianza incondicional que me brindaron durante toda la carrera esto y todo lo que soy se lo debo a ustedes, gracias por ser los mejores padres del mundo los amo.

A mi hermano Jose Angel Alvarez Yañez por creer siempre en, mí por tu apoyo, porque siempre estuviste conmigo, por tu comprensión por todos los momentos que pasamos felices este triunfo en parte también es tuyo.

A mi hermana Fabiola Alvarez Yañez por tu apoyo y comprensión en los momentos difíciles por creer en mí y sobre todo por estar cuando necesitaba hablar con alguien.

A Sonia Bravo Gonzales por todo tu amor, tu cariño, comprensión, por tu incondicional apoyo gracias.

A mi abuela Dolores Torres Ponce por todo el cariño y amor que me dio.

A mi abuela Paula Sánchez Gonzales por su apoyo durante su mi niñez.

A mi tío Jose Torres Ponce por todo su amor y cariño.

A mi tía Francisca Yañez Sánchez por su humildad y por siempre ofrecerme su casa y su cariño.

A mi tía María Alvarez Torres por su apoyo y cariño durante mi niñez.

A mi tío Antonio Alvarez Torres por ser como mi segundo padre.

A los que fueron mi segunda familia los Strongylus: Alejandro, Antonio, Cesar, Citlalli, Daniel, Francisco, Hipólito, Ismael, Jorge, Magali, Manuel, Marcos, Oscar S., Oscar L., Otoniel, Pablo, Raúl, Ricardo, Rómulo, Ulises, Yabin por que sin ustedes no habría sido lo mismo y por los momentos inolvidables que vivimos día con día.

A las personas que nunca creyeron en mí porque eso me hizo superarme día con día y demostrarles que se equivocaron al no creer en mí.

Luis Eduardo Alvarez Yañez.

DEDICATORIA.

Mi carrera esta dedicada a dios

A mi padre Ismael Madin Castillo, que siempre me apoyo durante toda la carrera y además le gustaba mi carrera

A mi mama Febe Ambrosio Aragón que sin el apoyo no hubiera estudiado y salido adelante durante la carrera y hasta en momento

A mis hermanos Pedro, Pati, Perla, que me apoyaron con muchas cosas durante todo este tiempo.

A mis 2 tías las enchiladitas.

A los Strongylus: Agustín, Alejandro, Antonio, Cesar, Citlalli, Daniel, Edgar Caín como mi segundo hermano , Francisco, Hipólito, Javier Moreno, Jorge, Lizbeth, Magali, Manuel, Marcos, Oscar S., Oscar L., Otoniel, Pablo, Raúl, Ricardo, Rómulo, Ulises, Villa, Yamin por que sin ustedes no habría sido lo mismo y por los momentos inolvidables que vivimos día con día.

Ismael Madin Ambrosio.

"La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica." Aristóteles.

"Todos los hombres de manera natural desean saber". Aristóteles.

ÍNDICE GENERAL.

RESUMEN.	1.
INTRODUCCIÓN	2.
1.1.-PIEL.	3.
1.2.-CICATRIZACIÓN.	8.
1.3.-TEJIDO CONECTIVO.	13.
2.- PRINCIPIOS ACTIVOS UTILIZADOS EN MEDICINA VETERINARIA PARA LA CICATRIZACIÓN.	24.
3.- QUITOSÁN.	25.
3.1.-APLICACIONES.	26.
4.- OBJETIVOS.	28.
5.- METODOLOGÍA.	29.
6. MATERIALES.	30.
6.1.-TOMA DE BIOPSIA.	33.
6.2.-PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN BLOQUES DE PARAFINA.	34.
6.3.-TINCIÓN.	36.
6.4.- OBSERVACIÓN, MEDICIÓN Y LECTURA DE LAMINILLAS.	37.
6.5.- OBTENCIÓN DE HISTORIA CLÍNICA.	38.
7.- RESULTADOS.	43.
7.1.-COMPARACIÓN MACRÓSCOPICA DE LA EVOLUCIÓN DE LA CICATRIZACIÓN.	43.
7.2.- RESULTADOS DE CELULARIDAD.	47.
7.3.-RESULTADO DE LAS EVALUACIONES HISTOLÓGICAS.	52.
8.- DISCUSIÓN.	56.
9.- CONCLUSIONES.	58.
10.-BIBLIOGRAFÍA.	59.

ABREVIATURAS.

µm.	Micrómetro.
(NCF).	Factor quimiotàctico de los eosinòfilos.
g.	Gramos.
c.b.p.	Cuanto baste para.
ml.	Mililitros.
g/l.	Gramos por litro.
cm ³ .	Centímetros cúbicos.
Kg.	Kilogramos.
Cm.	Centímetros.
h.	Horas.
H-E.	Hematoxilina Eosina.
Ia.	Proteína del complemento.
Fc.	Factor cristizable.
C3.	Proteína del complemento.

RESUMEN.

En el ensayo se trataron 10 perras de entre 2 y 4 años de edad a las cuales se les realizaron incisiones quirúrgicas a nivel de línea media en la región infraumbilical y en 6 de ellas se utilizó quitosán como cicatrizante durante 8 días. En los cuales se observó microscópicamente la incisión y su evolución. Para el diagnóstico de profundidad de la cicatrización se realizaron biopsias, grupo de ensayo (1): 7 pacientes, grupo control (1): pacientes que no se les aplicó quitosán. Obtención de biopsias durante el proceso y finalización de la cicatrización.

Se preparó el gel de quitosán para aplicarlo como acelerador de la cicatrización, se aplicó este durante 8 días, se realizó un monitoreo macroscópico de la cicatrización

Se realizaron las cirugías en la FES Cuautitlán, se extrajeron quirúrgicamente las biopsias del tejido de la cicatrización a diferentes tiempos de las perras tratadas y no tratadas con quitosán y fueron observadas al microscopio para ver los procesos celulares y tisulares que intervinieron en la evolución de la cicatrización.

Se comprobó las características desinflamatorias del quitosán a través del estudio histológico.

Se realizó una comparación de medias con muestras pareadas con un estudio de T-Student.

En donde los resultados nos demuestran que la utilización de quitosán, reduce la distancia entre bordes y la profundidad de la incisión en comparación con los animales que no se les aplicó quitosán.

También nos demuestra una cicatrización más rápida en comparación con la bibliografía.

INTRODUCCIÓN.

La quitina es un polisacárido, insoluble que constituye el exoesqueleto de los Artrópodos (crustáceos, algunos moluscos e insectos) y las paredes de las células de muchos hongos y algas. La quitina es el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa. El quitosán es generalmente obtenido por la desacetilación de la quitina natural. Es un producto natural no tóxico y biodegradable.

Recientemente se ha generado mucha atención al uso del quitosán en las aplicaciones veterinarias como agente curativo de heridas, agente antimicrobiano, material de vendaje, en sustitución de injerto de piel y como agente hemostático.

Existen algunos estudios llevados a cabo por diferentes grupos, que muestran que la quitina y el quitosán aceleran la cicatrización de heridas en casos veterinarios clínicos y ya se han comercializado productos que contienen este material, para el tratamiento de heridas.

En la mayoría de estos estudios, se ha usado a la quitina y el quitosán como los filamentos, polvos, gránulos, esponjas o como un compuesto con algodón o poliéster. Sin embargo, son muy pocos los estudios acerca de los eventos que se generan en la aceleración de la cicatrización, y por tal razón, este trabajo está enfocado a evaluar macroscópicamente a través de fotografías y microscópicamente a través del conteo de células a través del tiempo de biopsias en la herida (fibroblastos, polimorfonucleares, macrófagos, células plasmáticas, linfocitos), así como mediciones de la distancia entre bordes, profundidad de la incisión, presencia o ausencia de costra y coágulo, y tamaño de costra o coágulo, durante la evolución de la cicatrización de la piel usando quitosán en forma de gel en una incisión quirúrgica a nivel de línea media en la región infraumbilical en perras.

1.1.-PIEL.

La piel cubre la superficie del cuerpo y está constituida por dos capas principales: el epitelio superficial o epidermis y la capa de tejido conectivo subyacente, el corion o dermis. Protege al organismo contra lesiones y la desecación, recibe estímulos del ambiente, en los animales de sangre caliente; participa en la termorregulación y en el mantenimiento del equilibrio hídrico (3). Es la principal barrera de defensa contra gérmenes y otros factores externos, control de la temperatura corporal, tacto y sensibilidad, excreción y absorción. Las funciones específicas de la piel dependen en gran medida de las propiedades de la epidermis. Este epitelio forma una cubierta celular ininterrumpida por toda la superficie externa del cuerpo. Sus células producen una proteína fibrosa, la queratina, que es esencial para la función protectora de la piel, y también la melanina, el pigmento que protege contra la irradiación de los rayos ultravioleta. La epidermis presenta un epitelio estratificado escamoso queratinizado derivado del ectodermo (11). En la organización estructural de la epidermis pueden distinguirse cinco capas principales:

Estrato basal: Está formado por una capa de células que reposan sobre la lámina basal y la dermis subyacente. Sus células son poliédricas o columnares. El núcleo es relativamente grande y su citoplasma basófilo. Son frecuentes las figuras de mitosis en esta capa llamada también estrato germinativo por la proliferación de sus células es la principal responsable de la continua renovación de la epidermis. A medida que las células generadas aquí se mueven hacia arriba, hacia el estrato espinoso, adquieren una forma poliédrica con su núcleo esférico u ovoide (3).

Estrato espinoso: Es la capa más gruesa de la epidermis con un epitelio de células poliédricas y presentan una gran cantidad de desmosomas (11).

Estrato granular: Está formado por tres a cinco capas de células romboides cuyo rasgo distintivo es la presencia de gránulos gruesos, de forma irregular, que se tiñen intensamente con los colorantes básicos y por ejemplo (hematoxilina). Estos son gránulos de queratohialina (3).

Estrato lúcido: Es una capa que solo existe en la piel gruesa, se distingue como una delgada zona muy eosinófila entre el estrato granuloso y el estrato córneo (11,12,15).

Está compuesta por escasas capas de células aplanadas densamente empaquetadas.

Los núcleos comienzan a degenerar en las células externas del estrato granuloso y desaparecen en el estrato lúcido, donde el contorno del núcleo sólo se distingue en células aisladas.

Estrato córneo: Está formado por capas de células planas y cornificadas. Las células carecen de núcleo y solo se conservan unos pocos de organelos (3,11,12,15).

Tipos celulares de la epidermis.

Queratinocitos: El tipo celular principal de la epidermis y de los otros epitelios planos estratificados se llama queratinocito, a causa de su capacidad de sintetizar queratina (3).

Melanocitos: El conjunto de estas células constituyen el sistema pigmentario de la piel (11). Se originan en las células de la cresta neural. Se localizan en el estrato basal aunque pueden estar también en las porciones superficiales de la dermis y extender sus prolongaciones hacia la epidermis entre los queratinocitos. Los Melanocitos producen melanina, pigmento pardo que imparte diversas tonalidades de este color a la piel. La **tirosinasa**, enzima que poseen los melanocitos, es esencial para la síntesis de melanina. Se encuentra localizada en organitos especiales, conocidos como **melanosomas**, situados dentro del citoplasma de los melanocitos. La **tirosina** que se transporta hacia los melanosomas, se convierte en **melanina** por acción de la tirosinasa (11).

Células dendríticas (Langerhans): En la actualidad se sabe que estas células consideradas antes derivadas de las células de la cresta neural, se originan en precursores de la médula ósea. Aunque son capaces de entrar en mitosis, está restringida en ellas esta actividad; por tanto, las restituyen continuamente células precursoras que dejan la sangre para emigrar hacia la epidermis y diferenciarse en células de Langerhans, presentan núcleo denso citoplasma pálido y prolongaciones delgadas y largas que salen desde el cuerpo celular, característico de estas células son los gránulos de Birbeck (gránulos vermiformes) (11).

Recientemente se han acumulado pruebas que indican que participan en las respuestas inmunes del organismo. Se ha demostrado que poseen, igual que los macrófagos, receptores de superficie Ia, Fc y C3 (3).

Se sabe que las células de Langerhans pueden participar en la presentación de antígenos a los linfocitos y en los procesos inmunoproliferativos de los ganglios linfáticos regionales. Se sabe que son unos protagonistas importantes en las respuestas alérgicas de contacto y en otras reacciones mediadas por células (3).

Células de Merkel: Aparecen en pequeño número en la parte basal de la epidermis. Tienen un parecido superficial con los queratinocitos. Las células de Merkel tienden a

estar presentes en áreas donde la epidermis está particularmente bien vascularizada y ricamente inervada.

En razón de su contenido de vesículas de núcleo denso y de su estrecha relación con terminaciones nerviosas, se considera ahora que las células de Merkel son paraneuronas implicadas en la percepción sensorial (3).

La dermis se deriva del mesoderma (11). Es la capa gruesa de tejido conectivo a la que se fija la epidermis y que se continúa en profundidad con el tejido subcutáneo con abundante tejido adiposo. En el tejido conectivo dérmico se insertan los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y sebáceas (11,12,15).

La dermis se compone de dos capas no muy diferenciadas, hacia arriba el estrato papilar, más delgado y por debajo el estrato reticular, más grueso (11,12,15).

El **estrato papilar** se compone de tejido conectivo laxo con gran cantidad de células y un reticulado laxo de delgadas fibras de colágeno (sobre todo colágeno tipo III).

El **estrato reticular** se compone de tejido conectivo colágeno compacto irregular, la fibra más importante es de colágeno tipo I dispuestas en grandes haces entre cruzadas. Además de las fibras de colágeno, la dermis contiene abundantes fibras elásticas que forman un reticulado entre los haces de colágeno. Las células que se encuentran con mayor frecuencia son fibroblastos y macrófagos, pero también hay gran cantidad de mastocitos involucrados en la respuesta inmunológica (11,12,15). Los fibroblastos son responsables de la síntesis y remodelación de las principales fibras (colágeno y elastina) presentes en la dermis. Entre otras funciones de la dermis se encuentran la regulación del crecimiento y la proliferación celular, la adhesión, la migración, diferenciación y curación de las heridas (3). La gran cantidad de colágeno confiere a la dermis una notable fortaleza mecánica, muy importante para su función protectora. (12).

GLANDULAS DE LA PIEL.

1) Glándulas sudoríparas.

Tomando como base su morfología y características funcionales, las glándulas sudoríparas se dividen en dos tipos: apocrino y merocrino (ecrino) (11).

Son glándulas tubulares simples o tubulares enrolladas simples y un conducto recto. La porción secretora tiene una gran luz revestida por células epiteliales cuboides o columnares bajas, dependiendo del estado de su actividad secretora. Su citoplasma puede contener glucógeno, lípidos o gránulos de pigmento. Las glándulas apocrinas de los animales domésticos se localizan a lo largo de la mayor parte de la piel (7).

En el caballo dichas glándulas son bastante activas y producen sudoración visible durante el ejercicio y temperaturas elevadas. En otras especies la secreción es escasa y apenas perceptible. En el perro y gato las glándulas pueden ser tortuosas o en espiral.

La función de las glándulas apocrinas es producir una secreción viscosa que tiene un olor que permite la comunicación entre especies, probablemente como un atractivo sexual o un marcador territorial (11).

Las glándulas merocrinas son glándulas que se encuentran principalmente en áreas especiales de la piel tales como las almohadillas plantares del perro y gato. Son siempre glándulas tubulares que se abren directamente sobre la superficie de la piel y en los folículos pilosos. La porción secretora está formada de epitelio cúbico con dos tipos diferentes de células. Las células oscuras o mucoides tienen una mayor cantidad de ribosomas que las células claras y numerosas gotitas se presentan en la parte apical de la célula (7).

2) Glándulas sebáceas.

Pueden ser alveolares simples o alveolares ramificadas que liberan su producto de secreción, el sebo, por el modo holocrino. Frecuentemente están asociadas con los folículos pilosos en los que desembocan sus conductos para formar el canal pilosebáceo del conducto piloso. La unidad secretora se compone de una masa sólida de células epidérmicas encerradas por una vaina de tejido conectivo, que se une a la dermis que la rodea. En la periferia de la masa glandular, una capa simple de células cúbicas descansa sobre la lámina basal. El sebo se deriva de la desintegración de las células y pasa al interior de la luz del folículo piloso mediante un conducto corto revestido por epitelio estratificado escamoso.

El sebo, es una secreción oleosa formada por una mezcla de lípidos, actúa como un agente antibacteriano y, en los mamíferos con pelo, como agente protector de la humedad (7).

El tejido conectivo, como su nombre lo implica, forma una continuidad con tejido epitelial, músculo y tejido nervioso, lo mismo con otros componentes de este tejido para conservar al cuerpo integrado desde el punto de vista funcional. La mayor parte del tejido conectivo se origina en el **mesodermo** capa germinal media del embrión. A partir de esta capa se desarrolla el mesénquima, compuesto por las células multipotenciales embrionarias. Estas células mesenquimatosas emigran por todo el cuerpo y originan el tejido conectivo y sus células, incluso huesos, cartílagos, tendones, cápsulas, células sanguíneas, hematopoyéticas, células linfoides etc. (11).

El tejido conectivo de la piel está altamente irrigado en todo el aparato circulatorio la pared vascular posee un revestimiento interno liso compuesto de célula endoteliales (endotelio).

Una **célula endotelial** es un tipo de célula aplanada que recubre el interior de los vasos sanguíneos y sobre todo de los capilares, formando parte de su pared.

El núcleo de las células endoteliales está muy aplanado y por eso aparece elíptico en los cortes visualizados al microscopio. La región nuclear y más gruesa de la célula hace prominencia en la luz. La porción periférica y más delgada de la célula es tremendamente fina, y las membranas que miran a la luz o al tejido están separadas por una capa de citoplasma de un grosor de 0,2 a 0,4 micras (11).

1.2.- CICATRIZACIÓN.

La cicatrización de las heridas es la restauración biológica de la estructura y función orgánica. Se caracteriza por procesos celulares y metabólicos que se producen en una secuencia relativamente constante. La cicatrización puede ocurrir por medio de varios caminos (16).

Primera intención o cicatrización primaria:

Es el cierre de una herida por medio de suturas, grapas o cintas.

El cierre primario demorado es el cierre de una herida contaminada de tres a cinco días después de ocurrido el accidente

Durante el intervalo de tiempo previo al cierre demorado la herida se debe mantener limpia. Para reducir la posibilidad de infección de la herida se emplean soluciones de lavado y vendaje (16).

La cicatrización por segunda intención:

Ocurre cuando se desarrolla tejido de granulación en grandes defectos cutáneos y se le permite el cierre por epitelización y contracción sin aproximación mediante suturas.

Granulación. El tejido de granulación se desarrolla en cuatro a seis días después de la lesión. Tiene un aspecto granular y rojo brillante; está compuesto por capilares, vasos sanguíneos, fibroblastos y macrófagos. El tejido de granulación sirve como una barrera contra la infección, constituye un lecho para la epitelización y es una fuente de tejido para la contracción de la herida y soporte (16).

Epitelización. Es la proliferación y migración de las células epidérmicas a través de un lecho de granulación en desarrollo (16).

La epitelización comienza cuatro o cinco días después de ocurrida la herida y puede ser incompleta o débil en las heridas grandes. Las células epiteliales se movilizan por debajo de la costra y secretan colagenasa provocando el desprendimiento de la misma.

La epitelización prevé una barrera contra la infección y la pérdida de líquidos.

Contracción. Es la reducción de la herida por medio de movimientos centrípetos de todo el espesor de la piel. La contracción comienza cinco o diez días después de ocurrida la herida y sigue las líneas de tensión de la piel. Los miofibroblastos median la contracción. Estas células tienen extensas conexiones intercelulares que se adhieren unas con otras y a los tejidos de alrededor (16).

Los grandes defectos pueden cicatrizar con excesiva contracción; esto hace que la piel quede muy tirante, hecho que puede limitar los movimientos del miembro o del cuerpo.

La cicatrización por tercera intención:

Es un cierre secundario, utilizando suturas o grapas, en una herida con tejido de granulación sano y que tiene por lo menos de cinco a seis días de evolución.

En este procedimiento, el tejido de granulación es extirpado, los bordes epiteliales pueden ser “reavivados” y suturados llevándolos sobre el tejido de granulación (16).

Estas heridas pueden cicatrizar con mayor rapidez y obtener resistencia tensil más rápido que los cierres primarios debido a la respuesta reparativa inmediata, caracterizada por la proliferación de tejido y la síntesis de colágena, el estadio de inflamación ya ha ocurrido antes de que comience la cicatrización por tercera intención (16).

Fases de la cicatrización de las heridas:

La inflamación comienza a los pocos minutos de ocurrida la herida y se le denomina fase de retraso o de sustrato. En las heridas no infectadas dura de uno a tres días.

Los signos clásicos incluyen:

- a) Enrojecimiento (rubor)
- b) Edematización (tumor)
- c) Dolor
- d) Calor
- e) Pérdida de la función (16).

Proceso:

- a) La vasoconstricción inicial es seguida por vasodilatación y la posterior filtración de líquido vascular. Esto es iniciado por la liberación de mediadores químicos (histamina, serotonina, prostaglandinas) por parte de los mastocitos y las plaquetas.
- b) Los neutrófilos y los monocitos migran hacia la herida para cumplir con las funciones de fagocitosis y la destrucción enzimática de los desechos tisulares.
- c) Los macrófagos liberan sustancias quimiotácticas responsables de la fibroplasia, la angiogénesis y la síntesis de colágeno (16).

La resistencia de la herida durante la inflamación es mínima y la apertura se evita por medio de suturas y grapas (16).

La fase de reparación o proliferativa, comienza al tercer o cuarto día y dura de uno a tres semanas. Se caracteriza por la proliferación de fibroblastos, la infiltración de capilares y la reepitelización (16).

Los fibroblastos se originan a partir de las células mesenquimatosas indiferenciadas presentes en el tejido conectivo adyacente y migran hacia la herida siguiendo a las fibras de fibrina de los coágulos y a los capilares que se están desarrollando (16).

a) Los fibroblastos producen una sustancia granular amorfa y colágena, responsables de la fuerza tensil de la herida.

b) La actividad celular y la síntesis de colágeno disminuyen hacia el final de la fase reparativa, a medida que comienza la maduración y la remodelación (16).

La infiltración capilar y la ramificación se producen secundarias a la reducción de la tensión de oxígeno en la herida y son necesarias para la actividad fibroblástica (16).

La proliferación epitelial y la migración comienzan a nivel de los bordes de la herida. Estos procesos son afectados por la inhibición provocada por el contacto célula-célula, la oxigenación, la temperatura, y el contacto con los vendajes (16).

A. La fase de maduración o de remodelación se desarrolla tres semanas después de la lesión y dura desde meses hasta años (16).

Esta fase se caracteriza por un contenido estable de colágena en la herida. La resistencia de la herida aumenta debido al entrecruzamiento de las fibras colágenas y a un cambio en la ondulación física de las fibras. Éstas se ordenan con menor densidad en la medida que la herida madura y hay una pérdida del ordenamiento en ondas tipo canasta, con las fibras depositadas a lo largo de la línea de esfuerzo (16).

La cicatriz que se desarrolla carece de la fuerza que presentan los tejidos normales adyacentes. Está formada por un menor número de células que las que se encuentran en las fases iniciales de reparación, vasos y fibras elásticas, y una densa red de colágeno (16).

Factores que afectan la cicatrización de las heridas:

A. Factores locales.

La vascularización prevé oxigenación tisular y los nutrientes que favorecen la cicatrización de la herida al promover el metabolismo celular local y el entrecruzamiento de las fibras de colágeno (16).

El material extraño (como tierra, desechos, material de sutura no absorbible) retrasan la cicatrización al exacerbar la respuesta inflamatoria y favorecer el desarrollo de la infección (16).

El espacio muerto y la acumulación de líquidos retrasan la cicatrización al limitar la migración de las células reparadoras y aumentar el riesgo de infección (16).

La exposición a radiación ionizante en las primeras dos semanas posquirúrgicas retrasa la cicatrización por medio de la disminución de la formación de fibroblastos, la síntesis de colágena y la regeneración capilar **(16)**.

La infección bacteriana de las heridas puede impedir la cicatrización debida a la persistencia de la inflamación, y la necrosis tisular y la acumulación de líquidos. La infección bacteriana también retrasa el proceso reparativo, en especial la fibroplasia (formación de tejido fibroso en la cicatrización) y la síntesis de colágena **(16)**.

La medicación tópica y los vendajes pueden promover la cicatrización de la herida al reducir la infección bacteriana y proteger a los tejidos que están cicatrizando **(16)**.

El lavar con solución isotónica estéril (solución salina fisiológica) ayuda a la cicatrización debido a la reducción mecánica de la contaminación y a la infección bacteriana **(16)**.

El lavar con soluciones antisépticas diluidas (clorhexidina al 0.05%, povidona yodada al 0.1%) favorece la cicatrización al reducir la contaminación bacteriana **(16)**.

Los vendajes húmedos no adherentes promueven la epitelización. Los vendajes adherentes son útiles para lograr el desbridamiento mecánico de las heridas contaminadas **(16)**.

Los ungüentos antibacterianos (bacitracina-neomicina-polimixina, sulfadiazina-plata, clorhexidina, nitrofurazona) pueden ser útiles para reducir el contenido bacteriano de las heridas contaminadas **(16)**.

La técnica quirúrgica puede facilitar en forma directa la cicatrización de la herida siempre que sigan los principios de Halsted:

- a) Suave manejo de los tejidos.
- b) Hemostasia segura y preservación de la irrigación tisular.
- c) Técnica quirúrgica aséptica.
- d) Cuidadosa aproximación sin tensión y con obliteración de los espacios muertos.
- e) Eliminación de los tejidos necróticos **(16)**.

Factores sistémicos que afectan la cicatrización:

1. La hipoproteïnemia causada por la pérdida de proteínas, la desnutrición o la sobrecarga de líquidos hace lenta la cicatrización al retardar la fibroplasia, disminuyendo la resistencia tensil de la herida y produciendo edema (16).
2. La uremia disminuye la formación de tejido de granulación, la proliferación epitelial y la fuerza de la herida (16).
3. La administración durante largo plazo de altas dosis de corticosteroides inhibe la fase de inflamación y disminuye la síntesis de colágeno (16).
4. Los agentes quimioterapéuticos:
 - a) Estos fármacos actúan directamente inhibiendo la división celular (fase reparativa) o la síntesis de colágeno (fase de maduración) (16).
 - b) También pueden demorar la cicatrización de manera indirecta al deprimir la función inmune, la epitelización y la contracción pueden provocar anorexia (16).
5. Los desequilibrios vitamínicos y minerales:
 - a) Las altas dosis de vitamina A revierten la inhibición de la cicatrización provocada por los corticosteroides y estimulan la fibroplasia y la síntesis de colágeno (16).
 - b) Las dosis excesivas de vitamina E impiden la cicatrización de la herida y la producción de colágeno (16).
 - c) La vitamina C es necesaria para la hidroxilación de la lisina y la prolina, partes del colágeno; la deficiencia de esta vitamina demora la cicatrización y reduce la resistencia de las heridas (16).
 - d) La deficiencia de zinc puede impedir la formación de tejido de granulación y demora la cicatrización por inhibición de la proliferación celular epitelial y fibroblástica (16).
6. La edad avanzada hace lenta la cicatrización. En casos experimentales, la tasa de epitelización y la resistencia de la herida en los animales viejos fue menor que en los animales jóvenes (16).
7. La presencia de una enfermedad maligna en cualquier parte del cuerpo impide la cicatrización debido al desarrollo de caquexia, alteración del metabolismo y reducción de la función de las células inflamatorias (16).
8. La diabetes, retrasa la cicatrización. La hiperglucemia impide la síntesis de colágeno, el avance capilar y la función de los granulocitos. Estos efectos también pueden ocurrir en los animales (16).

1.3.-TEJIDO CONECTIVO.

El tejido conectivo está compuesto por células y matriz extracelular, que consiste en sustancia fundamental amorfa y fibras.

Matriz extracelular: Compuesta por sustancia fundamental amorfa y fibras, resiste a las fuerzas tanto de compresión como de estiramiento (11,12,15).

Sustancia fundamental: Es un material hidratado amorfo compuesto por **glucosaminoglucanos**, polímeros no ramificados largos de disacáridos repetitivos, **proteoglucanos**, centros proteínicos, en los cuales están enlazados de manera covalente diversos glucosaminoglucanos y **glucoproteínas** que son grandes macromoléculas encargadas de sujetar a los diversos componentes de la matriz extracelular entre sí y con las integrinas de membrana celular.

Los **glucosaminoglucanos**: Son sulfatados como queratán sulfato, heparán sulfato, heparina, sulfatos de condroitina y dermatán sulfato y no sulfatados como ácido hialurónico (11,12,15).

Los **proteoglucanos** están enlazados de manera covalente con el ácido hialurónico, y forman macromoléculas gigantes denominadas **agregados de agregán**, que son los que producen el estado de gel de la matriz extracelular (11,12,15).

Las **glucoproteínas de adhesión** son de diversos tipos. Algunas se localizan de manera preferencial en la lámina basal como la **laminina**, o en el cartílago y en el hueso, como la **condronectina** y la osteonectina, respectivamente así como la **fibronectina** (11,12,15).

Las fibras son de colágena y fibras elásticas (11,12,15).

Fibras de colágena: No son elásticas y poseen gran resistencia al estiramiento. Cada fibra está compuesta por subunidades finas, la llamada molécula **tropocolágena** compuesta por tres cadenas de alfa entrelazadas en una configuración helicoidal (11,12,15).

Los aminoácidos más frecuentes de la colágena son **glicina**, **prolina**, **hidroxiprolina** e **hidroxilisina** (11,12,15).

Los seis tipos principales de colágena son en parte colágena del tipo I, es la fibra más abundante del hueso el hueso, la dentina el cemento tipo II en los cartílagos hialino y elástico (11,12,15).

Tipo III (Fibras reticulares).

Tipo IV (Lámina densa de la lámina basal).

Tipo V (Relacionada con la colágena tipo 1 y en la placenta).

Tipo VII (Que adhiere la lámina basal sobre la lámina reticular) (11).

Las fibras elásticas están compuestas por elastina y microfibrillas, son muy elásticas y pueden estirarse 150 % de su longitud en reposo sin romperse, su elasticidad se debe a la proteína elastina y su estabilidad a la presencia de microfibrillas.

La elastina es un material amorfo cuyos aminoácidos componentes principales son **glicina** y **prolina**, lo mismo que los aminoácidos únicos **desmosina** e **isodesmosina**.

Componentes celulares:

Las células del tejido conectivo se agrupan en dos categorías en **células fijas** y **células transitorias** (11,12,15).

Las células fijas: Constituyen una población estable y de vida prolongada que consiste en fibroblastos, células adiposas, mastocitos, pericitos y macrófagos. (Ejemplo células Kupffer) (11,12,15). .

Células transitorias (Células libres o errantes):

Se originan principalmente en la médula ósea y circulan en la sangre. La mayor parte de estas células con motilidad suelen ser de vida breve se reemplazan de manera continua desde una gran población de células madres

Las células transitorias son:

Células plasmáticas, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y algunos macrófagos (11).

Células fijas del tejido conectivo.

De las células residentes del tejido conectivo, las distribuidas con mayor amplitud y más abundantes son los fibroblastos (11).

Los fibroblastos: Sintetizan la matriz extracelular del tejido conectivo se derivan de células mesenquimatosas indiferenciadas. Pueden encontrarse en estado activo o en estado de reposo. Se les denomina fibrocitos a células en reposo y fibroblastocitos a las células activas.

Los fibroblastocitos activos suelen residir en relación estrecha con haces de colágena, en los que se encuentran situados de manera paralela al eje largo de la fibra.

Son células irregulares alargadas, que poseen citoplasma de afinidad basófila. La parte más manifiesta de la célula es el núcleo ovoide de color oscuro, gran tamaño y granuloso que contiene un nucléolo bien definido (11,12,15).

La microscopia electrónica revela un aparato de Golgi prominente y abundante retículo endoplásmico rugoso (RER), en especial cuando la célula está elaborando activamente matriz, como sucede durante la cicatrización de las heridas.

La actina y la actinina alfa están localizadas en la periferia de la célula y la miosina está por todo el citoplasma (11).

Los fibrocitos inactivos: Son células pequeñas y fusiformes, con citoplasma acidofílico, núcleo más pequeño, alargado y de tinción más oscura. La microscopia electrónica revela cantidades escasas de retículo endoplásmico rugoso pero abundantes ribosomas libres.

Aunque consideradas células fijas del tejido conectivo, los fibroblastos son capaces de efectuar algunos movimientos. Rara vez experimentan división celular pero pueden hacerlo durante la cicatrización de las heridas. Estas células, sin embargo pueden diferenciarse en células adiposas, condrocitos (durante la formación de fibrocartílago) y osteoblastos (bajo situaciones patológicas).

Los miofibroblastos: Son fibroblastos modificados que ponen de manifiesto características semejante tanto a las de los fibroblastos como a las de las células de músculo liso, mediante microscopía electrónica revela que los miofibroblastos tienen haces de filamentos de actina y cuerpos densos semejantes a células del músculo liso y además los miofibroblastos difieren de las células de músculo liso en que carecen de lámina externa (lámina basal). Los miofibroblastos son abundantes en las regiones que están experimentando cicatrización de las heridas; se encuentran también en el ligamento periodontal, sitio en que probablemente ayudan a la erupción dental.

Células adiposas: Las células adiposas (adipocitos), se derivan también de células mesenquimatosas indiferenciadas, aunque algunos histólogos creen que pueden originarlas también los fibroblastos. Las células adiposas están totalmente diferenciadas y no experimentan división celular. Funcionan en la síntesis y el almacenamiento de los triglicéridos. Existen dos tipos de células grasa que constituyen dos tipos de tejido adiposo (11).

Las **células grasas uniloculares**, forman al tejido adiposo blanco y las células con múltiples gotitas pequeñas de lípidos, llamada **células grasas multiloculares**, forman el tejido adiposo pardo. La grasa blanca es mucho más abundante que la grasa parda.

Los adipocitos de la grasa blanca son células esféricas grandes de hasta 120 μm de diámetro, que se vuelven poliédricas cuando se agregan en el tejido adiposo.

Las células grasas uniloculares almacenan continuamente grasa en forma de una sola gotita, que aumenta tanto en el citoplasma que el núcleo se desplaza hacia la periferia contra la membrana plasmática, con lo que imparte a estas células el perfil de “anillo de sello” cuando se ven con el microscopio de luz. En estado de ayuno la superficie celular se vuelve irregular y emite proyecciones a manera de pseudópodos (11).

Los adipocitos multiloculares hacen contraste con los unicelulares de diversas maneras. En primer lugar las células de la grasa parda son más pequeñas y más poligonales que las células de la grasa blanca. Más aún, como estas células almacenan grasa en varias gotitas pequeñas en vez de hacerlo en una sola, el núcleo esférico no se ve desplazado contra la membrana plasmática. Las células grasas multiloculares contienen, muchas mitocondrias pero muchos menos ribosomas libres que las células grasas uniloculares. Aunque las células de la grasa parda carecen de RER, sí cuentan con retículo endoplásmico liso (11).

La función de las células de grasa parda es almacenar grasa en varias gotitas pequeñas en vez de hacerlo en una gota grande, tienen un núcleo esférico no se ve desplazado contra la membrana plasmática (11).

Mastocitos ó Células Cebadas.

Los mastocitos: Se originan en el propio tejido conectivo (3).

Son las células fijas más grandes del tejido conectivo, tienen un diámetro de 20 a 30 μm son ovoides y poseen un núcleo esférico de ubicación central. A diferencia de los tres tipos de células fijas que se describieron previamente, los mastocitos se derivan, probablemente, de células precursoras de la médula ósea. La presencia de numerosos gránulos en el citoplasma es la característica de identificación de los mastocitos. Estos gránulos varían en tamaño desde 0.3 hasta 0.8 μm . Como estos gránulos contienen **heparina**, que es un glucosaminoglucano sulfatado, presenta metacromasia con azul de toluidina. Los estudios de microscopia electrónica de los gránulos revelan diferencias en el tamaño y la forma, ponen de manifiesto variaciones en la ultraestructura incluso dentro de la misma célula. Por lo demás, el citoplasma no tiene otro aspecto sobresaliente por que contiene gran cantidad de mitocondrias, un número escaso de perfiles de retículo endoplásmico rugoso y complejo de Golgi relativamente pequeño (11).

Además de heparina, los gránulos de los mastocitos contienen también **histamina**, **proteasas neutras**, **arilsulfatasa**, **factor quimiotáctico de los eosinófilos (NCF)**.

Además de las sustancias que se encuentran en los gránulos, los mastocitos también sintetizan **leucotrienos** a partir de los precursores membranales del ácido araquidónico, los cuales no se almacenan, mas bien se piensa que son sintetizados a partir de los fosfolípidos de membrana. (11) (25).

Desarrollo y distribución de los mastocitos. Como los basófilos y los mastocitos comparten ciertas características, se llegó a creer que los últimos eran basófilos que habían dejado la sangre para efectuar sus tareas en el tejido conectivo. En la actualidad se sabe que los basófilos y los mastocitos son células distintas y que tienen células precursoras también diferentes. Las células precursoras de los mastocitos se originan en la médula ósea, circulan en la sangre durante un tiempo breve y, a continuación, entran en el tejido conectivo, en el que se diferencian en mastocitos y adquieren sus gránulos citoplasmáticos característicos. Estas células tienen una vida media de meses, y en ocasiones experimentan división celular. Los mastocitos se encuentran localizados en el tejido conectivo, sitio en el que se concentran a lo largo de los vasos sanguíneos pequeños. Los mastocitos poseen receptores Fc en su superficie celular para la inmunoglobulina E (IgE). Funcionan en el sistema inmunológico, iniciando la reacción inflamatoria conocida como **reacción de hipersensibilidad inmediata (reacción anafiláctica)**. Esta reacción la inducen a menudo proteínas extrañas (antígenos) como veneno de abeja, pólenes y ciertos fármacos (11).

Monocitos.

Los monocitos al salir al tejido conectivo se diferencian en macrófagos.

Se desarrollan en la médula ósea y se liberan en la sangre, donde representan alrededor del 5% de los leucocitos. Junto con los macrófagos fijos representan los “fagocitos profesionales”. Después de alrededor de 24 h de permanecer en el torrente sanguíneo, los monocitos lo abandonan atravesando el endotelio de los capilares o las vénulas poscapilares hacia el tejido conectivo, donde se diferencian rápidamente a macrófagos. Por lo tanto, en condiciones normales se encuentran en escaso número en el tejido conectivo, donde se visualizan como células esféricas ó irregulares con un diámetro de 12 a 15 μm , con núcleo en forma de haba o de herradura y excéntrico. El citoplasma contiene gránulos que son lisosomas primarios (11). Son los más grandes de las células sanguíneas circulantes (11). Son redondeados y tienen mayor cantidad de citoplasma que los linfocitos. El complejo de Golgi y los centríolos se sitúan en la escotadura del núcleo (25).

Los monocitos se quedan en circulación solo unos cuantos días, emigran y se diferencian en macrófagos, su función es la fagocitosis y presentación de antígenos (11).

Macrófagos.

Algunos se comportan como células fijas y otros como células móviles.

Como los macrófagos son fagocitos activos, funcionan en la remoción de los detritus celulares y en la protección del cuerpo contra invasores extraños.

Los macrófagos miden de 10 a 30 μm de diámetro y son células de forma irregular. Su citoplasma es basófilo y contiene muchas vacuolas y gránulos densos pequeños.

El núcleo excéntrico es más pequeño y de color más oscuro que el de los fibroblastos y no suele poner de manifiesto nucléolos. El núcleo del macrófago es distintivo en cierto grado, por que tiene forma ovoide y suele estar indentado en un lado, de modo que parece un riñón. Los estudios de microscopia electrónica demuestran aparato de Golgi bien desarrollado retículo endoplásmico liso prominente y abundancia de lisosomas, que se manifiestan como pequeños gránulos densos en las micrografías de luz (11).

Función de los macrófagos.

Los macrófagos fagocitan células ancianas, lesionadas, muertas y detritus celulares, digieren el material ingerido por acción de las enzimas hidrolíticas que se encuentran en sus lisosomas. Los macrófagos ayudan también a las defensas del cuerpo al fagocitar y destruir microorganismos. Mediante la reacción inmunológica, los factores descargados por los linfocitos activan a los macrófagos e incrementan su actividad fagocítica. **Los macrófagos activados** varían considerablemente de forma, poseen microvellosidades y lamelipodios, y ponen de manifiesto locomoción incrementada en comparación con los macrófagos inactivados. Los macrófagos desempeñan también una función clave en la presentación de los antígenos a los linfocitos (11).

Algunos macrófagos recibieron denominaciones especiales como:

Células Kupffer del hígado.

Células dendríticas de la piel (Langerhans).

Macrófagos alveolares en los pulmones (Neumocitos III)

Microglia en sistema nervioso central (12).

Los monocitos sanguíneos, y los macrófagos del tejido conectivo, bazo, nodo linfáticos, timo y médula ósea son miembros del sistema fagocítico mononuclear, y poseen morfología y funciones semejantes (11).

Por añadidura los **osteoclastos** y la **microglia**, aunque diferentes desde el punto de vista morfológico y de localización, pertenecen también al sistema fagocítico mononuclear.

Bajo condiciones de inflamación crónica los macrófagos se congregan, aumentan mucho de tamaño y se vuelven **células epiteloides** de forma poligonal. Cuando el material en partículas que se va a eliminar es demasiado, pueden fusionarse varios o muchos macrófagos para formar una **célula gigante de cuerpo extraño** que es un macrófago gigante multinucleado (11).

Células transitorias del tejido conectivo.

Todas las células transitorias del tejido conectivo se derivan de células precursoras de la medula ósea.

Células plasmáticas: Se localizan diseminadas por todo el tejido conectivo y más abundantes en zonas de inflamación crónica y sitios en el los que ha entrado en el tejido sustancias extrañas o microorganismos.

Estas son células diferenciadas, se derivan de los linfocitos B. Producen y secretan anticuerpos, estas células son grandes, ovoides, de 20µm de diámetro, núcleo en posición excéntrica y una vida relativamente breve, de dos a tres semanas. Su citoplasma es intensamente basófilo como resultado de un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado. Solo se encuentran unas cuantas mitocondrias diseminadas entre los perfiles del retículo endoplásmico rugoso. Las micrografías electrónicas manifiestan un gran complejo yuxtannuclear de Golgi y un par de centriolos.

El núcleo esférico posee heterocromatina que se proyecta a manera de rayos desde el centro. Y da el aspecto característico de “carátula de reloj”, “rueda de carreta” bajo el microscopio de luz (11).

Leucocitos.

Son glóbulos blancos que circulan en la sangre. Sin embargo a menudo emigran a través de las paredes de los capilares para entrar en el tejido conectivo, sitio en el que efectúan diversas funciones, en especial durante la inflamación (11).

Neutrófilos.

Fagocitan y vigilan a las bacterias en zonas de inflamación aguda donde se forma pus, que es una acumulación de neutrófilos muertos y detritus (9).

Se visualizan como células grandes de 10-15 µm con un núcleo dividido en lóbulos (3 a 5 lóbulos, unidos de allí la denominación de granulocitos “polimorfonucleares”).

El citoplasma contiene numerosos gránulos, en parte **gránulos primarios** grandes azurófilos y en parte pequeños **gránulos secundarios o específicos**. Son especialmente

efectivos en la fagocitosis de bacterias y su función más importante es la defensa contra las infecciones bacterianas. (12).

En condiciones normales, los polimorfonucleares o neutrófilos deben tener una supervivencia dentro del sistema circulatorio de unos cinco días aproximadamente (15).

Eosinófilos.

Son mucho menos numerosos que los neutrófilos llegando apenas al 2-3% del total de leucocitos. Su núcleo, en general es bilobulado. Miden de 10 a 14 μm . La principal característica para su identificación es la presencia de granulaciones ovoides de apetencia acidófila. Los gránulos específicos de los eosinófilos son lisosimas. El citoplasma del eosinófilo está ocupado casi enteramente por los gránulos específicos. Estas células fagocitan y eliminan complejos antígeno anticuerpo que aparecen en casos de alergia. Los eosinófilos, mediante la proteína básica, participan en la defensa contra parásitos (19). Los eosinófilos se unen mediante receptores al parásito y lo eliminan mediante la secreción del contenido de sus gránulos. De ahí que el número de eosinófilos se incremente notablemente en las infecciones parasitarias. También intervienen en fenómenos anafilácticos: los basófilos y las células cebadas liberan factores quimiotácticos que atraen a los eosinófilos, y estos contrarrestan los efectos inflamatorios debidos a la histamina mediante la secreción de histaminasa (25).

Basófilos:

Miden de 10 a 12 μm . Posee gránulos con un diámetro de 600 nm de apetencia basófila. Intervienen en reacciones de anafilaxia en relación con las IgE. También colaboran con los neutrófilos. Internalizan complejos antígeno-anticuerpo en procesos de enlaces cruzados, lo que aumenta la concentración intracelular de calcio induciendo la liberación del contenido de los gránulos. El núcleo es voluminoso con forma tortuosa e irregular, generalmente con aspecto de letra S o bilobulado. (19).

Los basófilos solo pasan a los tejidos cuando son reclutados en algunos procesos inflamatorios (25).

Linfocitos.

Constituyen del 20 al 25% de la población y son células esféricas, pero pueden ser pleomórficas al emigrar por tejido conectivo. Aparecen en números pequeños en la mayor parte del tejido conectivo en sitios de inflamación crónica.

Los linfocitos circulantes miden de 8 a 10 μm de diámetro, presentan un núcleo denso con gran cantidad de heterocromatina. Se clasifican en tres categorías funcionales:

- a) Linfocitos B (células B).- Vida de meses.
- b) Linfocitos T (células T).- Vida de años.
- c) Células nulas.- Están compuestas por dos poblaciones definidas; células madres circulantes que originan todos los elementos figurados de la sangre y células NK (Células asesinas naturales) estas células matan a ciertas células extrañas (11).

Linfocitos B. Presentan inmunoglobulinas en la superficie, cuando es activado por un antígeno específico, prolifera por mitosis y se diferencia en plasmocitos que secretan gran cantidad de anticuerpos, algunas de las células activadas originan los **linfocitos B de la memoria inmunológica**.

Linfocitos T. Su superficie contiene receptores T, que no son inmunoglobulinas, está especializado en reconocer antígenos unidos a la superficie de otras células: hay cuatro variedades principales: **T citotóxico, T cooperador (helper), T supresor y T de la memoria inmunológica**.

Linfocito T citotóxico. Destruye células trasplantadas, células cancerosas y células invadidas por virus, secreta proteínas que abren poros en las membranas, a través de las cuales pasa el contenido citoplasmático. Son células productoras de citocinas por lo que las citocinas intervienen en las reacciones inflamatorias e inmunes.

Linfocito T cooperador (helper). Secreta factores que estimulan los linfocitos B y T en sus respuestas a los antígenos.

Linfocito T supresor. Disminuye la respuesta a los antígenos extraños y desempeña un papel fundamental en la supresión de la respuesta del propio individuo (19).

Clasificación del tejido conectivo.

Tejido conectivo embrionario: Consiste tanto en el tejido mesenquimatoso como en el tejido mucoso. El **tejido conectivo mesenquimatoso** se encuentra sólo en el embrión y está constituido por células en una sustancia fundamental amorfa de tipo gel que contiene fibras reticulares diseminadas. Las **células mesenquimatosas** poseen un núcleo oval que manifiesta una red fina de cromatina y nucléolos prominentes.

El citoplasma escaso y de tinción pálida extiende pequeñas prolongaciones protoplasmáticas en diversas direcciones.

El **tejido mucoso** es un tejido conectivo amorfo laxo que manifiesta una matriz de tipo gelatinoso, compuesta primordialmente por ácido hialurónico y que está poblado de manera escasa por fibras de colágena de los tipos I y III y fibroblastos. Este tejido, conocido también como **jalea de Wharton**, se encuentra sólo en el cordón umbilical y en el tejido conectivo subdérmico del embrión.

Tejido conectivo colágeno laxo (areolar): Se conoce como tejido conectivo areolar, se encuentra por debajo de las tunicas mesoteliales de las cavidades corporales. Se caracteriza por abundante **sustancia** y líquido tisular (líquido extracelular), que albergan a las células fijas del tejido conectivo: **fibroblastos, células adiposas, macrófagos y mastocitos** lo mismo que algunas **células indiferenciadas**.

También diseminadas por la sustancia fundamental se encuentran fibras laxamente entretrejidas de **colágena, reticulares y elásticas**.

Tejido conectivo colágeno compacto: Contiene la mayor parte de los mismos componentes que se encuentran en el tejido conectivo laxo, salvo que hay más fibras y menos sustancia amorfa y células.

La orientación y las distribuciones de los haces de fibras de colágena de este tejido lo vuelven resistente a la tensión. Cuando los haces de fibras del colágena están distribuidas al azar el tejido se denomina **tejido conectivo colágeno compacto irregular**. Cuando los haces de fibras están distribuidos en paralelo o de manera organizada se denomina **tejido conectivo colágeno compacto regular**.

Tejido conectivo colágeno compacto regular.

Contiene de manera principal fibras de colàgena burdas entretrejidas en una red que resiste tensión desde todas las direcciones. El tejido conectivo denso distribuido irregularmente, constituye dermis, vainas de los nervios y cápsula de bazo, testículo, ovario, riñón y nodos linfáticos.

Tejido conectivo elástico.

Posee fibras elásticas burdas ramificadas con solo unas cuantas fibras de colágena que forman redes. Se encuentran diseminados fibroblastos por todos los espacios intersticiales.

Las fibras elásticas están distribuidas en paralelo entre si y forman láminas delgadas o membranas fenestradas. Estas últimas se encuentran en los grandes vasos sanguíneos, el ligamento blanco de la columna vertebral y el ligamento suspensorio del pene.

Tejido conectivo reticular.

La colágena tipo III es el componente principal de las fibras del tejido conectivo reticulares. Son los fibroblastos los que sintetizan a la colàgena del tipo III. El tejido conectivo reticular forma el estroma fino, tejido adiposo, médula ósea, nodos linfáticos, bazo, músculo liso e islotes de Langerhans.

2.- PRINCIPIOS ACTIVOS UTILIZADOS EN MEDICINA VETERINARIA PARA LA CICATRIZACIÓN.

Aluminio micronizado: El aluminio micronizado es un coadyuvante en el proceso de cicatrización de heridas externas. Posee propiedades astringentes, es decir, favorece la precipitación de las proteínas lo que explica su beneficiosa acción sobre la cicatrización. Por este efecto astringente se le atribuye además cierta actividad antimicrobiana.

Acido tánico anhidro: El ácido tánico también denominado tanino o ácido galotánico, se obtiene a partir de ciertas nueces del roble (género *Quercus*). En medicina, además de emplearse como astringente (sustancia que cambia la composición química, estimulando la precipitación de proteínas, modificando la permeabilidad celular y respetando la integridad de las células reduce constricción y sequedad) y cicatrizante, es común encontrarlo en la formulación de medicamentos para tratar quemaduras. También tiene efecto antidiarreico.

3.-QUITOSÁN.

La quitina es un polisacárido protéico, insoluble que constituye el exoesqueleto de los Artrópodos (crustáceos, algunos moluscos e insectos) y las paredes de las células de muchos hongos y algas. La quitina es el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa. La estructura química de la quitina es similar a la celulosa (10).

La quitina es la versión animal de la celulosa, esta es al crustáceo como la celulosa es a los árboles. Forma un material de construcción fuerte, flexible, particularmente cuando esta combinado con proteínas, otras biomoléculas y algunos materiales inorgánicos tales como el carbonato de calcio (9).

El quitosán es generalmente obtenido por la desacetilación de la quitina natural. Es un producto natural no toxico y biodegradable. Este puede ser obtenido de desechos de mariscos y su composición primaria es glucosamida, 2-amino-2desoxi-D-glucosa (14).

Cuando el grado de desacetilación de la quitina excede del 50% llega a ser soluble en soluciones ácidas acuosas y es llamada quitosán. Este es un copolímero que contiene uniones 2-acetamida-2desoxi-B-glucopiranososa y residuos de 2-amino-2-desoxiglucopiranososa al azar (5,6).

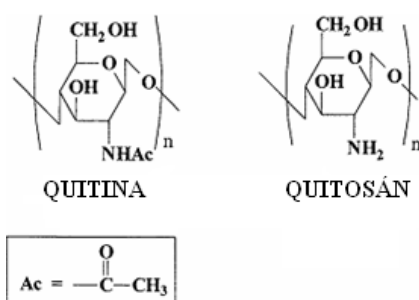


Figura1. Esquema de la quitina y del quitosán. (Estructura del quitosán que muestra al grupo amino formado por la desacetilación química o enzimática de la quitina)(28).

Las propiedades fisicoquímicas de la solución de quitosán teóricamente se rigen por factores, tales como el peso molecular, la temperatura, PH, fuerza iónica y grado de desacetilación. Dado que el quitosán es un producto natural no tóxico y biodegradable además de ser soluble en agua a pH ácido, tiene numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica y biotecnológica (5, 34, 9).

Las moléculas de quitosán actúan como quelantes de varios metales pesados. Esta habilidad de formar complejos con metales y radioisótopos, lo hacen candidato ideal para el tratamiento de aguas residuales (32) (33).

3.1.-APLICACIONES.

El quitosán se usa en la recuperación de proteínas de desechos acuosos de procesos de la industria de alimentos (30, 34).

Las proteínas han sido recuperadas en columnas de intercambio iónico altamente porosas hechas de quitosán (30).

El quitosán fue probado para precipitar metales pesados radioactivos presentes en leche después del accidente de Chernóbil (30).

También los estudios conducen al uso del quitosán para recuperar proteínas en la producción de queso (30).

Formación de películas biodegradables, reestablecimiento de material de desperdicio al procesar desechos de alimentos, purificación de agua así como clarificación y de acidificación de jugo de frutas (17).

Recientemente ha generado mucha atención el uso del quitosán en las aplicaciones veterinarias como agente curativo de heridas, agente antimicrobiano, material de vendaje, como injerto de piel, como agente hemostático (18).

En los modelos experimentales con animales, se mostraron los efectos de quitina y quitosán para inducir la reparación en todas las fases de la herida (24). El quitosán en la fase inflamatoria tiene propiedades únicas hemostáticas que son independientes de la cascada de coagulación en forma normal (27). En los polímeros in vivo puede también actuar recíprocamente y puede modular la conducta de migración de neutrófilos y de macrófagos modificados, los procesos de la reparación subsecuentes como la fibroplasia y reepitelización (20, 8).

In vitro los efectos de la quitina y quitosán sobre los fibroblastos tienen que ser estudiados, pero en estudios in vivo, ambas estimulaciones (6), y acciones inhibitorias (22).

La estructura química del quitosán es similar a la del ácido hialurónico y por tanto se sugirió que actuaría como un agente curativo en las heridas (18). Se han investigado mecanismos de aceleración de la cicatrización *in vitro e in vivo* por varios grupos (26,35). Desde 1985, Minami y su grupo han usado quitina y quitosán en varios productos para uso veterinario y han informado sus efectos benéficos en la curación de heridas y sus actividades biológicas (35).

Ellos encontraron en estos polímeros y sus derivados productos para acelerar la curación de heridas, la disminución en la frecuencia de tratamiento, y la protección de

superficie de la herida cómoda y sin dolor. Además de la aceleración de la cicatrización, y curación de la herida, el quitosán es también capaz de activar a las defensas del organismo para prevenir la infección, ofreciendo una alternativa además del uso de los antibióticos.

El quitosán refuerza las funciones de células inflamatorias de los leucocitos, polimorfonucleares (PMN), producción de osteopontin y leucotrieno B₄, en los macrófagos (la fagocitosis, producción de interleucina 1 (IL-1), el factor de crecimiento transformante β 1 y el factor de crecimiento derivado de plaquetas). El quitosán promueve granulación y organización celular. Como resultado, es beneficioso para sanar heridas abiertas grandes en los animales (14). Uno de los efectos más interesantes de la quitina y el quitosán en la curación de las heridas, es la formación de tejido de granulación con la angiogénesis. La quitina y el quitosán inducen al fibroblasto para liberar interleucina 8 el cual involucra la migración y proliferación de fibroblastos y células endoteliales (22, 2).

Existen muchos estudios llevados a cabo por diferentes grupos, que muestran que la quitina y el quitosán aceleraron la cicatrización de las heridas en los casos veterinarios clínicos y ya se han comercializado muchos productos que contienen quitina y quitosán para el tratamiento de heridas. Se ha usado a la quitina y el quitosán como los filamentos, polvos, gránulos, esponjas o como un compuesto con algodón o poliéster.

Se demostraron los efectos de quitina y quitosán en la curación de heridas en animales pequeños (perros y gatos), ganado (vacas) y animales de zoológico que usan los productos como el Chitipack C, que se comercializa en Japón (28). Comparado con la terapia convencional y administración del antibiótico a una herida, los nuevos tratamientos con los productos de quitina y quitosán permitieron una disminución sustancial en la frecuencia del tratamiento con la formación de cicatriz mínima.

4.- OBJETIVOS.

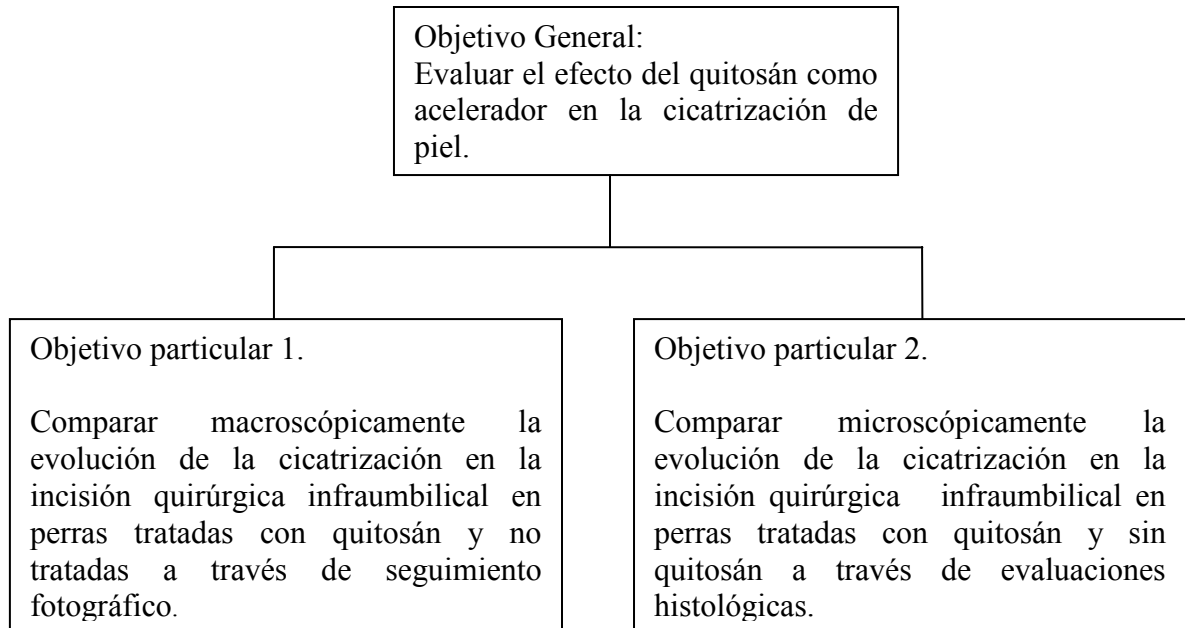


Figura 2.

5.- METOLOGÍA.

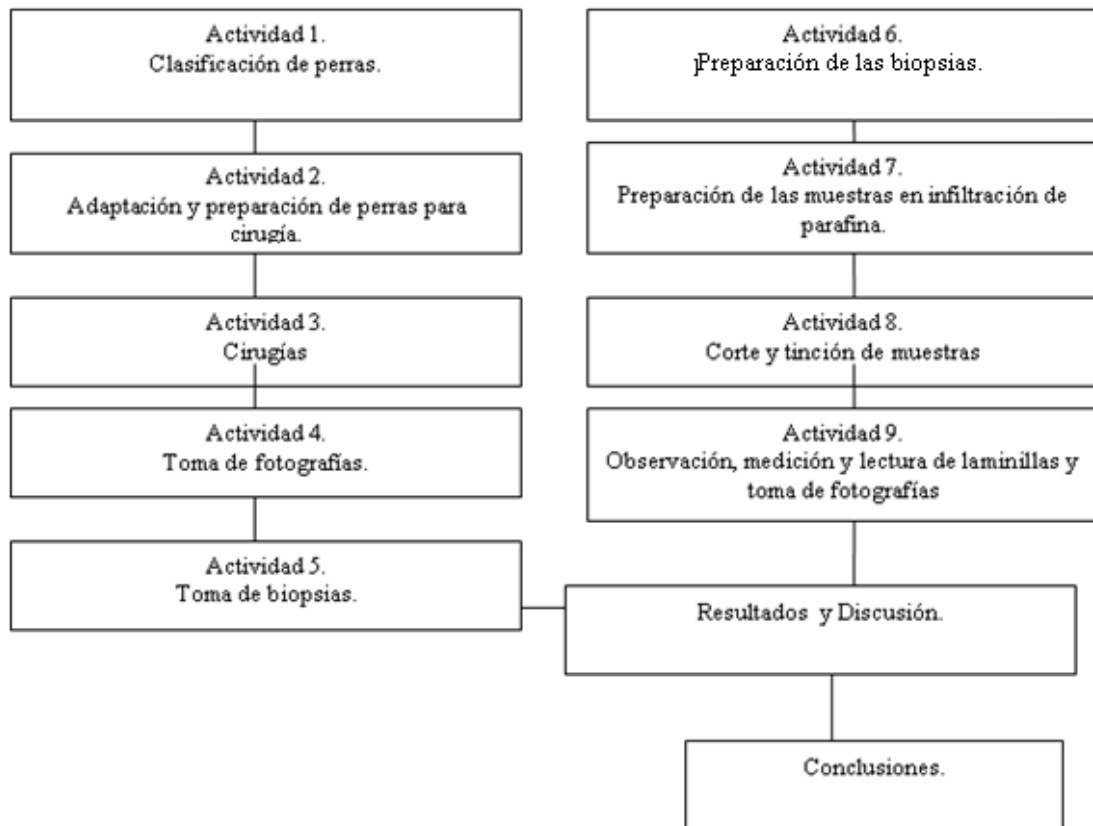


Figura 3.

6.-MATERIALES.

Obtención de perras a tratar.

Se obtuvieron 10 perras, de raza mestiza entre 2 y 4 años de edad con el apoyo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y del departamento de Ciencias Biológicas traídas del antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Se usaron las instalaciones de la Facultad para alojar y adaptar los animales para su manejo, así como laboratorios para realizar las cirugías.

Clasificación de los animales.

Las perras se separaron en 2 lotes, 7 perras experimentales y 3 perras control.

Tratamiento y adaptación de los animales.

Antes de introducir los animales, las perreras de la unidad de apoyo técnico al laboratorio de anatomía, se lavaron con detergente y se desinfectaron con cloro, se puso un foco por cada perrera para la administración de luz. A cada perra se le proporcionó una jaula, un comedero y un bebedero.

Las perras se bañaron con jabón antipulgas, se pesaron, se desparasitaron con ivermectina 0.1 mg, prazicuantel 50mg y albendazol 300mg, una sola dosis a razón de 1 tableta por cada 10 kg con una $\overline{X}$ aproximada de una tableta por perra, y se dejaron una semana para adaptarse al medio y ala alimentación, proporcionándoles alimento 1 vez al día $\frac{1}{2}$ kilogramo por perra, alimento marca Comercial Mexicana y dándoles dos veces al día agua y lavando las jaulas diariamente durante todo el experimento.

Cirugías.

Se programaron las cirugías, se hicieron cada tercer día a cada perra, obteniendo 5 biopsias por cada animal después de la cirugía al día 2, 4, 6, 8, 10, de la cicatrización.

El procedimiento de la cirugía fue el siguiente:

Se tranquilizó a los animales con acepromacina base en forma de (maleato de acepromacina) (calmivet) usando una dosis de 0.2 mg/kg de peso por vía intramuscular, dejando actuar el medicamento por 10 ó 15 minutos, en seguida se rasuró la zona abdominal para realizar la cirugía, se lavó la zona con jabón quirúrgico y se secó con toallas desechables; se realizó una medición de 12 cm. sobre el abdomen donde se practicaría la incisión.

En seguida se realizó la antisepsia de la zona de incisión con torundas de benzal al 10%, después se anestesió la región donde fue realizada la medición, con anestesia local, que contiene clorhidrato de procaína, clorhidrato de epinefrina y clorobutanol (Adrecaïne) aplicando 1 ml/cm² por vía subcutánea, donde se realizó la incisión, se colocó un campo estéril sobre la zona de incisión, se hace la incisión de 12cm por que se efectuaron 5 biopsias de 2cm con bisturí, sólo incidiendo piel y tejido subcutáneo sin involucrar la línea alba, se suturó con puntos separados la zona de incisión con nylon de calibre 2-0.

A cada perra experimental se le aplicó 1ml de quitosán en solución en gel cubriendo toda la incisión

dejándose secar y finalmente se colocó una gasa estéril y una venda estéril en la zona de la incisión.

A las perras control no se les aplicó nada, solo se colocó una gasa estéril y una venda estéril en la zona de la cirugía.

A todos los animales se les colocó un collar isabelino para evitar el lamido o lesión de la zona de incisión.

Al día siguiente, a las perras experimentales se les realizó una curación con solución salina fisiológica, se secó la zona de incisión y se les aplicó 1 ml de quitosán por cada perra colocándoles gasas y vendas nuevas, estériles. A las perras control se les realizó la curación solo con solución salina fisiológica, se secó la zona se les colocó gasa y venda nueva estéril. (Ver figura No. 4.)

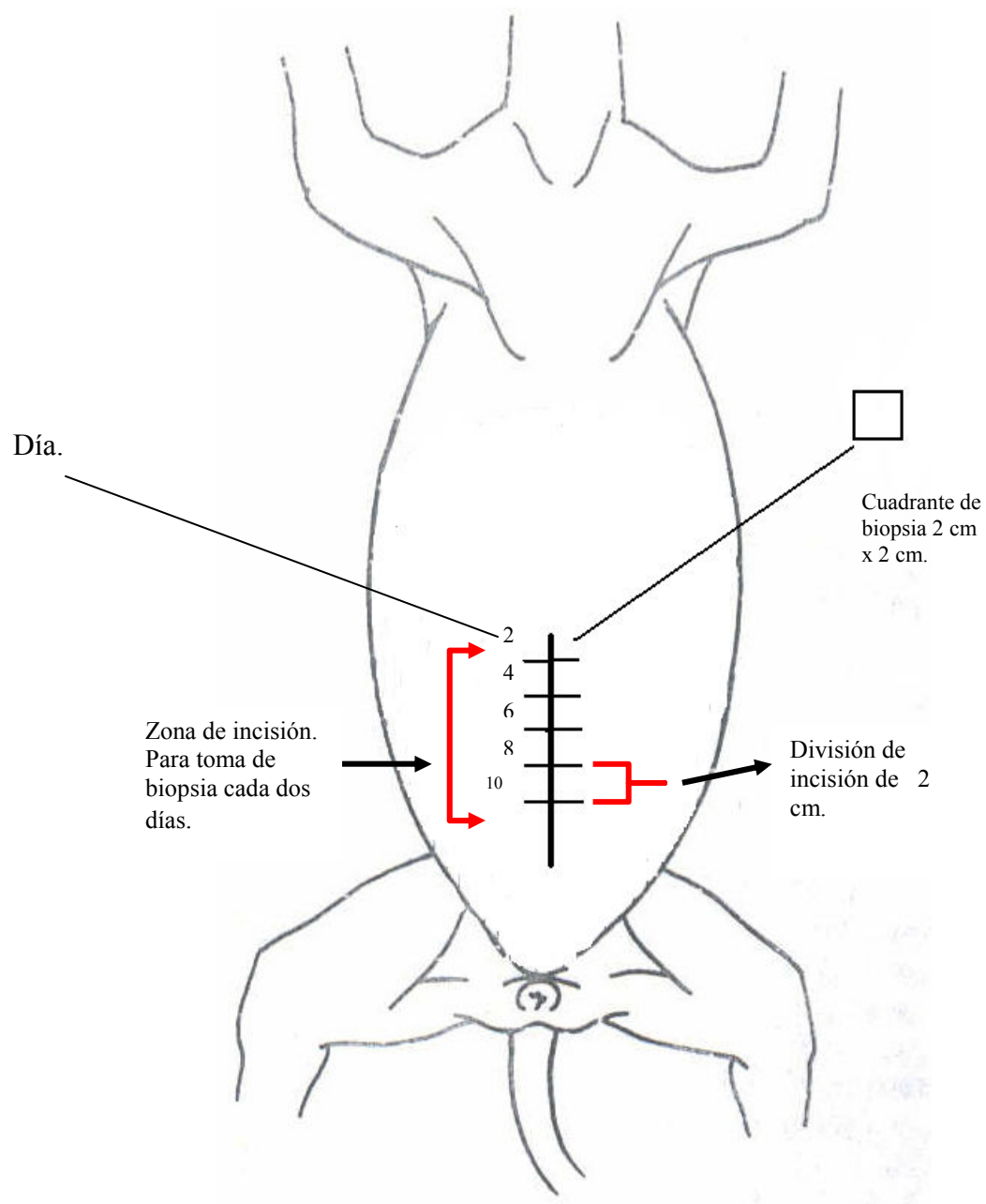


Figura 4. (Modificada) (1).

6.1.-TOMA DE BIOPSIA.

Al segundo día se tranquilizó a los animales con maleato de acepromacina (calmivet) usando una dosis de 0.5ml por cada 10 kg dejando actuar el medicamento por 10 ó 15 minutos.

Se realizó una medición de 2 cm. en la zona donde se tomó cada biopsia.

Se desinfectaron las zonas laterales de la incisión con cloruro de benzalconio al 2 %.

Se aplicó anestesia local con lidocaína y epinefrina (adrecaine) aplicando 1ml por lado en los 2cm de la incisión ya previamente medidos.

Se cortó la zona con bisturí y se tomó la biopsia con pinzas de disección con dientes.

La biopsia se depositó en un frasco con formol boferado al 10 %, y se etiquetó cada muestra por día y por perra.

Se volvió a suturar la zona donde se obtuvo la biopsia con nylon de 2-0.

Se le aplicó 1ml de quitosán en la zona de incisión, se dejó secar, y se colocó nuevamente una gasa y venda estéril en la zona de incisión.

El mismo procedimiento se realizó los días 2, 4, 6, 8,10 posterior a la cirugía.

Durante todo el experimento se lavaron diario las jaulas y se dio de comer y beber a los animales.

Al final del experimento se dieron en adopción a las perras.

Toma de fotografías.

Durante todo el experimento se tomaron fotografías con cámara digital marca polaroid de 8 mega pixeles en posición ventral.

6.1.-TOMA DE BIOPSIA.

Al segundo día se tranquilizó a los animales con maleato de acepromacina (calmivet) usando una dosis de 0.5ml por cada 10 kg dejando actuar el medicamento por 10 ó 15 minutos.

Se realizó una medición de 2 cm. en la zona donde se tomó cada biopsia.

Se desinfectaron las zonas laterales de la incisión con cloruro de benzalconio al 2 %.

Se aplicó anestesia local con lidocaína y epinefrina (adrecaine) aplicando 1ml por lado en los 2cm de la incisión ya previamente medidos.

Se cortó la zona con bisturí y se tomó la biopsia con pinzas de disección con dientes.

La biopsia se depositó en un frasco con formol boferado al 10 %, y se etiquetó cada muestra por día y por perra.

Se volvió a suturar la zona donde se obtuvo la biopsia con nylon de 2-0.

Se le aplicó 1ml de quitosán en la zona de incisión, se dejó secar, y se colocó nuevamente una gasa y venda estéril en la zona de incisión.

El mismo procedimiento se realizó los días 2, 4, 6, 8,10 posterior a la cirugía.

Durante todo el experimento se lavaron diario las jaulas y se dio de comer y beber a los animales.

Al final del experimento se dieron en adopción a las perras.

Toma de fotografías.

Durante todo el experimento se tomaron fotografías con cámara digital marca polaroid de 8 mega pixeles en posición ventral.

6.2.-PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS EN BLOQUES DE PARAFINA.

Método de inclusión en parafina.

La preparación de las biopsias en bloques de parafina se realizó en el laboratorio de apoyo a histología I-711.

Fijación.

Inmediatamente después de la extracción de las biopsias se lavaron con solución salina fisiológica y se introdujeron cada una en 50 ml de formol amortiguado con solución amortiguadora de fosfato (PBS) al 10 %, durante 24 horas, Pasadas las 24 h de fijación, se enjuagó con agua corriente y se introdujo en alcohol al 70 % hasta su próximo procedimiento (4).

Infiltración en parafina.

Alcohol etílico (R-OH) al 70%. (2 minutos).

R-OH al 80%.

R-OH al 90%.

R-OH al 96% (dos veces).

R-OH 100 (tres veces).

Las muestras se procesaron mediante el método de **inclusión en parafina apoyado por Deshidratación por microondas**, las piezas se calientan en el microondas desde temperatura media hasta alcanzar los 55 °C, para ser trabajadas se colocan en un vaso de precipitado o matraz con una relación 1:10 volumen-alcohol al 70°, El horno se activa para cada cambio, a potencia media, durante 60 segundos y sin que ebulle. Se permite reposar 15 minutos antes del siguiente cambio, se coloca en el siguiente alcohol.

Monómero de estireno 1 hora (dos veces) y 1 hora entre cada cambio.

Y parafina pura (dos veces) y 1 hora entre cada cambio (13).

Inclusión en parafina.

Terminada la deshidratación de los cortes se introducen en contenedores cúbicos y se incluyen en parafina líquida a 60 °C y se dejaron por dos horas a temperatura ambiente a que se enfriaran previo al corte los bloques se someten a refrigeración por 24 h, para que se facilite la obtención de cortes finos, (película muy delgada), de la piel (4, 13).

Corte.

Cada bloque de parafina se coloca en el micrótopo rotatorio marca leica el cual es calibrado para obtener un corte de grosor de 5 micrómetros.

Para realizar el montaje cada corte se introduce en un baño de flotación de tejidos constituido en agua destilada a 45 ° C , más gresina al .5%, para facilitar la adhesión del tejido sobre el portaobjetos. El tejido en la laminilla se secó, calentándola sobre una platina térmica a 50°C, durante un promedio de 15 minutos, para fundir en su totalidad la parafina y con ello garantizar una buena adhesión del tejido al portaobjetos.

6.3.-TINCIÓN.

La tinción de las laminillas se realizó en el laboratorio de apoyo a Histología I-711.

La coloración de las muestras se efectuó en el tren de tinción de la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E) de la siguiente manera.

Principio.

Coloración de H-E es una coloración bicrómica que usa hematoxilina como colorante básico, para las estructuras ácidas y una eosina como colorante ácido para las estructuras básicas.

Procedimiento.

Desparafinar.

Xileno (dos veces).

Alcohol absoluto ó de 100 ° (dos veces).

Alcohol de 96° (dos veces).

Alcohol de 80° (una vez).

Alcohol de 70° (una vez).

Enjuagar con agua destilada.

Teñir con hematoxilina de Harris 3 minutos

Lavar con agua corriente, 15 minutos

Diferenciar en alcohol ácido o/y carbonato de litio, 5 minutos

Lavar en agua corriente, hasta que vire a color azul

Enjuagar con agua destilada

Teñir con eosina alcohólica, 1 minuto

Deshidratar en etanol al 96 %, dos veces por:

Deshidratar en etanol absoluto, en dos pasos, 5 minutos cada uno,

Aclarar con xileno, en dos pasos, 5 minutos c/u.

Cubrir con medio de montaje sintético.

Resultados.

Núcleos: negro – azul.

Citoplasma: rosa – naranja. (4, 21).

6.4.- OBSEVACIÓN, MEDICIÓN Y LECTURA DE LAMINILLAS.

Se realizó la observación, medición y lectura de laminillas en la FES Cuautitlán campo 4 en el inter del laboratorio I-713 L714 de Citología Histología y Embriología

Observación.

Se utilizó un microscopio óptico de la marca American optical tetra ocular.

Lectura de laminillas.

Se utilizó el objetivo 4 X para una observación panorámica y localizar la zona de incisión, con el objetivo 40X se detalló y observó la zona de incisión, en el objetivo de 100X se aplicó una gota de aceite de inmersión a la laminilla para monitorear la evolución de la reparación y observar el tipo de células que se encontraban en la zona. Se tomaron fotos con un microscopio binocular marca "leica" equipado con cámara digital marca Watec, con el software intervideo win dvr 2000 MR.

Medición.

Se realizó con el microscopio óptico marca american optical tetra ocular donde se colocó un objetivo reticulado con escala de medición de 200 nanómetros para la medición de bordes, profundidad, así como tamaño, localización de costra y coágulo, utilizando el objetivo 40X.

El análisis de la información se realizó mediante un modelo lineal que incluyó los efectos fijos del tratamiento (con y sin quitosán) y el tiempo. Para comparar los promedios de distancia entre bordes y profundidad de la incisión, entre los grupos se utilizó la prueba t-student. Los análisis se realizaron con sistema de análisis estadístico (SAS). Para el análisis de celularidad se realizó con un sistema de análisis mediante una media aritmética.

6.5.- OBTENCIÓN DE HISTORIA CLÍNICA.

Se obtuvieron las 10 perras propuestas en la metodología, no fue posible realizar estudios de laboratorio para saber el estado de salud de nuestros paciente debido al costo esta es la historia clínica que fue posible rescatar.

Animal control.

HISTORIA CLÍNICA DE PERRA 1.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Caniche.

Sexo: Hembra

Edad.3años.

Peso: 12 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal control.

HISTORIA CLÍNICA DE PERRA 2.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Caniche.

Sexo: Hembra.

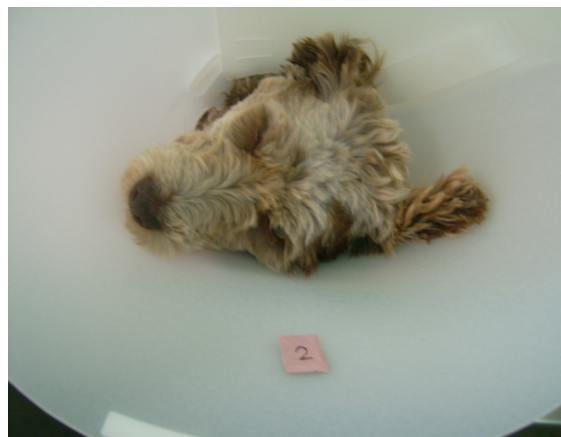
Edad.3años.

Peso: 15 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal control.

HISTORIA CLÍNICA 3.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Caniche.

Sexo: Hembra.

Edad.2 años.

Peso: 10 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal control.

HISTORIA CLÍNICA 4.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Caniche.

Sexo: Hembra.

Edad.3 años.

Peso: 11Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal control.

HISTORIA CLÍNICA 5.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Mestizo.

Sexo: Hembra.

Edad.4años.

Peso: 20 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal control.

HISTORIA CLÍNICA 6.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Mestizo.

Sexo: Hembra.

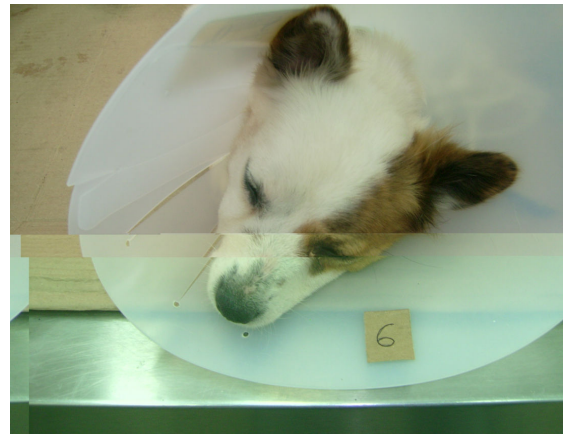
Edad.4años.

Peso: 8 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal control.

HISTORIA CLÍNICA 7.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Mestizo.

Sexo: Hembra.

Edad.3años.

Peso: 20 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal testigo.

HISTORIA CLÍNICA 8.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Bull terrier.

Sexo: Hembra.

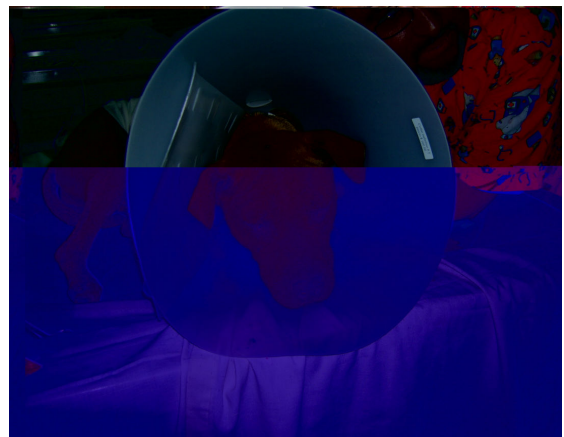
Edad.3años.

Peso: 27 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal testigo.

HISTORIA CLÍNICA 9.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Cocker spaniel.

Sexo: Hembra.

Edad.2años.

Peso: 15 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



Animal testigo.

HISTORIA CLÍNICA 10.

Fecha: 20/08/06.

Especie animal: Canino.

Raza: Caniche.

Sexo: Hembra.

Edad.3años.

Peso: 10 Kilos.

Procedencia: Antirrábico de Cuautitlán Izcalli.

Localidad: Municipio de Cuautitlán Izcalli.

Inspección general: Desnutrición.



7.- RESULTADOS.

7.1. COMPARACION MACROSCOPICA DE LA EVOLUCIÓN DE LA CICATRIZACIÓN.

En las siguientes fotos se muestra la comparación macroscópicamente la evolución de la cicatrización de las perras tratadas y no tratadas con quitosán.

Perras tratadas



Foto 1. Perra (3) tratada con quitosán.
En el día 4 de la cicatrización.



Foto 3. Perra (3) tratada con quitosán.
En el día 6 de la cicatrización.

Perras no tratadas



Foto 2. Perra (8) tratada no tratada.
En el día 4 de la cicatrización.



Foto 4. Perra (8) no tratada.
En el día 6 de la cicatrización.



Foto 5. Perra (7) tratada con quitosán
En el día 8 de la cicatrización.



Foto 6. Perra (9) no tratada
En el día 8 de la cicatrización.

En las fotos se puede ver que las incisiones de las perras tratadas con quitosán presentan una menor inflamación en comparación a las perras no tratadas.

En las perras no tratadas se presentó infección contrario de las perras tratadas con quitosán que no presentaron infección.

En las perras sin tratamiento no se les aplicó ningún tipo de antibiótico, ni antiinflamatorio debido a que nos podría afectar en nuestros resultados.

Figura 4. Evolución de la cicatrización a través de la lectura de la distancia entre bordes y de la profundidad de la incisión.

No de perra.	Día de la cicatrización.	Distancia entre bordes de la incisión	Profundidad de la incisión
1	2	560 micrómetros	1880 micrómetros
2	2	no incluida	No incluida
3	2	90 micrómetros	0
4	2	50 micrómetros	460 micrómetros
5	2	60 micrómetros	0
6	2	260 micrómetros	720 micrómetros
7	2	600 micrómetros	no incluida
8	2	0	0
9	2	320 micrómetros	1555 micrómetros
10	2	320 micrómetros	no incluida
1	4	0	0
2	4	60 micrómetros	200 micrómetros
3	4	240 micrómetros	100 micrómetros
4	4	620 micrómetros	No incluida
5	4	0	0
6	4	0	0
7	4	0	0
8	4	0	0
9	4	no incluida	no incluida
10	4	900 micrómetros	no incluida
1	6	0	0
2	6	0	0
3	6	0	0
4	6	120 micrómetros	0
5	6	0	0
6	6	0	0
7	6	0	0
8	6	480 micrómetros	1800 micrómetros
9	6	740 micrómetros	no incluida
10	6	no incluida	no incluida
1	8	0	0
2	8	0	0
3	8	0	0
4	8	160 micrómetros	0
5	8	0	0
6	8	0	0
7	8	0	0
8	8	175 micrómetros	no incluida
9	8	0	0
10	8	5 micrómetros	180 micrómetros
1	10	0	0
2	10	0	0

3	10	0	0
4	10	0	0
5	10	0	0
6	10	5 micrómetros	40 micrómetros
7	10	0	0
8	10	60 micrómetros	440 micrómetros
9	10	2400 micrómetros	0
10	10	0	0

* No incluida. El corte no se realizó adecuadamente, o la herida estaba abierta y no se Podían tomar estos datos.

7.2.-RESULTADOS DE CELULARIDAD.

La toma de biopsias se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita y en los siguientes cuadros se muestran los resultados obtenidos en cuanto a tipo de células que se observaron durante la evolución de la cicatrización.

Fibroblastos.

Cuadro 1 .Presencia de Fibroblastos en el tiempo de la cicatrización en perras tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
1	3	3	3	1	1
2	3	3	3	3	3
3	3	3	3	3	3
4	3	3	3	1	3
5	3	3	3	3	3
6	3	3	3	3	3
7	3	3	3	3	3
$\bar{X}$	3	3	3	2.4	2.7

(0)

Ausente,(1) Escaso, (2) Moderado,(3) Abundante.

Cuadro 2.Presencia de Fibroblastos en el tiempo de la cicatrización en perras no tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras no tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
8	3	1	2	3	2
9	2	1	2	2	3
10	3	2	2	2	3
$\bar{X}$	2.6	1.3	2	2.3	2.6

(0) Ausente,(1) Escaso, (2) Moderado,(3) Abundante.

Los resultados de estos cuadros son cualitativos no se realizó conteo celular solo se tomo en cuenta la presencia o no de las células en los días de la cicatrización tomando como valores (0) ausente, (1) escaso, (2) moderado, (3) abundante.

Polimorfonucleares.

Cuadro 3. Presencia de Polimorfonucleares en el tiempo de la cicatrización en perras tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
1	2	2	2	0	1
2	2	2	2	1	2
3	2	1	2	2	1
4	2	2	2	3	2
5	2	2	2	2	2
6	2	2	2	3	2
7	3	2	2	2	2
$\bar{X}$	2.1	1.8	2	1.8	1.7

(0) Ausente, (1) Escaso, (2) Moderado, (3) Abundante.

Cuadro 4. Presencia de Polimorfonucleares en el tiempo de la cicatrización en perras no tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras no tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
8	2	3	3	2	3
9	3	3	3	1	3
10	3	3	3	3	1
$\bar{X}$	2.6	3	3	2	3.3

(0) Ausente, (1) Escaso, (2) Moderado, (3) Abundante.

Los resultados de estos cuadros son cualitativos no se realizó conteo celular solo se tomo en cuenta la presencia o no de las células en los días de la cicatrización tomando como valores (0) ausente, (1) escaso, (2) moderado, (3) abundante.

Macrófagos.

Cuadro 5. Presencia de Macrófagos en el tiempo de la cicatrización en perras tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
1	1	1	1	0	3
2	1	2	2	2	2
3	1	2	1	1	2
4	1	1	1	2	1
5	1	1	2	1	1
6	1	2	1	1	1
7	2	1	1	1	2
$\bar{X}$	1.4	1.4	1.2	1.1	1.7

(0) Ausente, (1) Escaso, (2) Moderado, (3) Abundante.

Cuadro 6. Presencia de Macrófagos en el tiempo de la cicatrización en perras no tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras no tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
8	2	2	2	1	3
9	2	2	2	2	1
10	1	2	2	2	1
$\bar{X}$	1.6	2	2	1.6	1.6

(0) Ausente, (1) Escaso, (2) Moderado, (3) Abundante.

Los resultados de estos cuadros son cualitativos no se realizó conteo celular solo se tomo en cuenta la presencia o no de las células en los días de la cicatrización tomando como valores (0) ausente, (1) escaso, (2) moderado, (3) abundante.

Células plasmáticas.

Cuadro 7. Presencia de Células plasmáticas en el tiempo de la cicatrización en perras tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1
3	0	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	1
6	0	0	0	1	0
7	0	0	0	0	0
$\bar{X}$	0	0.1	0	0.1	0.2

(0) Ausente, (1) Escaso, (2) Moderado, (3) Abundante.

Cuadro 8. Presencia de Células plasmáticas en el tiempo de la cicatrización en perras no tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras no tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
8	0	0	0	0	1
9	0	0	0	1	1
10	0	0	0	1	1
$\bar{X}$	0	0	0	0.6	1

(0) Ausente, (1) Escaso, (2) Moderado, (3) Abundante.

Los resultados de estos cuadros son cualitativos no se realizó conteo celular solo se tomo en cuenta la presencia o no de las células en los días de la cicatrización tomando como valores (0) ausente, (1) escaso, (2) moderado, (3) abundante.

Linfocitos.

Cuadro 9. Presencia de Linfocitos en el tiempo de la cicatrización en perras tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras tratadas con quitosán

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
1	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
$\bar{X}$	0	0	0	0	0.1

(0) Ausente, (1) Escaso, (2) Moderado, (3) Abundante.

Cuadro 10. Presencia de Linfocitos en el tiempo de la cicatrización en perras no tratadas con quitosán. Así como un análisis mediante media aritmética.

➤ Perras no tratadas con quitosán.

Perra Día de cicatrización	2	4	6	8	10
8	0	0	0	0	1
9	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	1
$\bar{X}$	0	0	0	0	1

(0) Ausente, (1) Escaso, (2) Moderado, (3) Abundante.

Los resultados de estos cuadros son cualitativos no se realizó conteo celular solo se tomo en cuenta la presencia o no de las células en los días de la cicatrización tomando como valores (0) ausente, (1) escaso, (2) moderado, (3) abundante.

7.3.-RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES HISTOLÓGICAS.

Considerando los siguientes factores: día, profundidad y distancia entre bordes en las siguientes fotografías histológicas se observa la evolución de la cicatrización en la piel. También se aprecian las células presentes durante el proceso de cicatrización.

Perra 1 (tratada) en el día 6 de cicatrización.



Foto 7. Corte de piel de perro. El proceso de la cicatrización se completó favorablemente ya que los bordes de la piel se encuentran cerrados (A), H-E a 10X.

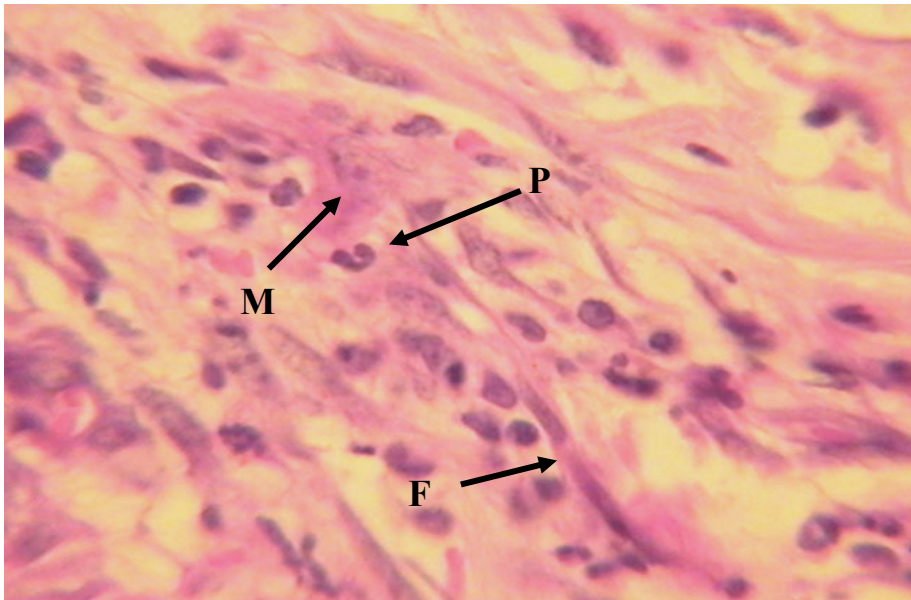


Foto 8. Corte de piel de perro. Se observa las células de reparación e inflamación) F) Fibroblastos, P) Polimorfonucleares, M) Macrófagos H-E a 100X.

Perra 8 (no tratada) en el día 6 de cicatrización.



Foto 9. Corte de piel de perro. La distancia de los borde de la incisión está abierta **A**), La profundidad es de 1800 μm . **B**), H-E. a 10X.

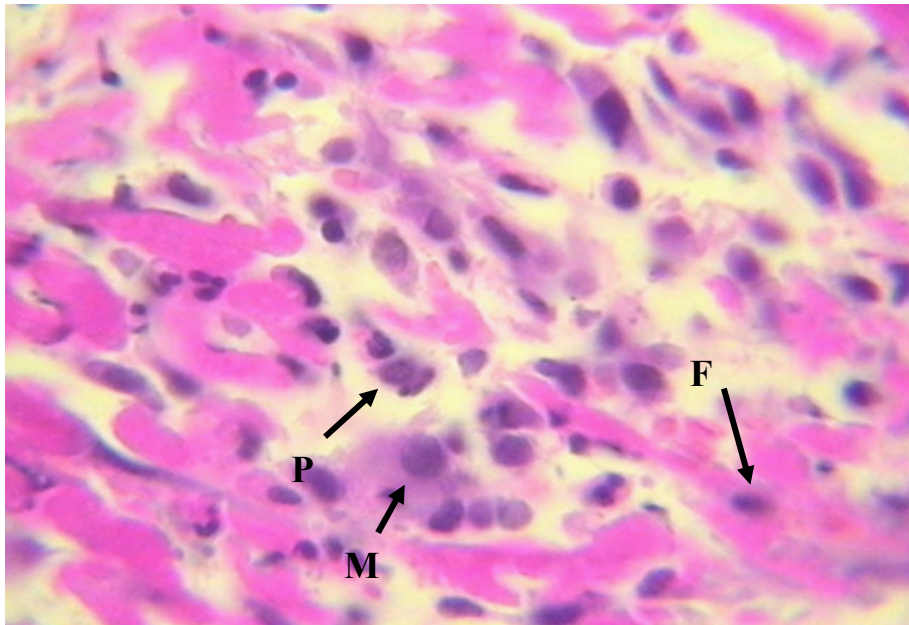


Foto 10. Corte de piel de perro. Se observa las células de reparación, **F**) Fibroblastos y, **P**) Polimorfos nucleares, **M**) Macrófagos, H-E a 100X.

Perra 7 (tratada) en el día 10 de cicatrización.



Foto 11. Corte de piel de perro. El proceso de la cicatrización se completó favorablemente ya que los bordes de la piel se encuentran cerrados(A). H-E a 10X.

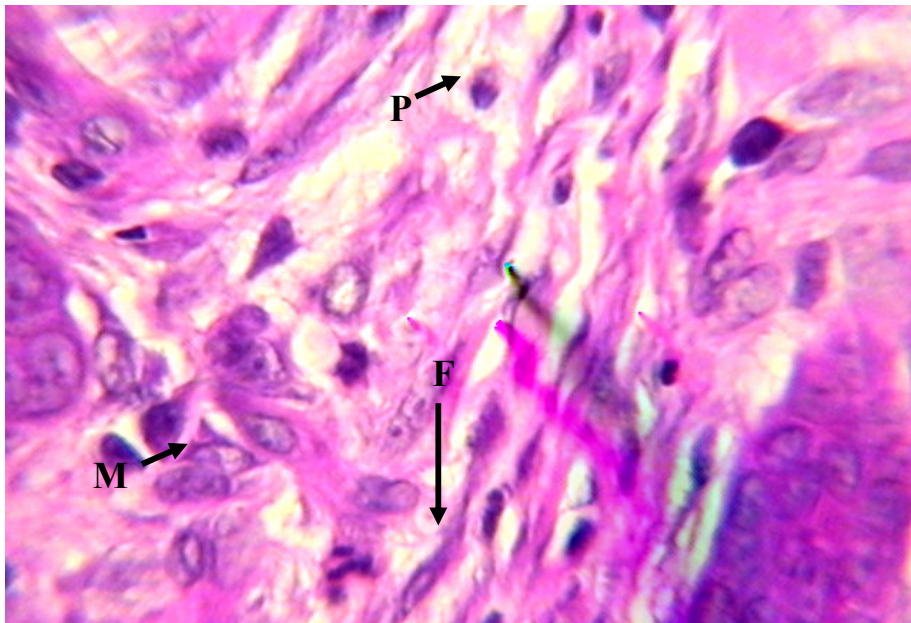


Foto 12. Corte de piel de perro. Se observa las células de reparación, **F)** Fibroblastos, **P)** Polimorfos nucleares, **M)** Macrófagos H-E a 100X.

Perra 8 (no tratada) en el día 10 de cicatrización.

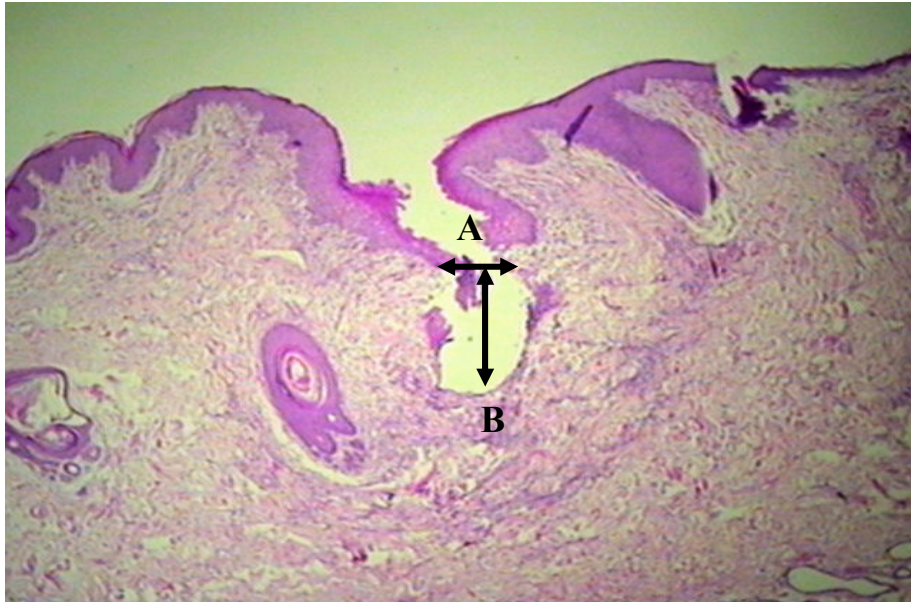


Foto 13. Corte de piel de perro; a) la distancia de los borde de la incisión es de 60 μm ; b) la profundidad de la incisión, con respecto a la reparación es de 440 μm . H-E. a 10X.

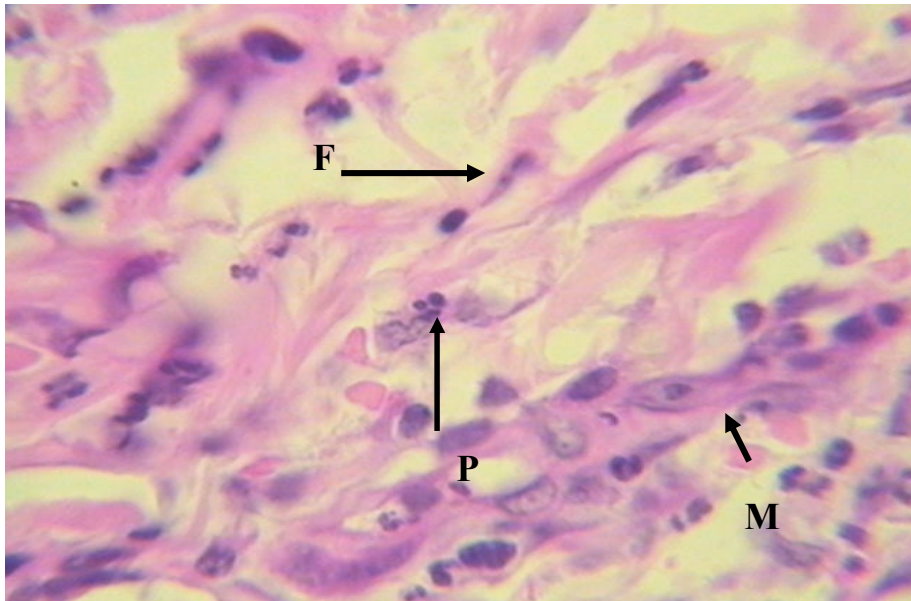
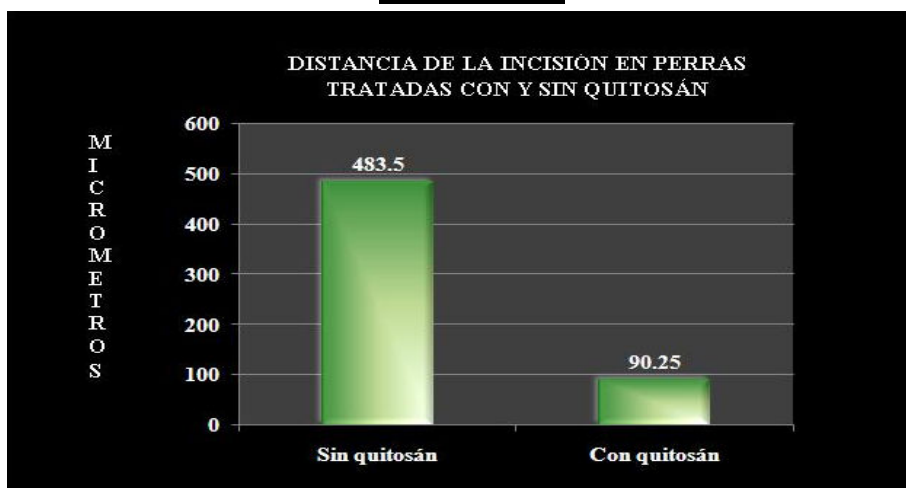


Foto 14. Corte de piel de perro. Se observa las células de reparación, **F)** Fibroblastos, **P)** Polimorfos nucleares, **M)** Macrófagos, H-E a 100X.

8.-DISCUSIÓN.



Gráfica 1. Distancia de la incisión en perras tratadas y no tratadas con quitosán.

La gráfica 1, muestra que la profundidad de la herida donde se utilizó quitosán fue menor en 393.25 μm comparada con la profundidad de la herida de los pacientes a los que no se les aplicó quitosán ($p=0.01$). Esto nos demuestra que la utilización de quitosán, reduce la distancia entre bordes en menos tiempo, de manera contraria, en los casos donde no se utilizó el quitosán es muy marcada la diferencia.



Gráfica 2. Profundidad de la incisión en perras tratadas y no tratadas con quitosán.

La gráfica 2, muestra que la profundidad de la herida donde se utilizó quitosán fue menor en 493.47 μm comparada con la profundidad de la herida de los pacientes a los que no se les aplicó quitosán ($p=0.03$). Esto nos demuestra que la utilización de quitosán promueve el rápido crecimiento epitelial en poco tiempo la profundidad de la herida, de manera contraria, en los casos donde no se utilizó el quitosán, es muy marcada la diferencia de la profundidad de la herida.

En los modelos experimentales de animales, se mostraron los efectos de quitina y quitosán para inducir la reparación en todas las fases de la herida (20). El quitosán en la fase inflamatoria tiene propiedades únicas hemostáticas que son independientes de la cascada de coagulación en forma normal (23). En los polímeros in vivo también puede actuar recíprocamente y puede modular la conducta de migración de neutrófilos y de macrófagos modificados, los procesos de la reparación subsecuentes como la fibroplasia y reepitelización (18). La quitina y el quitosán inducen al fibroblasto para liberar interleucina 8 la cual involucra la migración y proliferación de fibroblastos y células endoteliales (18).

9.- CONCLUSIONES.

- *Se puede comparar estos resultados contra la bibliografía de Joseph Harari en su libro de cirugía en pequeños animales donde nos dice la fase de reparación o proliferativa, comienza al tercer o cuarto día y dura de 1 a 3 semanas (16).
- *La quitina y el quitosán ambos poseen muchas propiedades que son ventajosas para la reparación de heridas, tales como: biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad hemostática, anti-infecciosa y aceleradora de la reparación de heridas (cicatrización) (2, 29, 30,33).
- *En los estadios finales de la reparación de heridas, el tejido de granulación es degradado por enzimas y luego es remodelado. Enzimas como la colagenasa y la gelatinasa son liberadas en el tejido por los fibroblastos y macrófagos y juegan un papel central en el proceso (2, 29, 30,33).
- * Se demostró el efecto acelerador de la cicatrización del quitosán en la incisión quirúrgica a nivel de línea media en la región infraumbilical en perras mediante una comparación de medias con muestras pareadas con un estudio de T-Student entre los casos tratados y los casos no tratados.
- * A través del seguimiento fotográfico se demostró macroscópicamente que las perras tratadas con quitosán, tuvieron una cicatrización mas rápida que las perras no tratadas.
- * La comparación microscópica a través de la evaluación histológica mostró que las perras tratadas con quitosán tuvieron una cicatrización acelerada Se puede comparar estos resultados contra la bibliografía de Joseph Harari en su libro de cirugía en pequeños animales donde nos dice la fase de reparación o proliferativa, comienza al tercer o cuarto día y dura de 1 a 3 semanas (16). En nuestro trabajo hubo perras que cicatrizaban desde el día 2 de la cicatrización, día 4 de la cicatrización, día 6 de la cicatrización.

- * El quitosán promueve la presencia de una mayor cantidad fibroblastos en las etapas temprana de la cicatrización.
- * Existe una menor presencia de células Polimorfonucleares en perras tratadas con quitosán.
- * Existe una menor presencia de macrófagos, células plasmáticas y linfocitos en perras tratadas con quitosán, éste puede ser un indicativo de una menor incidencia de infección.
- * En las evaluaciones histológicas se demostró en las perras tratadas con quitosán una menor distancia y profundidad de la incisión en menor tiempo.

BIBLIOGRAFÍA.

1. A. NOEL Ormrod (1975). "Técnicas quirúrgicas en el perro y en el gato". (3ª.ed.).México. Editorial: Compañía EditorialContinental, S. A. p.p. 40.
2. Abhay SP, inventor. "Hemostatic wound dressing". US patent 5 836 970. November 17.1998.
3. Bloom Fawcett (1986). "Tratado de histología". (11ª. ed.). México. Editorial: Interamericana·McGraw-hill. p.p. 549-564.
4. Brancroft, J. D. Stevens A. Turner D. (1990)."Theory and Practice of Histological Techniques". Gran Bretaña Editorial: Churchill Livingstone. p.p.726
5. Cancer, C, Vergano, P.J. and Wiles J. L. "Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage". Journal of food science, Volume 63, No 6, 1998, p.p. 1049-1053.
6. Chung LY, Schmidt RJ, Hamlyn PF, Sager AM, Andrews AM, Turner TD. Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 "fibroblasts in culture". J Biomed Mater Res 1994;28:463}9.
7. Dellman Dieter (1994). "Histología Veterinaria". (2ª. ed.). España. Editorial: Acribia, S.A. p.p. 334-336.
8. Diegelmann RF, Dunn JD, Lindbald WJ, Cohen IK. "Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, "fibroplasia , and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implants in rat wounds". Wound Rep Reg 1996;4:48,52.
9. Fereidoon Shahidi, Janak Kamil, Viddana Arachchi and You-Jin Jeon, "Food application of chitin and chitosan". Trends in food science and technology, Volume 10,1999, p.p 37-51.
10. Garnica Martínez Omar E. "Permeabilidad al vapor de agua y propiedades mecánicas de películas modificadas de quitosán". Tesis profesional, Fes Cuatitlán. UNAM.2001.
11. Gartner P. Leslie. "Histología Texto y Atlas". (1ª. ed.).México ed Interamericana·McGraw-hill Impreso en México 1997. 285-288.
12. Gennesar Finn. (2000). Histología. (3ª. ed.). Buenos aires. Editorial: Medica Panamericana. p.p. 209-216.
13. Garrido, F.G. (2001). "Manual para laboratorios de ciencias biológicas". Editorial: F.E.S. Cuautitlán, UNAM. México.

14. H. Ueno, T. Mori, T. Fujinaga, "Topical formulations and wound healing applications of chitosan", Adv. Drug Deliv. Volume. 52, 2001, p.p. 105-115.
15. Ham W. Arthur. (1975). Tratado de histología. (6ª. ed.). México: Editorial Interamericana, S.A. p.p. 272.
16. Harari Joseph. Cirugía en pequeños animales. Ed. Inter-medica Primera edición 2001. Impreso en Colombia. pp.41-47.
17. Hosokawa, jun., Masashi Nishiyama, Kazutoshi Yoshihara y Takamasa Kubo. "Biodegradable film derived from chitosan and homogenised cellulose". Industrial engineering chemical, No 29, 1990, p.p. 800-805.
18. J. F. Prudden, P. Migel, P. Hanson, L. Friedrich, L. Balassa. "The discovery of a potent pure chemical wound-healing accelerator". Am. J Surg, Volume 119 , 1970 , p.p. 560-564.
19. Junqueira L.C. (2002). Histología básica. (5ª. ed.). España: Editorial Masson. p.p. 229-232.
20. Kosaka T, Kaneko Y, Nakada Y, Matsuura M, Tanaka S. "Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress". J Vet Med Sci 1996;58:963}7.
21. Lee, G. L. (1968). "Manual of Histologic Staining methods of the armed forces Institute of pathology" EUA.: Editorial: Mc Graw - Hill. p.p. 257.
22. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, Minami S, Fujinaga T. Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of "fibroblasts in vitro". Biomaterials 1997;18:947}51.
23. Nystrom, Bo. Kjoniksen, Anna-Lena y Inverse, Christian. "Characterization of association phenomena in aqueous systems of Chitosan of different hydrophobicity". Advances in Colloid and interface Science, No. 79, 1999, p.p. 81-103.
24. Okamoto Y, Shibasaki K, Minami S, Matsuhashi A, Tanioka S, Shigemasa Y. "Evaluation of chitin and chitosan in open wound healing in dogs". J Vet Med Sci 1995;57:851}4.
25. Paniagua Gómez Álvarez Ricardo. (1997). "Citología e Histología Vegetal y Animal". (3ª. ed.). España: Editorial Interamericana, S.A. p.p. 516.

26. R.A.A. Muzzarelli, Mattioli-Belmonte, A. Pugnali, G. Biagini, Biochemistry. “Histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing”, in: P. Jolles, R.A.A. Muzzarelli (Eds), Chitin and Chitinases, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1999, p.p. 251-264.
27. Rao SB, Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: “studies on its safety and hemostatic potential”. J Biomed Mater Res 1997;34:21-28.
28. S. Minami, Y. Okamoto, K. Hamada, Y. Fukumoto, Y. Shigemasa, “Veterinary practice with chitin and chitosan”, in: P. Jolles, R.A.A. Muzzarelli (Eds), Chitin and chitinases, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 1999, p.p. 265-277.
29. Suzuki Y, Okamoto Y, Morimoto M, et al. “Influence of physicochemical properties of chitin and chitosan on complement activation”. Carbohydr Polym. 2000; 42: 307-310.
30. Thomihata K, Ikada Y. “In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives”. Biomaterials. 2001; 22:165-173.
31. Thomson (2004-2005). “Prontuario de Especialidades Veterinarias Farmacéuticas, Biológicas y Nutricionales”. (24^a. ed.). México: Editorial. Industria Farmacéutica Veterinaria. p.p.951.
32. Trejo, Verónica., Aragón, Nidia Miranda, Patricia, “Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán”. Revista de la sociedad Química de México, Volumen 45, No 1, 2001, p.p. 1-5.
33. Ueno H, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Ueda T, Fuginaga T.” Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. Biomaterials”. 2001; 22: 1667-1673.
34. Wong, Dominic W.S., Gastineau, Francois A., Gregorsy, Kay S., Tillin, Sandra J., Pavlath, Attila E. “Chitosan-Lipid Films: Microstructure and Surface Energy”. Journal of Agric and Food chemistry, Volume 40,1992, P.P. 540-544.
35. Y. Suzuki, Y. Okamoto, M. Morimoto, H. Sashiwa, H. Saimoto, S. Tanioka, Y. Shigemasa, S. Minami, “Influence of physico-chemical properties of chitin and chitosan on complement activation”, Carbohydr. Polym. Volume 42, 2000, p.p. 105-115.