



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“ELABORACIÓN DE UN LIOFILIZADO DE EPIPLÓN DE ORIGEN
CANINO Y SU EVALUACIÓN COMO CICATRIZANTE DE HERIDAS
QUIRÚRGICAS CRÍTICAS EN RATAS”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

YESSICA ROSALINDA HERAS ROMERO



ASESOR PRINCIPAL: DR. GILBERTO CHÁVEZ GRIS
CO-ASESORES: DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA
DR. ALFREDO CORTÉS ARCOS
MÉXICO D.F., 2005



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.

DEDICATORIAS

A mis padres

Gracias a la vida por darme unos padres como ustedes que han sido siempre mi ejemplo a seguir, gracias por su amor incondicional, por su dedicación para hacer de mi una profesional, por apoyar y respetar mis sueños y decisiones. Los quiero mucho

A Miguel

Por brindarme tu amor y por estar siempre. Te amo

A mi hermana

Porque contigo compartí una de las mejores etapas de mi vida, la niñez.

A mi abuelita Susana

Por ser una fuente inagotable de energía, por ser el mejor ejemplo que he tenido en mi vida de lo que es luchar por lo que se quiere y por el amor que siempre me ha dado.

A mi tío Jaime

Por apoyarme siempre en los momentos difíciles, compartir conmigo los mejores momentos y por hacerme siempre sentir como tu hija.

A mis amigas y amigos

Tesoro invaluable que constituye una de mis mayores riquezas.

"A todos ellos les dedico los momentos difíciles que logré superar, mis alegrías y el esfuerzo realizado por concluir una meta más en mi vida"

AGRADECIMIENTOS

Gracias a cada una de las personas a quien les dedico este trabajo, gracias por ser tan importantes en mi vida.

Al Dr. Miguel Ángel Cuevas Díaz, gracias por tu colaboración en la realización de este trabajo, por la elaboración de los cuadros, por el apoyo y disposición que te caracterizan.

A mis asesores:

Dr. Gilberto Chávez Gris por brindarme el financiamiento, tu tiempo, tus enseñanzas y por haberte convertido en un amigo.

Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara por estar siempre pendiente de mí y de este proyecto, por todo su apoyo, disposición y por brindarme su amistad.

Dr. Alfredo Cortés Arcos por todo lo que aprendí de usted durante este proceso, por su gran apoyo, compromiso y cariño.

A los miembros del honorable jurado por ser imparciales y justos: Dra. Laura Patricia Noé Martínez, Dr. Jesús Paredes Pérez, Dra. Laura Cobos Marín, Dr. Jorge Hernández Espinosa, Dr. Gilberto Chávez Gris.

Un agradecimiento muy especial a una gran amiga Dra. Claudia Verónica Rivera Cerecedo por proporcionarme las ratas para llevar a cabo este proyecto, por tu apoyo incondicional y sobre todo por tu confianza.

Al Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por haberme proporcionado las ratas y el alojamiento para ellas.

Al M. en C. Francisco Javier García Vázquez por tu colaboración en la realización de la técnica de inmunohistoquímica, porque sin conocerme me brindaste tu confianza, por todo lo que me enseñaste y porque ahora eres un amigo.

Al Dr. Emilio Rendón Franco por ayudarme a realizar las cirugías en las ratas, por estar siempre dispuesto y por ser un grandioso amigo.

A la Dra. Alicia Olivera Ayub por proporcionarme los perros y permitirme trabajar en la Coordinación de Enseñanza Quirúrgica.

A la Dra. Susana Rojas Maya por su colaboración en el proceso de liofilización.

Al Dr. Carlos Tena Betancourt por la realización de la esterilización del epiplón liofilizado.

A la Dra. Frida Salmerón Sosa por su colaboración en las pruebas estadísticas y por ser una muy buena amiga.

A la Dra. Evangelina Romero Callejas por estar siempre pendiente de los avances de este trabajo y de mí, por enseñarme tantas cosas y por brindarme su amistad.

A mi mejor amiga Andira Hernández Romahan por tu apoyo incondicional, tu disposición y sobre todo por la maravillosa amistad que tenemos.

A Rebecca Nava Street por proporcionarme material para este trabajo, por tu apoyo y por ser una de mis mejores amigas.

A todos mis amigos de la Coordinación de Cirugía: Sarai, Rosa, Paloma, Martha, Paco, Karina, Víctor por su colaboración en este trabajo y por su desinteresada amistad.

A mis amigos que durante toda la carrera compartimos momentos inolvidables y porque aprendimos unos de otros: Amaranta, Cinthya, Rodrigo, Ricardo, César, Jorge, Israel.

A la Lic. Berenice Cuevas Díaz por tu colaboración en el diseño de imágenes y por ser la mejor cuñada.

Al Dr. David Paez, por su colaboración en las pruebas de tensión de la herida.

A Luis Morales Arreola, por la realización de los cortes histológicos para este trabajo.

A Jaime Eugenio Cordoba, por su apoyo en las microfotografías tomadas.

A la Secretaría de Desarrollo Institucional de la UNAM a través de la Dirección General de Evaluación Educativa y del programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL) por haberme otorgado la beca.

A todos aquellos, que aún sin mencionar, participaron directa o indirectamente, en la realización de esta tesis.

”La verdadera amistad es la que sigue a tu lado incluso cuando no te queda nada por ofrecer, salvo tu compañía”. Anónimo

CONTENIDO

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales de la piel	1
1.1.2 Epidermis	1
1.1.3 Unión dermoepidérmica	1
1.1.4 Dermis	2
1.1.5 Tejido subcutáneo	2
1.2 Proceso de cicatrización en la piel	3
1.2.1 Eventos de inflamación durante el proceso de cicatrización	3
1.2.1.1 Hemostasia	3
1.2.1.2 Citocinas que participan en la cicatrización	4
1.2.1.3 Migración de células granulocíticas	4
1.2.1.4 Epitelización	5
1.2.2 Formación de tejido de granulación	6
1.2.2.1 Fibroplasia	7
1.2.2.2 Angiogénesis	7
1.2.3 Remodelación	8
1.3 Colágena	9
1.3.1 Deposición de colágena durante la cicatrización	9
1.4 Factores de crecimiento celular	10
1.4.1 Factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β)	11
1.4.2 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	12
1.4.3 Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)	12
1.4.4 Factor de crecimiento epitelial (EGF)	12
1.4.5 Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)	13
1.5 Biomembranas	13
1.5.1 Últimos avances en la generación de biomembranas	13
1.5.2 Apósitos sintéticos	14
1.5.3 Apósitos biológicos	14
1.5.4 Injerto de epiplón	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	16
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17

5.	MATERIAL Y MÉTODOS	18
5.1	Origen y obtención de las muestras	18
5.2	Procesamiento de la muestra	18
5.3	Liofilización de la muestra	18
5.4	Esterilización del liofilizado	19
5.5	Caracterización y pureza del liofilizado	19
5.5.1	Determinación del tipo de colágena	19
5.5.2	Determinación de la concentración de proteína	20
5.5.3	Determinación del porcentaje de colágena e hidroxiprolina	20
5.5.4	Prueba de esterilidad del liofilizado	20
5.6	Diseño experimental	20
5.6.1	Procedimiento quirúrgico	21
5.6.2	Grupos de estudio	21
5.6.3	Tratamiento	21
5.7	Evaluación macroscópica	22
5.8	Evaluación histopatológica	22
5.9	Evaluación por Inmunohistoquímica	24
5.10	Medición de fuerza de tensión de la herida	26
5.11	Prueba estadística	26
6.	RESULTADOS	26
6.1	Pureza del liofilizado	27
6.1.1	Determinación del tipo de colágena	27
6.1.2	Determinación de la concentración de proteína	27
6.1.3	Determinación del porcentaje de colágena e hidroxiprolina	27
6.1.4	Prueba de esterilidad del liofilizado	27
6.2	Estudio macroscópico	28
6.2.1	Cambios macroscópicos de 1 a 5 días postquirúrgicos	28
6.2.2	Cambios macroscópicos a los 10 días postquirúrgicos	30
6.2.3	Cambios macroscópicos a los 15 días postquirúrgicos	31
6.2.4	Cambios macroscópicos a los 20 días postquirúrgicos	32
6.2.5	Cambios macroscópicos a los 22 días postquirúrgicos	33
6.3	Evaluación histopatológica	34
6.3.1	Tinción Hematoxilina y Eosina	34
6.3.2	Tinción tricrómica de Masson	35
6.4	Evaluación por Inmunohistoquímica	36
6.5	Medición de fuerza de tensión de la herida	45
7.	DISCUSIÓN	46
8.	CUADROS	51
9.	ANEXOS	61
10.	REFERENCIAS	63

RESUMEN

HERAS ROMERO YESSICA ROSALINDA. Elaboración de un liofilizado de epiplón de origen canino y su evaluación como cicatrizante de heridas quirúrgicas críticas en ratas. (Bajo la dirección de los Drs. Gilberto Chávez Gris, Francisco Javier Basurto Alcántara y Alfredo Cortés Arcos).

La cicatrización es una secuencia de eventos que se desencadenan como respuesta a una lesión tisular y que comprende la participación de factores humorales y celulares en la reparación del tejido lesionado. Estos eventos pueden alterarse en algunas ocasiones por la presencia de cuerpos extraños, infecciones o problemas vasculares. En la actualidad se han utilizado biomembranas para acelerar el proceso de cicatrización en la piel. En este trabajo se caracterizó y evaluó un liofilizado de epiplón canino. En la caracterización del epiplón liofilizado se determinó que las variantes genéticas de la colágena fueron: tipo I, III, V, VII y XIV. Se detectó que un 18.6% de la muestra fue proteína de la cual el 85.05% correspondía a colágena y el 14.95% a Hidroxiprolina (HOpro). En la evaluación biológica se emplearon 66 ratas Wistar, a las que se les extirpó una porción de piel mediante incisiones quirúrgicas en la región dorsal, bajo anestesia general. Con los animales se formaron tres grupos para comparar los efectos cicatrizantes del epiplón liofilizado con los del Aceexamato de sodio (Recoverón^{MR}) y sin tratamiento (grupos A, B y C respectivamente). La valoración de las heridas se hizo en diferentes días del tratamiento mediante: observación macroscópica, análisis histopatológico, inmunohistoquímica y prueba de resistencia a la tensión en piel. Los resultados mostraron que el tiempo de cicatrización en el Grupo A fue menor comparado con los otros dos Grupos. La histopatología mostró que en los animales del grupo A, al día 17 de cicatrización, la epidermis se manifestó con una tendencia a lo normal y la dermis presentó una estructuración de colágena más homogénea y sin infiltrado celular; mientras que en las heridas del Grupo B y C se observó una falta de remodelación en la epidermis, así como un retraso considerable en el proceso de cicatrización; en el grupo C se apreció además, infiltración de células inflamatorias. La inmunohistoquímica mostró que los marcadores VEGF y AAML se manifestaron con mayor intensidad en el Grupo A, que en los Grupos B y C, mientras que el factor TGF- β se manifestó con mayor intensidad en el Grupo C, que en los Grupos A y B. En la prueba de resistencia a la tensión en piel, fue evidente que las muestras de los grupos A y B presentaron valores de presión en mm de Hg mayores a los del grupo C lo cual sugiere que las heridas del Grupo A fueron más resistentes a la tensión que las heridas del grupo C. Estos resultados sugieren que el epiplón liofilizado de origen canino promueve una mejor cicatrización de heridas críticas en la piel de ratas, tanto en tiempo de resolución, como en calidad.

1 . INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales de la piel

La piel tiene un sistema físico-químico equilibrado y altamente estable, es el órgano más extenso del cuerpo, responsable de múltiples funciones, entre las principales están: protección y aislamiento, termorregulación, percepción sensorial, control de la presión arterial, secreción, excreción, síntesis de vitamina D, almacenamiento, pigmentación, además indica algunos signos de enfermedades sistémicas. Básicamente, la piel está formada por dos capas: la epidermis y la dermis. La hipodermis corresponde al tejido subcutáneo sobre el que descansa la piel, conformando entre ambas una misma unidad morfológica y funcional.^{1, 2} (Figura 1)

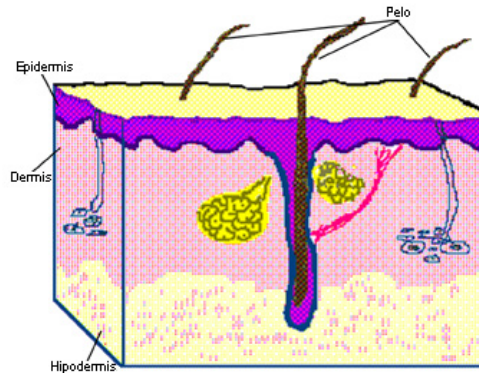


Figura 1. Capas de la piel

1.1.2 Epidermis

La epidermis es la porción más externa de la piel, está constituida por un epitelio escamoso estratificado que se queratiniza y origina los apéndices (uñas, pelos, glándulas sebáceas). Presenta tres tipos celulares: queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans; ocasionalmente pueden encontrarse células de Merkel y células indeterminadas. La epidermis constituye el 5% del espesor total de la piel.^{3, 4, 5}

1.1.3 Unión dermoepidérmica

La estructura, funciones y composición química de esta unión es compleja. Estructuralmente son cuatro componentes: a) membranas celulares de las células basales con sus complejos de unión "hemidesmosomas"; b) un espacio claro; c) la lámina basal y d) los componentes fibrosos asociados a la lámina basal, fibrillas de fijación, microfibrillas dérmicas y fibras de colágena. Esta unión es semipermeable, permite el intercambio de células y líquidos, entre la epidermis y la dermis; también actúa como soporte estructural para la epidermis y proporciona cohesión a la unión entre la epidermis y la dermis.³

1.1.4 Dermis

Es responsable de la fuerza estructural de la piel, se ubica en la parte intermedia de ésta y se compone en su mayoría de tejido conectivo fibroso, que contiene las redes nerviosas, vasculares y los apéndices cutáneos formados por la epidermis; los principales tipos celulares de la dermis son fibroblastos, macrófagos, mastocitos y linfocitos.³

La colágena tipo I es el componente primordial de la dermis, este material es resistente a la presión y actúa como proteína estructural en todo el organismo, corresponde al 70% del peso de la piel en seco.⁶

Los fibroblastos tienen gran capacidad para sintetizar y proliferar; el principal producto de su síntesis es la molécula de tropocolágeno, que al ensamblarse forma fibrillas de colágena tipo III principalmente; los fibroblastos también sintetizan fibras elásticas de reticulina y sustancia fundamental de la dermis que son el sostén de las fibras de colágena, elásticas y de las células.⁶

La vascularización de la piel consta de un plexo superficial, el cual atraviesa la dermis paralelamente a la epidermis y proporciona a las papilas dérmicas una rica red de capilares, arteriolas terminales y vénulas. El plexo profundo se localiza en la porción inferior de la dermis junto al tejido subcutáneo, está compuesto por vasos de mayor calibre, la epidermis es avascular y su nutrición se da por difusión simple; los vasos linfáticos dérmicos se encuentran asociados al plexo vascular.⁵

La dermis es rica en terminaciones nerviosas, el tacto y la presión están mediados por los corpúsculos de Meissner y de Pacini (mecano-receptores), mientras que la temperatura y el dolor son transmitidos por fibras nerviosas amielínicas que terminan en la dermis papilar y alrededor de los folículos pilosos. Las fibras adrenérgicas post-ganglionares del sistema nervioso autónomo regulan la vasoconstricción, la secreción de las glándulas apocrinas y la contracción de los músculos erectores del pelo.⁷

1.1.5 Tejido celular subcutáneo

Es la capa más interna de la piel, compuesta por lóbulos de adipocitos separados por tabiques fibrosos formados por colágena y vasos sanguíneos de gran calibre.¹

1.2 Proceso de cicatrización en la piel

Una herida es una solución de continuidad en los tejidos. Los mamíferos en su evolución filogenética, perdieron la capacidad de regenerar miembros o tejidos; hoy sólo conservan la posibilidad de reparar las lesiones de sus tejidos a través del proceso de cicatrización, es decir, con un tejido similar aunque no idéntico.⁸

En los mamíferos, se restablece la integridad del tejido perdido a través de la formación de una cicatriz de colágena; cualquier tipo de lesión desencadena una cascada compleja de procesos celulares y bioquímicos que dan lugar a la cicatrización de la herida. El proceso de cicatrización se divide en: inflamación, formación de tejido de granulación y finalmente la remodelación; las tres fases no son mutuamente excluyentes, sino que se superponen en el tiempo siguiendo una cronología.⁹

En cuanto a la fisiopatología de la cicatrización, el proceso puede tener una formación insuficiente de tejido conjuntivo, una destrucción excesiva de la cicatriz o bien, combinación de las dos. Las úlceras, son heridas con deficiente cicatrización, las hay de tipo vasculares, neuropáticas o multifactoriales; el caso contrario son las cicatrices queloides, en donde el depósito de tejido conjuntivo es exagerado, formando una cicatriz de tamaño desproporcionado, en comparación con la gravedad de la lesión, dicha cicatriz continúa creciendo durante periodos prolongados y no es reversible en situaciones sin tratamiento.¹⁰

1.2.1 Eventos de inflamación durante el proceso de cicatrización

Las primeras reacciones del organismo, a la separación de tejidos normalmente asociados, como la apertura de la barrera cutánea y daño a los vasos sanguíneos, son la vasoconstricción, adhesión de células y coagulación.¹¹

1.2.1.1 Hemostasia

La ruptura de los vasos deja expuesta la colágena subendotelial, lo que provoca la agregación de las plaquetas y la activación de la vía intrínseca de la cascada de la coagulación. El contacto entre la colágena y las plaquetas, así como la presencia de trombina, fibronectina y sus fragmentos, provocan la liberación de una serie de mediadores, incluyendo factores de crecimiento que activarán y reclutarán células

participantes en el proceso cicatrizal. Los efectos de las plaquetas en la cicatrización se encuentran resumidos en el Cuadro 1.¹²

1.2.1.2 Citocinas que participan en la cicatrización

De las citocinas secretadas en el proceso de cicatrización se encuentran: la interleucina-1 (IL-1) y factor α de necrosis tumoral (TNF- α , del inglés: *Tumor Necrosis Factor- α*), y factores de crecimiento celular a partir de las plaquetas como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF, del inglés: *Platelet Derived Growth Factor*) y Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF, del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*), cuyo efecto se resume en el Cuadro 2.^{13, 14}

Paralelo al proceso de agregación plaquetaria y activación de la vía intrínseca de la cascada de la coagulación, se lleva a cabo la formación del coágulo de fibrina, que además de ser importante para sellar temporalmente la herida, proporcionará una matriz para la migración de neutrófilos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales; sin embargo, la migración de estas células perjudica la cicatrización de la herida, ya que aumenta la cantidad de restos celulares a ser eliminados por los procesos celular e inflamatorio, incrementando el espacio muerto en la herida y proporcionando un medio excelente para el crecimiento bacteriano.¹⁵

1.2.1.3 Migración de células granulocíticas

En esta primera fase de inflamación conocida como Fase Temprana, la migración celular hacia el interior del tejido ocurre de forma secuencial, el incremento de la permeabilidad vascular y la liberación de prostaglandinas, junto a la liberación de sustancias quimiotácticas como los Factores del Complemento, la IL-1, el TNF- α , el Factor β de Crecimiento y Transformación (TGF- β , del inglés: *Transforming Growth Factor- β*) a las pocas horas de haberse producido la herida, el Factor Plaquetario IV y los productos bacterianos, estimulan la migración de células granulocíticas polimorfonucleares: neutrófilos principalmente, eosinófilos y basófilos,¹³ las cuales se adhieren al endotelio de los vasos sanguíneos, secretan enzimas proteolíticas como elastasa, hidrolasa ácida, lactoferrina, colagenasa y lisozima; estas enzimas facilitan la penetración de las células a través de las paredes de los vasos. Los polimorfonucleares también son encargados de una primera limpieza en la zona de la herida, eliminando bacterias por fagocitosis,

mecanismos enzimáticos y de radicales de oxígeno;¹² la permanencia de este tipo celular depende del daño en el tejido y de la presencia o ausencia de infección.¹⁶

El segundo tipo de células que migran hacia la herida son los monocitos, atraídos por fragmentos de colágena, elastina, fibronectina, trombina activa y TGF- β .¹⁷

Una vez que el monocito llega a la zona del daño y se activa, recibe el nombre de macrófago; los macrófagos refuerzan la limpieza comenzada por los polimorfonucleares, son capaces de fagocitar y digerir materia extraña, además de secretar enzimas proteolíticas como colagenasas que facilitan la limpieza.¹⁸ Los macrófagos se adhieren a componentes de la Matriz Extracelular (MEC), la adherencia induce la expresión del Factor 1 estimulante de colonias (necesario para la sobrevivencia del macrófago), TNF- α y PDGF; otras citocinas son también sintetizadas, pero su expresión es independiente a la adhesión, éstas son el TGF- β , IL-1, el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF, del inglés: *Insulin-like Growth Factor*) y del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF, del inglés: *Epidermal Growth Factor*); esta interacción asegura la existencia de citocinas a nivel de la herida.¹⁹

Toda esta gama de factores son necesarios para iniciar la formación de tejido nuevo. Los macrófagos permanecen en la herida varias semanas, lo cual indica su presencia en las tres fases de la cicatrización: Inflamación, Formación de tejido de granulación y la fase final de Remodelación, siendo el macrófago el puente entre ellas.¹⁷

1.2.1.4 Epitelización

La epitelización es un proceso que se refiere al recubrimiento de la herida con un nuevo epitelio; la epitelización comienza 12 horas después del daño y se caracteriza por ir desde la formación de una matriz provisional por donde migran los queratinocitos hasta la repoblación de células especializadas,²⁰ creando una lámina basal compuesta de proteoglicanos, protecolágeno y tropocolágeno.²¹

Las tres principales fases de la epitelización son: migración de células por matriz provisional, mitosis y maduración de las células recién generadas.²²

En el daño epitelial las células pierden contacto entre sí mismas, se pierden los desmosomas, que son estructuras que conectan células y proveen así la fuerza de

tensión en el epitelio. Aunado a esta pérdida de estructura, la expresión de factores de crecimiento estimulan movimiento y proliferación de queratinocitos para hacer contacto con las células del otro lado de la herida; estos factores incluyen la familia de receptores EGF, FGF y TGF- β .²²

El paso final de la epitelización es la maduración de la epidermis, que da lugar a la diferenciación de células con funciones sensoriales, de pigmentación y de barrera inmune.²⁰

Los neutrófilos y los linfocitos sufren una apoptosis y son fagocitados por los macrófagos; los espacios de tejido conjuntivo que inicialmente se habían llenado con proteoglicanos, proteoglicano y tropocolágeno, empiezan a mostrar delgadas fibrillas de colágena claramente diferenciadas, que se disponen de forma paralela al eje longitudinal de los fibroblastos. Los capilares en desarrollo, que crecen entre los fibroblastos inmaduros rodeados por tropocolágeno, el cual se condensa para formar una estructura de soporte para las fibrillas de colágena tipo I, IV y V.¹⁵

A medida que la cicatrización continúa, muchos de los capilares formados, primero se transforman en vasos de mayor tamaño o dejan de funcionar y desaparecen. Los conductos linfáticos se desarrollan de un modo similar a los vasos sanguíneos, pero de forma más lenta, por lo que el drenaje linfático de la herida no es bueno durante la fase inicial de la cicatrización.²³

1.2.2 Formación de Tejido de Granulación

El tejido que ocupa el espacio dejado por la herida, llamado tejido de granulación, es una mezcla de asas capilares en ramificación rodeados por células mesenquimatosas y MEC. El tejido de granulación, además de las células inflamatorias ya mencionadas, consiste en la aparición de otros tipos celulares como histiocitos, fibroblastos, fibrocitos, células plasmáticas, células cebadas, angioblastos y miofibroblastos, estas células llegan a partir del cuarto día y nuevamente son tres los factores principales que intervienen para la formación de este tejido: las citocinas, con actividades mitogénicas, quimioatrayentes y reguladoras; el nivel de actividad de las células blanco y la MEC presente.²⁰

Los macrófagos, los fibroblastos y los angioblastos migran juntos al sitio de la lesión. Los macrófagos proveen las citocinas necesarias para estimular la formación de la nueva MEC (fibroplasia) y angiogénesis; los fibroblastos sintetizan los componentes de esa

nueva matriz, los angioblastos promueven la formación de vasos sanguíneos de neoformación para facilitar la oxigenación y transporte de nutrientes necesarios para que las células lleven a cabo esta fase de la cicatrización.⁹

1.2.2.1 Fibroplasia

La fibroplasia es una mezcla de fibroblastos y MEC, el proceso comienza con la matriz provisional que sirve de estructura y reserva de citocinas (FGF, TGF- β , IL-4) para la diferenciación de los fibroblastos. Los fibroblastos modifican la MEC con la síntesis y depósito de componentes de MEC, esta matriz afecta a los fibroblastos regulando su función incluyendo su habilidad para sintetizar y depositar componentes de MEC.²⁴ Este proceso se explica mejor con el ejemplo de la relación PDGF-Fibroblastos; el PDGF estimula la migración de los fibroblastos y regula la aparición de integrinas, por su parte la MEC altera la regulación ejercida por este factor de crecimiento, cuando los fibroblastos se encuentran en una matriz rica en fibronectina o fibrina; así los fibroblastos responden a PDGF dependiendo de la MEC en la que se encuentren.^{12, 25}

Una vez instalados los fibroblastos en la herida, gradualmente aumenta su síntesis de proteínas: fibronectina y colágena tipo I y tipo III. Los factores de crecimiento responsables de inducir este proceso son TGF- β y en menor cantidad de IL-4, producida por las células cebadas de la herida²⁶. Cuando ya se ha depositado suficiente colágena en la herida, los fibroblastos cesan su producción aún cuando continúe una alta expresión de TGF- β , la cual indica la existencia de un factor que suprime la síntesis de proteínas de MEC en los fibroblastos, éste es el INF- γ ,²⁷ además de existir inhibición por la misma matriz de colágena.

1.2.2.2 Angiogénesis

La angiogénesis es dependiente de la fibroplasia, ya que sin la formación de nuevos vasos sanguíneos, la fibroplasia no podría llevarse a cabo y sin una adecuada matriz extracelular, los nuevos vasos no podrían formarse. Las células endoteliales cercanas al estímulo angiogénico comienzan a migrar proyectando pseudópodos a través de la membrana basal fragmentada, posteriormente, las células siguen migrando por el espacio perivascular, proveyendo una fuente de células suficientes para la angiogénesis. Para que suceda una apropiada formación de vasos sanguíneos es necesaria la existencia de una adecuada MEC, así como determinadas citocinas para la migración y proliferación de las

células endoteliales. Hasta ahora, los factores encontrados para realizar dicha tarea son: FGFa y FGFb principalmente, pero también participan TGF- β , TNF- α , VEGF, Interleucina – 8 (IL-8), PDGF y ácido láctico.²⁸

Se ha demostrado la acción estimulante de la fibronectina en la proliferación de células endoteliales y que el PDGF tiene capacidad de ser, tanto quimioatrayente como mitogénico para este tipo celular.²⁵

La angiogénesis se desencadena a partir del daño tisular, las enzimas proteolíticas presentes degradan las proteínas de MEC dañadas, incluyendo la fibronectina. Los fragmentos de fibronectina y otros productos de degradación atraen células inflamatorias que secretan FGF como respuesta; esto origina una síntesis del activador del plasminógeno y la procolagenasa para activar la colagenasa. Los componentes de la membrana basal son degradados permitiendo la migración de las células endoteliales sobre una matriz rica en fibrina y fibronectina. A partir de este momento, se empiezan a formar tubos en donde se expresan integrinas de tipo $\alpha v \beta 3$ que facilitan la adhesión y migración de células endoteliales para la formación de un nuevo vaso sanguíneo. La matriz provisional de esta neovasculatura desaparece finalmente, substituyéndose por la verdadera membrana basal. Sin embargo, los nuevos vasos sanguíneos sufren una involución en la última fase de la cicatrización, mediada por apoptosis de células endoteliales y por la pérdida de interacciones con la MEC regulada por integrinas y mecanismos que muy posiblemente estén relacionados con la acción de proteinasas.²³

1.2.3 Remodelación

La remodelación se resume como la transición de la matriz provisional a una cicatriz rica en colágena, acompañada de maduración celular y apoptosis, que en conjunto forman la última fase del proceso cicatrizal. La remodelación comienza cuando la MEC se deposita al lado del tejido de granulación en desarrollo; después la MEC toma una posición central cuando el tejido de granulación crece en la herida. La composición y estructura de la matriz extracelular depende del tiempo transcurrido a partir del daño al tejido y de la distancia de la que está del centro de la herida; así como también depende de los tipos celulares, proteínas de matriz extracelular, citocinas y enzimas presentes durante la cicatrización. A este proceso complejo de interacción, retroalimentación y control de células-citocinas-enzimas-matriz, se le ha llamado **Reciprocidad Dinámica**.²⁹ La remode-

lación se lleva a cabo mientras el tejido de granulación invade la herida; cuando éste la ha cubierto con una nueva epidermis, los fibroblastos se transforman en miofibroblastos contrayendo la herida y las células de la epidermis se diferencian restableciendo la barrera de permeabilidad. Las células endoteliales son las primeras en presentar apoptosis, seguidas de los miofibroblastos. Los cambios en la MEC se presentan aún meses después iniciada la cicatrización.²⁰

1.3 Colágena

Las células de la piel se recambian constantemente estructurándose en una matriz de colágena; la colágena es el mayor constituyente de todas las matrices celulares y el más importante del sistema cutáneo, constituye el 25% de las proteínas totales en los mamíferos, actúa como soporte celular conservando la estructura física de los órganos internos y del tejido conectivo. La colágena pertenece a una familia de glicoproteínas de triple hélice que se encuentran en la matriz extracelular, pueden ser homo o heterotrimétricas, y están compuestas de diferentes cadenas alfa; se conocen al menos 25 cadenas alfa diferentes, codificadas en diferentes genes.³⁰

Las cadenas alfa tienen en común la presencia frecuente de secuencias Gly-X-Y, lo que permite a la molécula plegarse en triples hélices. Por lo general, la colágena es resistente a la lisis no específica, por lo que se requiere de enzimas llamadas colagenasas para su digestión y recambio. La diferencia entre los tipos de colágena reside en el tamaño, número de dominios colagenosos y su contenido de regiones no colagenosas. Los diferentes tipos de colágenas se han dividido en cuatro clases: colágenas fibrilares con triples hélices continuas (tipos I, II, III, V y XI); colágenas fibrilares con hélices discontinuas (tipos VI y VII); colágenas fibrilares con hélices discontinuas que forman una malla en la lámina densa y membrana basal (tipo IV); y colágenas no fibrilares (tipos VIII y XVIII).^{25, 31}

1.3.1 Deposición de colágena durante la cicatrización

Una de las características principales de la colágena es su capacidad para polimerizarse formando agregados fibrilares para proveer de resistencia a la herida. El primer tipo de colágena en depositarse durante la cicatrización es el tipo III. A partir del quinto día de iniciado el proceso de cicatrización, la colágena tipo I aparece, lo que concuerda con el

incremento en la resistencia de la herida; la colágena tipo I gradualmente va a reemplazar a la colágena tipo III. Los días donde hay mayor cantidad la colágena, es entre los 5 y 14; terminado este periodo, la síntesis y depósito de colágena son reguladas por la degradación de la molécula de colágena y la inhibición de la actividad de los fibroblastos. La colágena tipo V aparece en los días en que la angiogénesis se está desarrollando, lo que manifiesta que existe una asociación de esta proteína con las células endoteliales. La colágena tipo VI aparece a las dos semanas después del daño, la secretan los fibroblastos y las células endoteliales, en adición a su función estructural, la colágena también ejerce efecto sobre las células que participan en el proceso de cicatrización. La matriz extracelular rica en colágena, altera la función de varios tipos celulares, ya que los fragmentos de colágena sirven como quimioatrayentes para fibroblastos; la matriz de colágena reduce la síntesis de colágena y la proliferación celular e inducen la síntesis de colagenasas. La colágena facilita la adhesión de factores de crecimiento como el FGF o TGF- β y funciona activándolos o desactivándolos; todas estas características de la proteína implican a la colágena como un miembro importante para la regulación y reparación de la integridad del tejido después de un daño.^{22, 32}

Una vez depositados los distintos tipos de colágena durante la remodelación, los miofibroblastos son fibroblastos con características de células de músculo liso y participan contrayendo la herida; los miofibroblastos tienen un citoesqueleto rico en actina y se encuentran en forma alineada a lo largo de la herida. Para que la contracción se lleve a cabo, es necesaria la presencia de la matriz de colágena y de la expresión de receptores de integrinas $\alpha 2\beta 1$; a pesar de la presencia de los miofibroblastos, restablecer la fuerza de tensión a niveles normales es un proceso lento que requiere del depósito de fibras de colágena. Nuevamente, es un proceso que será dependiente de la participación de un gran número de moléculas y células, actuando en un ambiente de reciprocidad, organización y dinamismo, capaz de llevar a cabo por el organismo en respuesta a un daño.⁹

1.4 Factores de crecimiento celular

Los factores de crecimiento celular participan de manera fundamental al inicio y en el mantenimiento de la cicatrización. Las plaquetas degranulan y liberan PDGF, TGF- β , EGF y factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1); estas sustancias estimulan la

quimiotaxis de células inflamatorias, de fibroblastos, de células epiteliales y de las células del endotelio vascular.³²

Como se mencionó anteriormente, los factores de crecimiento liberados por las células inflamatorias, los fibroblastos, los macrófagos, las células epiteliales y otras, mantienen el proceso de cicatrización, estimulando el crecimiento de los vasos sanguíneos y la formación de colágena.

Los factores de crecimiento celular son sintetizados y secretados por muchos tipos de células, estimulando la mitosis continua de las células inactivas en un medio completo sin suero; estos factores de crecimiento pueden actuar sobre la propia célula productora (autocrinos), sobre células cercanas (paracrinos, yuxtacrinos) o sobre células alejadas (endocrinos). Todos los factores de crecimiento actúan uniéndose y activando receptores proteicos específicos de gran afinidad, situados en la membrana de la célula diana; no obstante los factores de crecimiento son degradados por las proteasas.³²

Actualmente se han descrito cinco familias de factores de crecimiento que tienen un papel potencial y fundamental sobre la cicatrización de las heridas: el Factor de Crecimiento y Transformación Beta (TGF- β), el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) pertenecientes a la misma familia, el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), el Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) y el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF).³³

1.4.1 Factor de Crecimiento y Transformación Beta (TGF- β)

El factor de Crecimiento y Transformación Beta (TGF- β , del inglés: *Transforming Growth Factor Beta*), se sintetiza en los macrófagos, las plaquetas, los linfocitos, los fibroblastos, las células óseas y los queratinocitos. Casi todas las células poseen receptores para el TGF- β ; este factor es quimiotáctico para los macrófagos, inductor de procolágeno tipo I y de fibronectina, inhibidor de las metaloproteasas y tiene un efecto antiproliferativo de las células epiteliales. Lo anterior muestra un fenotipo fibrótico, por lo que este factor de crecimiento se encuentra involucrado en la patogénesis de la cirrosis y fibrosis pulmonar.³⁴

El TGF- β también inhibe el crecimiento de varios tipos celulares, incluidas las células musculares lisas y los leucocitos, sin embargo es mitogénico para los fibroblastos; se almacena en una forma latente y se activa por acción de la plasmina o por la existencia de

un pH bajo a nivel de las heridas, el TGF- β estimula la quimiotaxis de las células inflamatorias y la síntesis de matriz extracelular, es posible que sea el péptido regulador de la cicatrización más importante.³⁵

1.4.2 Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEFG, del inglés: *Vascular Endothelial Growth Factor*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés: *Platelet Derived Growth Factor*) pertenecen a la misma familia, estos factores son secretados por las plaquetas, las células de la placenta, los fibroblastos, las células musculares lisas, las células del endotelio vascular y por los macrófagos. Es un potente agente quimiotáctico para los macrófagos y las células endoteliales; es un promotor precoz de la migración celular y de la fibrogénesis. El PDGF y el VEGF dan lugar a un incremento en la formación de tejido de granulación en los gatos diabéticos y un incremento en la cicatrización de úlceras de presión en los pacientes humanos. Bajo esta línea de investigación existen trabajos donde mencionan que el epiplón es el tejido productor de la mayor cantidad del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y realiza investigaciones en el laboratorio en la extracción y caracterización de los factores de crecimiento en la fracción soluble del epiplón, para poder aplicarlo a modelos experimentales de isquemia en animales.^{36, 37}

1.4.3 Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)

El Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF, del inglés: *Fibroblast Growth Factor*) está unido a la heparina en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos; el FGF unido a proteínas está protegido de la proteólisis.³⁸ Clark propone que la liberación de heparinasa, catepsina D y colagenasa durante la lesión tisular causa la liberación de FGF.¹²

El FGF actúa como agente mitogénico sobre las células endoteliales, los fibroblastos, los queratinocitos, los condrocitos y las células musculares lisas; en los modelos animales induce la migración celular, la neovascularización y la formación de tejido de granulación.

El FGF es producido por los fibroblastos, los astrocitos, las células endoteliales, las células musculares lisas, los condrocitos, los macrófagos y los osteoblastos.²⁵

1.4.4 Factor de Crecimiento Epitelial (EGF)

El Factor de Crecimiento Epitelial (EGF, del inglés: *Epidermal Growth Factor*) se sintetiza en las células renales, las glándulas lagrimales, las glándulas salivales y los megacariocitos; se encuentra en las lágrimas, la saliva y la orina. El EGF promueve la cicatrización, estimulando la migración y la división de las células epiteliales; incrementa la síntesis de proteínas como la fibronectina que interviene en la adhesión y migración celular.³⁶

1.4.5 Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF)

El Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF, del inglés: *Insulin-like Growth Factor*), se encuentra unido de forma reversible a las proteínas de unión del IGF de alta afinidad presentes en el suero; sólo la forma libre de IGF es activa. Es un potente agente quimiotáctico para las células del endotelio vascular, lo que incrementa la neovascularización, estimula la mitosis de los fibroblastos, los osteocitos y los condrocitos y favorece la regeneración dérmica y epidérmica.³⁶

1.5 Biomembranas

Las heridas en piel normalmente desencadenan una cascada compleja de procesos celulares y bioquímicos, que conducen de manera eficiente al restablecimiento de la integridad del tejido perdido, a través de una cicatriz de colágena; pero en aquellas heridas donde falta una gran porción de tejido epitelial, la cicatrización es deficiente, de tal forma representa un importante problema clínico, ya que tiene gran impacto sobre los preceptos de salvar la vida, acelerar la cicatrización, evitar o reducir secuelas, además de los gastos médicos.³⁹

Para ello, se han empleado materiales con semejanza en las propiedades más importantes de la piel, y así acelerar la reparación de las lesiones o bien reemplazar el tejido perdido.

1.5.1 Últimos avances en la generación de biomembranas

Durante los últimos años, se ha logrado un gran avance en el tratamiento de heridas donde falta una porción importante de piel. Existen numerosos medicamentos que aceleran el proceso de reparación tisular, por lo que se han realizado diversas investigaciones científicas y trabajos técnicos en las dos últimas décadas, con el propósito de obtener biomembranas.⁴⁰

Desde el punto de vista biológico, las biomembranas obtenidas hasta el momento no cumplen con las características de un material biomédico ideal, existen todavía dificultades importantes desde el punto de vista inmunológico y de la infectología principalmente (Cuadro 3). Sin embargo, en esta etapa transitoria, se ha obtenido un notable adelanto terapéutico. De esta forma, el poder contar con una gran variedad de sustitutos de piel, le permite al cirujano decidir entre las distintas opciones de materiales, no sólo para las pérdidas tisulares de diversas etiologías, sino también para muchas otras patologías tal vez menos graves pero de ninguna manera menos importantes, como las úlceras.^{40, 41}

1.5.2 Apósitos sintéticos

Los apósitos sintéticos, temporales son membranas de colágena acelular de capa única, son láminas delgadas biocompatibles y biodegradables por la colagenasa; estimulan el anabolismo del lecho receptor y la preparan para recibir el trasplante autólogo; llevan el nombre del laboratorio productor.⁴⁰

1.5.3 Apósitos biológicos

Son membranas procedentes de una dermis natural, por ejemplo la humana, procesada especialmente hasta obtener un material final acelular, pobremente inmunogénico.^{42,43}

Las membranas de cultivo, células cultivadas *in vitro*; son biopsias de piel tomadas de un organismo vivo y sometidas a un cuidadoso y especial método de laboratorio para obtener la reproducción de células. En el caso particular de los sustitutos de la piel, consiste en reproducir células epidérmicas, queratinocitos que proliferan ordenadamente en extensión y aposición, diferenciándose y formando membranas; es decir fibroblastos. En la práctica se aplican para su arraigo definitivo sobre la dermis o una matriz dérmica⁴⁴, así como sobre diversas matrices biocompatibles.⁴³

1.5.4 Injerto de epiplón

En los últimos años el epiplón fresco se ha utilizado como injerto para favorecer la angiogénesis, en padecimientos donde ésta se ve disminuida o ausente.⁴⁵

Se ha utilizado el trasplante de epiplón en varios padecimientos para tratar lesiones medulares de diversos orígenes, traumáticos o accidentes vasculares en el ámbito medular, con bastante éxito;⁴⁵ también se han realizado trasplantes de epiplón sobre el miocardio, estudio experimental en perros, confirmando su eficacia para su revascularización,⁴⁶ el epiplón ha sido usado en forma de injerto libre, para la cobertura de úlceras en piel de diabéticos⁴⁷ y en las fracturas expuestas de tibia, con buenos resultados.⁴⁵

Lo anteriormente descrito, brinda una idea integral de las alternativas terapéuticas utilizadas actualmente en el tratamiento de heridas con una importante pérdida de piel.

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el epiplón posee, entre sus características, una gran capacidad angiogénica e inmuno-reguladora, así como una alta concentración de colágena. Por otro lado, se ha demostrado que la utilización de colágena facilita la reparación de tejidos mediante la formación de una matriz extracelular y organización tisular. Con el fin de obtener un apósito biológico, almacenable, de fácil disposición, capaz de disminuir el tiempo y mejorar la cicatrización de heridas quirúrgicas en ratas, se elaboró un producto liofilizado con epiplones de origen canino.

3. HIPÓTESIS

- Si el empleo de epiplón fresco favorece el proceso de cicatrización de heridas en piel mediante la activación de la angiogénesis, entonces la utilización de epiplón liofilizado conservará estas propiedades al ser utilizado como terapia de cicatrización de heridas.
- Si el empleo de agentes cicatrizantes comerciales promueven una mejor organización tisular en el proceso de cicatrización, los cuales se reflejan en el tiempo de resolución así como en la calidad de reparación de los tejidos, entonces el empleo de epiplón liofilizado promoverá un tiempo menor de resolución, así como una mejor calidad de cicatrización al compararlos con los efectos del cicatrizante comercial.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la colágena del epiplón liofilizado de origen canino mediante análisis bioquímicos, así como evaluar su aplicación en heridas quirúrgicas en piel de ratas, para determinar su efecto cicatrizante.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el tipo de colágena así como su concentración en el epiplón liofilizado de origen canino mediante la utilización de cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) y la técnica de Biuret, para evaluar la posibilidad de utilizarla como un agente cicatrizante en ratas.
- Utilizar el epiplón liofilizado de origen canino como apósito biológico mediante su aplicación en heridas críticas de piel en ratas, con la subsecuente observación clínica, histopatológica, inmunohistoquímica, y determinar la resistencia a la tensión; para evaluar su potencial uso como agente cicatrizante en la terapéutica de heridas críticas en piel.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Origen y obtención de las muestras

Se utilizaron 5 perros mestizos, jóvenes (4-10 meses), la edad se determinó por las características dentales; clínicamente sanos, con un peso entre 8 y 12 kg, provenientes del antirrábico de Tláhuac.

Obtención del epiplón: se anestesió a los perros elegidos con pentobarbital sódico (Anestesal)¹ a razón de 20-25 mg/kg IV; se realizó venodisección y cateterismo en la arteria femoral para exanguinar totalmente al animal, de acuerdo a lo referido en el “2000 Report of the AVMA panel on euthanasia” (JAVMA 2000)⁴⁸ e inmediatamente se procedió a una laparotomía media para extraer el epiplón; previa antisepsia en el sitio de incisión. Para este procedimiento se utilizó instrumental de cirugía general y guantes estériles así como mecheros; la muestra se colocó en frascos estériles para ser transportados al laboratorio donde se procesaron. Este procedimiento se llevó a cabo en la Coordinación de Enseñanza Quirúrgica, del Departamento de Medicina y Cirugía para Pequeñas Especies de la FMVZ.

5.2 Procesamiento de la muestra

El epiplón fue lavado en agua tridestilada estéril por dos ocasiones; posteriormente se colocó en una superficie plana de madera para ser golpeado con un mazo de madera estéril con el fin de romper las células de grasa y proceder al lavado con agua tridestilada estéril. El epiplón se cortó en rectángulos de 6 cm² y se depositó en un frasco con 20 ml de cloroformo y 10 ml de metanol químicamente puros para realizar el desgrasado durante 48 hrs. Una vez eliminado el exceso de grasa, se lavó en agua tridestilada estéril y se colocó en cuadros de papel filtro, para su posterior liofilización. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Vacunología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ.

5.3 Liofilización de la muestra

La muestra se congeló en una combinación de hielo seco y acetona, al igual que los frascos *Fast-Freeze*.^{**} Una vez que la muestra estaba congelada, se introdujo en los frascos *Fast-Freeze* hasta completar un tercio de su volumen, para obtener la máxima superficie y

¹ Pfizer

^{**} Labconco

asegurar una liofilización eficiente, los frascos se cerraron con su tapa de caucho, se les colocó el adaptador, el cual es el punto de conexión para las válvulas y se conectaron al sistema de liofilización. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la FMVZ. De acuerdo a la metodología recomendada por el fabricante. Los parámetros de liofilización que se utilizaron fueron: 56×10^{-3} mBar vacío del sistema, -53°C temperatura del colector y 68°C del baño del precongelador, por 48 hrs en un sistema de liofilización *FreeZone*^{*} 12 litros.

5.4 Esterilización del liofilizado

Una vez liofilizados los cortes de epiplón, se envolvieron en un sistema de doble “*pouch*”² (papel de un lado y material plástico del otro). Las muestras se colocaron en una cámara de esterilización con óxido de etileno, en tarimas sin apretar para permitir la penetración y el acceso del agente en toda la superficie del dispositivo, siempre de modo que coincidiera papel con plástico. Para el proceso de esterilización se empleó una temperatura de 50°C , una concentración de óxido de etileno de $700 \mu\text{g/l}$ y una humedad relativa de 45%. Las muestras fueron esterilizadas en el Instituto Nacional de Cardiología.

5.5 Caracterización y pureza del liofilizado

5.5.1 Determinación del tipo de colágena

Se realizó la determinación, usando la cromatografía de gases de alta resolución (HRGC), con el empleo de detectores universales. La elección de este proceso se debió al amplio uso de la HRGC, por su versatilidad, sensibilidad, rapidez y principalmente, por la factibilidad de un análisis cualitativo de mezclas complejas, usando una mínima cantidad de muestra. Esta determinación se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunológica de la Facultad de Química, UNAM.

* Labconco

² Especialistas en esterilización y envase, S.A. de C.V.

5.5.2 Determinación de la concentración de proteína

Se definió mediante la técnica de Biuret,* empleando un equipo de espectrofotometría.** La elección de esta técnica se debió a que la reacción del Biuret se aplica a partir de los tetrapéptidos, a todos los péptidos y proteínas, para cuantificar la concentración de proteínas presentes en las muestras biológicas.⁴⁹ Esta técnica se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunológica de la Facultad de Química, UNAM.

5.5.3 Determinación del porcentaje de colágena e hidroxiprolina (HOpro)

Se realizó por el método de Woessner,⁴⁹ empleando un equipo de espectrofotometría.** Este método se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunológica de la Facultad de Química, UNAM.

5.5.4 Prueba de esterilidad del liofilizado

Se realizaron pruebas de esterilidad, sembrando las muestras de epiplón en dos medios de cultivo. Los medios de cultivo empleados fueron agar sangre y agar papa, para el aislamiento de posibles bacterias y hongos respectivamente.

Los cultivos se incubaron a 35°C por 144-168 horas en condiciones de aerobiosis para su posterior recuento y diferenciación de colonias.

5.6 Diseño experimental

Se realizó en ratas machos, adulto joven de la cepa Wistar convencionales, con un peso promedio de 250 gr \pm 20.

* Practicas de bioquímica y biología molecular Facultad de Química Dpto. Bioquímica, Biología Molecular e Inmunológica Curso 2002/2003 Práctica 02:
<http://www.um.es/bbmbi/AyudasDocentes/Practicas/Quimica/Practica02/Practica02.htm>

** Secoman Modelo 1100

5.6.1 Procedimiento quirúrgico

Todos los animales se tranquilizaron utilizando dehidrobenzoperidol (Droperidol^{MR}),* vía IM a una dosis de 2.5 mg/kg, y se les administró clorhidrato de Ketamina (Ketavet 1000^{MR})³ para inducir la anestesia vía IM a una dosis de 4-5 mg/100 gramos de peso vivo.

En todos los animales se realizó tricotomía de la región dorsal del tórax, posteriormente se aplicaron las medidas de antisepsia convencionales (lavado y embrocado), se trazó con marcador indeleble una circunferencia de 2.5 cm de diámetro para delimitar la piel a cortar. Se colocaron campos estériles y se cortó la piel utilizando tijeras de Mayo, no se realizó hemostasia.

5.6.2 Grupos de estudio

Se formaron tres grupos: un grupo experimental y dos testigos (con tratamiento comercial y sin tratamiento), grupos A, B y C respectivamente, cada grupo fue conformado por 22 animales elegidos al azar.

5.6.3 Tratamiento

Una vez concluido el procedimiento quirúrgico se colocó el epiplón liofilizado sobre la herida de las ratas pertenecientes al grupo experimental A. Los apósitos estériles se manejaron asépticamente, se cubrió la zona afectada con el epiplón liofilizado que se adhirió fácilmente por la humedad de la herida. El tamaño del apósito que en este caso fue el epiplón liofilizado sobrepasaba por lo menos 0.5 cm el borde de la herida.

Al grupo testigo B se le aplicó Acexamato de Sodio 5g (Recoverón^{MR})⁴ y el grupo testigo C no recibió tratamiento.

Los animales fueron alojados en forma individual en cajas de policarbonato, con agua y alimento *ad libitum* en el Vivarium del Instituto de Fisiología Celular UNAM, manteniéndose en condiciones higiénicas adecuadas con una correcta manipulación e identificación, acordes a la Norma Oficial Mexicana NOM-069-ZOO-1999.⁵⁰

* Janssen farmacéutica

3 Revetmex

4 Armstrong

5.7 Evaluación macroscópica

Durante los 22 días que duró el experimento, de cada animal se formó un archivo fotográfico diario; utilizando una cámara digital.*

5.8 Evaluación histopatológica

Para esta evaluación se realizó la eutanasia de tres ratas, una de cada grupo, cada 24 horas, a partir de las 24 horas siguientes de la cirugía hasta el día 22 del experimento.

La eutanasia se realizó en una cámara cerrada con Bióxido de Carbono (CO₂), por ser un método autorizado, dado el rápido efecto depresivo y anestésico que conduce a la muerte por hipoxia en pocos minutos, también porque no se acumula en los tejidos y no deforma la arquitectura celular.

El procedimiento fue el siguiente: se saturó la cámara con gas CO₂, previo a la introducción de los animales a una concentración mínima del 70%, inmediatamente a la muerte del sujeto, se tomó una biopsia del perímetro original de la herida y se fijo en formalina amortiguada al 10% para su posterior inclusión en parafina, se cortaron a 4 µm y se emplearon tinciones de Hematoxilina-Eosina y tricrómica de Masson, realizadas en el Departamento de Patología de la FMVZ.

Para el análisis histológico se realizó un estudio ciego, es decir, se revisaron las laminillas sin saber a qué grupo pertenecía cada una de ellas, para promover un análisis más objetivo de las muestras; utilizando un microscopio fotónico.⁵

Al analizar las laminillas con tinción H y E se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, hemorragia, edema, vasos de neoformación, organización de las fibras de colágena y reacción granulomatosa.

* Sony Dcs-S40 U

⁵ Leica Galen III

Para examinar las laminillas se asignaron los siguientes valores según la cantidad de células observadas:

Macrófagos por campo (1000x)

- 1 para células ausentes
- 2 para células escasas (1 a 2)
- 3 para células en moderada cantidad (3)
- 4 para células abundantes (4-5)

Neutrófilos por campo (400x)

- 1 para células ausentes
- 2 para células escasas (1 a 10)
- 3 para células en moderada cantidad (11 a 16)
- 4 para células abundantes (17 a 25)

Fibroblastos por campo (400x)

- 1 para células ausentes
- 2 para células escasas (1 a 5)
- 3 para células en moderada cantidad (6-10)
- 4 para células abundantes (10 a 20)

Presencia de Hemorragia por campo (400x)

- 1 ausente
- 2 dos campos
- 3 tres campos
- 4 cuatro campos o más

Observación de Edema por campo (400x)

- 1 ausencia
- 2 un campo
- 3 dos campos
- 4 tres campos o más

Número de Vasos sanguíneos de neoformación por campo (400x)

- 1 ausentes
- 2 escasos (1 a 7)
- 3 moderados (6 a 14)
- 4 abundantes (14 a 20)

Organización de la colágena por campo (400x)

- 1 ausente
- 2 disposición de las fibras de colágena sin dirección definida
- 3 alineamiento con forma de espina de pescado, con tendencia a ser horizontales al plano del borde de la lesión
- 4 alineamiento horizontal al plano del borde de la lesión y perpendiculares a los vasos sanguíneos

Observación de reacción granulomatosa por campo (400x)

- 1 ausente
- 2 dos campos
- 3 tres campos
- 4 cuatro campos o más

En el análisis de los cortes teñidos con tinción tricrómica de Masson, se evaluó la organización de las fibras de colágena, con los parámetros descritos en “Organización de la colágena” con la tinción H y E.

5.9 Evaluación por Inmunohistoquímica

En este proceso, las biopsias previamente fijadas en formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes a 2 μm de espesor. Los cortes histológicos se montaron en laminillas con poli-L-lisina para su posterior evaluación con la técnica de inmunohistoquímica.

El proceso de inmunohistoquímica se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular, del Departamento de Patología, en el Instituto Nacional de Pediatría, por el sistema de detección EPOS/HRP/Sistema por capilaridad. (Anexo)

Con respecto al incremento paulatino en la intensidad de la inmunotinción posterior al revelado con 3,3 diaminobenzidina* (DAB), en un aumento 400x, se revisaron de 10 a 20 campos considerando los más representativos de los sitios de lesión; se asignaron los siguientes valores: 1 para reacción negativa (Figura 2), 2 para reacción poco intensa (Figura

* Dako

3), 3 para reacción medianamente intensa (Figura 4) y 4 para reacción altamente intensa (Figura 5).

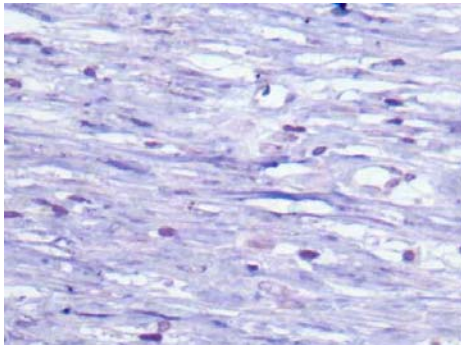


Figura 2. Microfotografía de piel de una rata del Grupo C (día 22). Control negativo. IHQ, VEGF. EPOS + HRP / DAB. (400x)

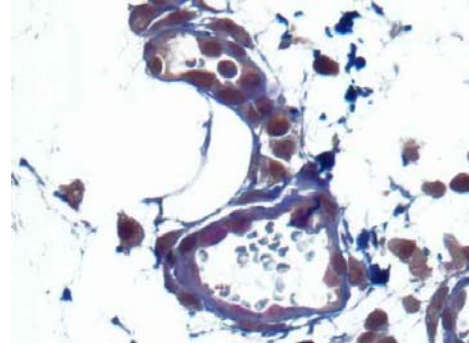


Figura 3. Microfotografía de piel de una rata del Grupo C (día 8). Reacción poco intensa. IHQ, VEGF. EPOS + HRP / DAB. (400x)

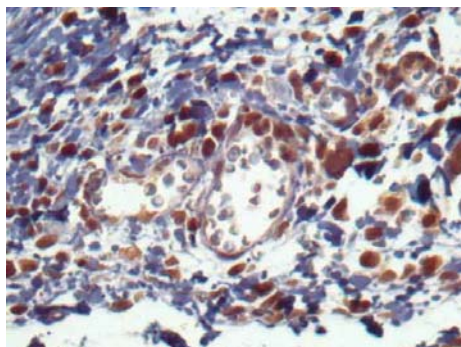


Figura 4. Microfotografía de piel de una rata del Grupo B (día 7). Reacción medianamente intensa. IHQ, VEGF, EPOS + HRP / DAB. (400x)

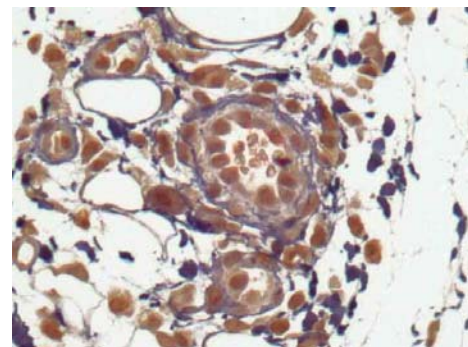


Figura 5. Microfotografía de piel de una rata del Grupo A (día 6). Reacción altamente intensa. IHQ, VEGF. EPOS + HRP / DAB. (400x)

5.10 Medición de fuerza de tensión de la herida

En este punto se seleccionaron animales pertenecientes a cada grupo de estudio, de acuerdo a la etapa de cicatrización de los días 12, 15, 18, 20 y 22, para medir la “tensión de herida”. Se llevó a cabo la eutanasia como se mencionó anteriormente, la piel fue retirada cuidadosamente mediante una disección fina para medir la “tensión de herida” con un aparato especialmente diseñado para tal fin por Wolarsky y Prudden⁵¹ y modificado por el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El valor de la tensión de la herida se obtuvo en mm de Hg.

5.11 Prueba estadística

Para el análisis estadístico de las biopsias se utilizó el programa SAS versión 8.0 para Windows, prueba de Wilcoxon no paramétrica y para graficar los datos, el programa Microsoft Excel 2000.

6. RESULTADOS

6.1 Pureza del liofilizado

6.1.1 Determinación del tipo de colágena

El epiplón liofilizado está constituido por: colágena tipo I, colágena tipo III, colágena tipo V, colágena tipo VII y colágena tipo XIV. Sin embargo, no fueron cuantificados los tipos de colágena.

6.1.2 Determinación de la concentración de proteína

Se detectó un 18.6% de proteína en las muestras.

6.1.3 Determinación del porcentaje de colágena e Hidroxiprolina (Hopros)

A partir de la determinación de la concentración de proteína, la concentración de colágena en las muestras de epiplón liofilizado fue del 85.05% y para Hopros fue del 14.95%.

6.1.4 Prueba de esterilidad del liofilizado

No hubo crecimiento de hongos, levaduras ni bacterias en los medios de cultivo después de 7 días de incubación en aerobiosis.

6.2 Estudio macroscópico

6.2.1 Cambios macroscópicos de 1 a 5 días postquirúrgicos

Se observó que el epiplón liofilizado se adhirió perfectamente a la herida en todos los animales del grupo A (Figura 6).



grupo A inmediatamente después de la aplicación del epiplón liofilizado.

En los animales del grupo A (Figura 7) la formación de la costra fue menos aparente que en la de los animales de los grupos B y C (Figuras 8 y 9 respectivamente); asimismo, en los individuos del grupo A, la contracción de la herida fue mayor, en comparación con los animales de los grupos B y C.



Figura 7. Fotografía de una rata perteneciente al grupo A. Al día 5, la lesión presentaba mayor contracción



Figura 8. Fotografía de una rata perteneciente al grupo B. Al día 5, la contracción de la herida es menor con respecto a los del grupo A.



Figura 9. Fotografía de una rata perteneciente al grupo C. Al día 5, existe una formación de costra más prominente sobre todo a la periferia de la herida.

6.2.2 Cambios macroscópicos a los 10 días postquirúrgicos

En los animales de los grupos A y B (Figuras 10 y 11 respectivamente, el relieve de volumen sobre la lesión fue menor que en los animales del grupo C (Figura 12); asimismo, en los animales de los grupos A y B no hubo presencia de exudado purulento mientras que, fue evidente la presencia de pus en cinco animales del grupo C.

El patrón de contracción de las heridas se apreció de manera similar en los animales de los grupos A y B, no siendo así en el grupo C, donde resultó menos evidente dicha contracción (Figuras 10, 11 y 12 respectivamente).

En algunas regiones de piel regenerada del grupo A, hubo presencia de pelo a partir del borde de la lesión. (Figura 10)



Figura 10. Fotografía de una rata perteneciente al grupo A. Al día 10, existe menor relieve de volumen sobre la lesión y presencia de pelo a partir del borde de la lesión.



Figura 11. Fotografía de una rata perteneciente al grupo B. Al día 10, se observa una menor contracción de la herida así como la formación de la costra.

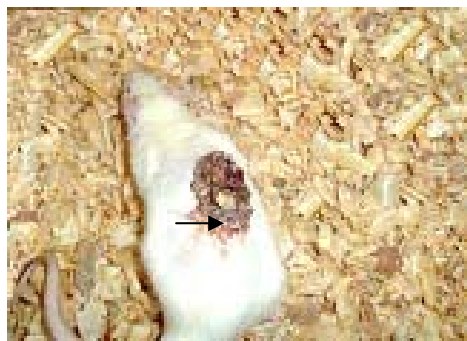


Figura 12. Fotografía de una rata perteneciente al grupo C. Al día 10, la costra presenta un aspecto granular; la flecha señala el exudado purulento

6.2.3 Cambios macroscópicos a los 15 días postquirúrgicos

En todos los grupos se observó una evidente reparación del tejido; en los grupos A y B (Figuras 13 y 14 respectivamente) la costra era de menor grosor en comparación con los individuos del grupo C (Figura 15). Las ratas del grupo C ya no mostraban un exudado purulento aparente. En cuanto a la contracción de la herida, los grupos A y B mantuvieron una similitud en relación al tamaño de la herida contra el tiempo de reparación, mientras en el grupo C el proceso de contracción de la herida fue más retardado.

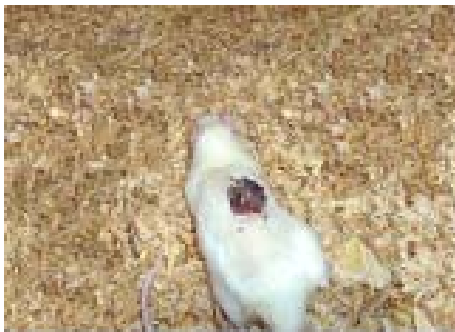


Figura 13. Fotografía de una rata perteneciente al grupo A. Al día 15, fue evidente la reparación del tejido.



Figura 14. Fotografía de una rata perteneciente al grupo B. Al día 15, se observa una costra semejante a la del grupo A



Figura 15. Fotografía de una rata perteneciente al grupo C. Al día 15, se aprecia un proceso de contracción de la herida más retardado.

6.2.4 Cambios macroscópicos a los 20 días postquirúrgicos

La reparación de la herida fue más evidente en las ratas del grupo A (Figura 16) que presentaron una costra más pequeña y delgada con relación a los individuos de los grupos B y C (Figuras 17 y 18 respectivamente). Cabe resaltar que en los individuos pertenecientes al grupo C, las costras fueron más gruesas (Figura 18).



Figura 16. Fotografía de una rata perteneciente al grupo A. Al día 20, se observa la costra más pequeña y delgada así como bordes regulares.



Figura 17. Fotografía de una rata perteneciente al grupo B. Al día 20, se aprecia una costra de mayor tamaño y con bordes ligeramente irregulares.



Figura 18. Fotografía de una rata perteneciente al grupo C. Al día 20, muestra una costra grande y con bordes irregulares.

6.2.4 Cambios macroscópicos a los 22 días postquirúrgicos

Los animales del grupo A (Figura 19), mostraron una cicatriz pequeña y con presencia de pelo en casi la totalidad del área donde estuvo la lesión, mientras que en las ratas que conformaron el grupo B (Figura 20), la cicatriz es de mayor tamaño con respecto a la cicatriz de las ratas del grupo A y con menor cantidad de pelo; sin embargo, al comparar al grupo B con el C (Figura 21) se observa que la cicatriz es menor en el grupo B, mientras que en el grupo C aún se observaba una la lesión con presencia de costra.



perteneciente al grupo A. Al día 22, la cicatriz es muy pequeña y prácticamente está cubierta de pelo.



perteneciente al grupo B. Al día 22 se observa claramente la cicatriz así como la falta de pelo en los alrededores.



Figura 21. Fotografía de una rata perteneciente al grupo C. Al día 22, aún muestra una cicatrización retardada con presencia de costra y falta de pelo en la piel cercana a la herida.

6.3 Evaluación histopatológica

6.3.1 Tinción Hematoxilina y Eosina

Al analizarse las biopsias mediante tinción H y E, se observó que las muestras del Grupo A (Figura 22) presentaron menor infiltración celular de macrófagos y neutrófilos, menor hemorragia, menor edema, mayor número de vasos de neoformación, mayor organización en las fibras de colágena y menor reacción granulomatosa (Cuadro 4).

Con respecto a las muestras del grupo B (Cuadro 5), presentaron mayor infiltración celular (Figura 23), mayor hemorragia y edema, que las muestras del grupo A, pero menor infiltrado celular, hemorragia y edema que las muestras del grupo C (Figura 24 y cuadro 6).

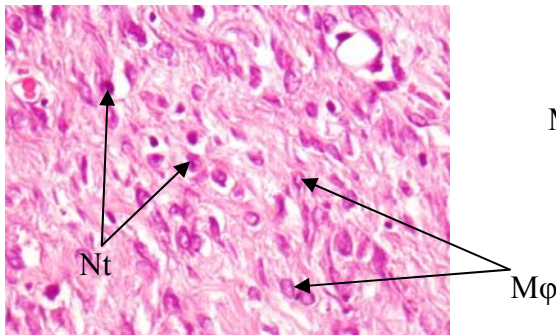


Figura 22. Microfotografía de piel de una rata del grupo A, al día 4 muestra poco infiltrado celular macrófagos (Mφ) y neutrófilos (Nt), con tinción H y E, (400x).

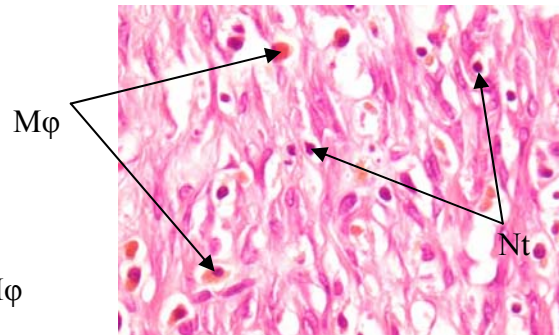


Figura 23. Microfotografía de piel de una rata del grupo B, al día 4 muestra infiltrado celular macrófagos (Mφ) y neutrófilos (Nt), con tinción H y E, (400x).

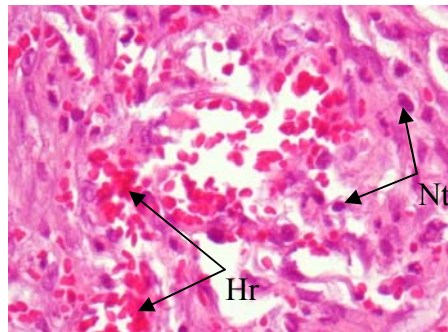


Figura 24. Microfotografía de piel de una rata del grupo C, al día 4 muestra abundante infiltrado celular, neutrófilos (Nt) y hemorragia (Hr), con tinción H y E, (400x).

6.3.2 Tinción con Tricrómica de Masson

En el Cuadro 7 se presentan los valores del análisis histopatológico, en el que los animales del grupo A mostraron que, el orden reticular de las fibras de colágena se encontraban alineadas en posición horizontal con respecto al plano del borde de la lesión y perpendiculares a los vasos sanguíneos a partir del día 11; mientras que las ratas de los grupos B y C fue a partir del día 19. En la Figura 25 se observó el alineamiento de las fibras de colágena en las muestras de los animales del grupo A, donde se aprecia claramente la organización de las fibras. La Figura 26 corresponde a las muestras de tejido de los animales del grupo B, las cuales presentaron menor organización de colágena en comparación con las del grupo A. En la Figura 27 se muestra el corte correspondiente al grupo C, el cual presentó un mayor desarreglo de las fibras de colágena.

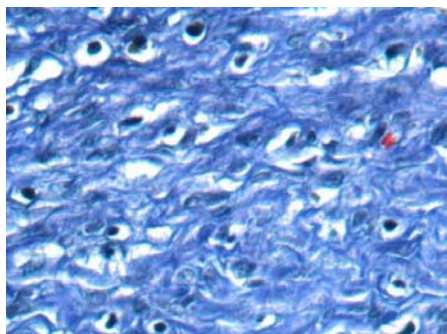


Figura 25. Microfotografía de piel de una rata del grupo A, al día 11 muestra mayor arreglo de fibras de colágena, con tinción tricrómica de Masson, (400x).

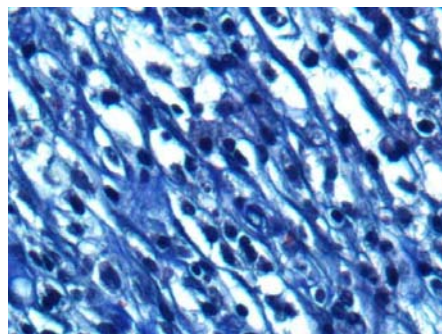


Figura 26. Microfotografía de piel de una rata del grupo B, al día 11 muestra moderado arreglo de las fibras de colágena, con tinción tricrómica de Masson, (400x).

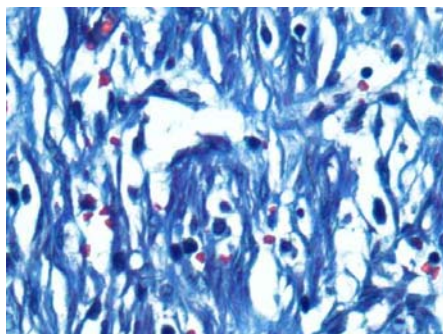


Figura 27. Microfotografía de piel de una rata del grupo C, al día 11 muestra mayor desarreglo de las fibras de colágena, con tinción tricrómica de Masson, (400x).

6.4 Evaluación por Inmunohistoquímica

De las muestras del grupo A procesadas durante todo el estudio, para VEGF (Cuadro 8) se detectó que: el 50% correspondió a una reacción altamente intensa, el 50% medianamente intensa y ninguna poco intensa (Figura 28).

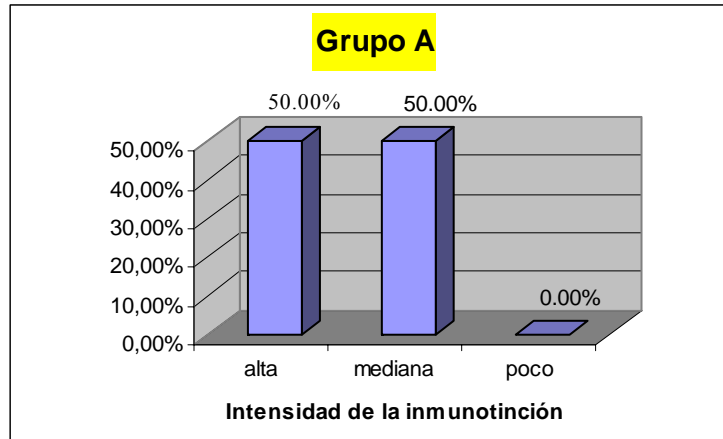


Figura 28. Intensidad de la expresión del Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

En las muestras del grupo B procesadas durante todo el estudio para VEGF (Cuadro 9), se estableció que el 33.33% fueron altamente intensas, el 61.11% medianamente intensas y 5.55% poco intensas (Figura 29).

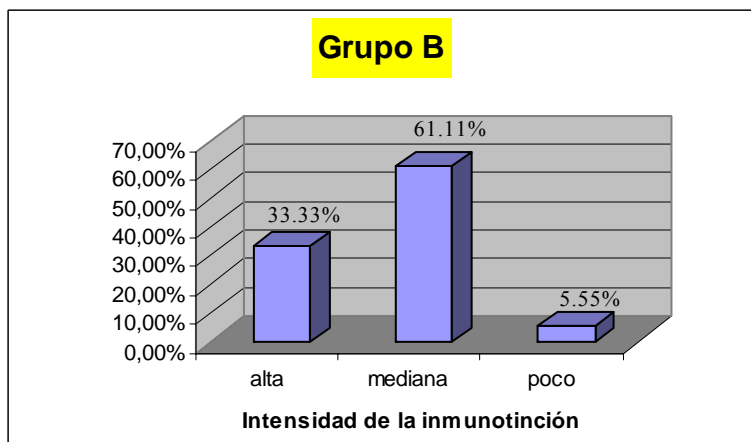


Figura 29. Intensidad de la expresión del Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

En las muestras del grupo C procesadas durante todo el estudio para VEGF (Cuadro 10) resultó: ninguna altamente intensa, el 27.77% medianamente intensa y el 72.22% poco intensa (Figura 30).

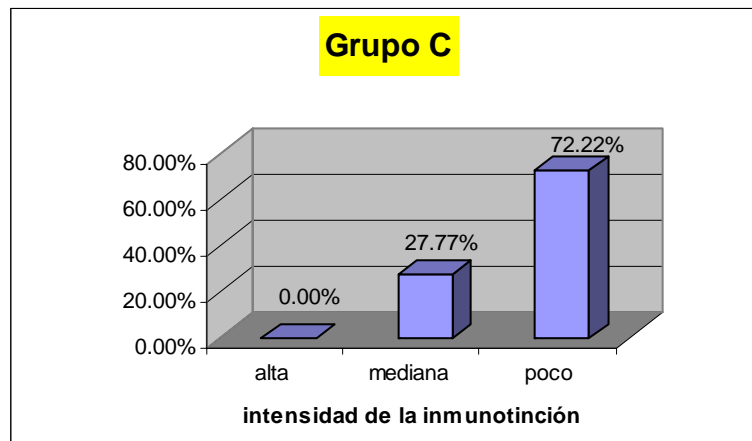


Figura 30. Intensidad de la expresión del Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

En el grupo A (Figura 31) existió una mayor intensidad de la expresión del VEGF, con respecto a los grupos B y C (Figuras 32 y 33 respectivamente), la Figura 34 muestra el control negativo. Estos resultados fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon, lo que representó una diferencia estadística ($p < 0.0001$).

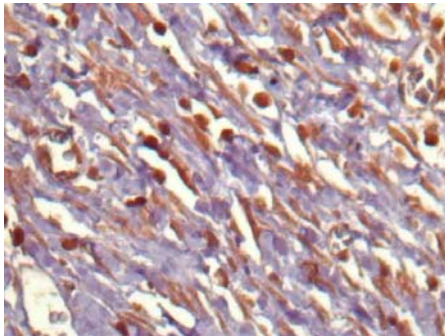


Figura 31. Microfotografía de piel de una rata del Grupo A (día 18). Reacción altamente intensa, IHQ, VEGF. EPOS + HRP / DAB. (400x)

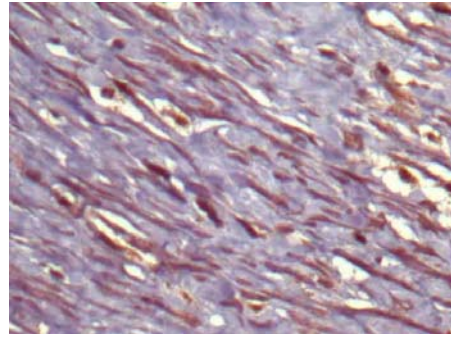


Figura 32. Microfotografía de piel de una rata del Grupo B (día 18). Reacción medianamente intensa, IHQ, VEGF. EPOS + HRP / DAB. (400x)

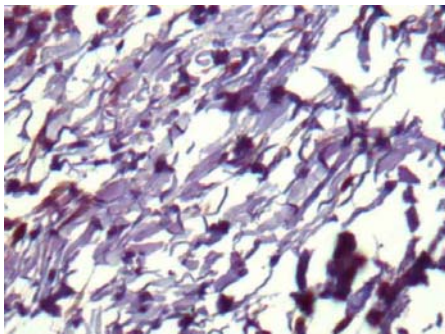


Figura 33. Microfotografía de piel de una rata del Grupo C (día 18). Reacción poco intensa, IHQ, VEGF. EPOS + HRP / DAB. (400x)

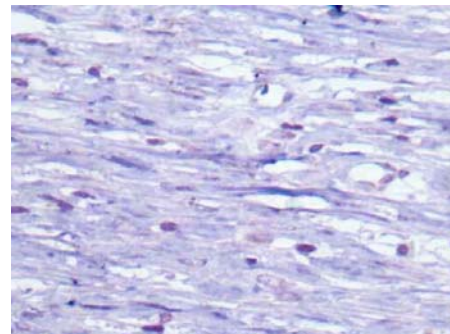


Figura 34. Microfotografía de piel de una rata del Grupo A (día 18). Control negativo, IHQ, VEGF. EPOS + HRP / DAB. (400x)

En las muestras del grupo A procesadas durante todo el estudio para TGF- β (Cuadro 9) se detectó que: ninguna fue altamente intensa, el 38.80% correspondió a una reacción medianamente intensa y el 61.11% a una reacción poco intensa (Figura 35).

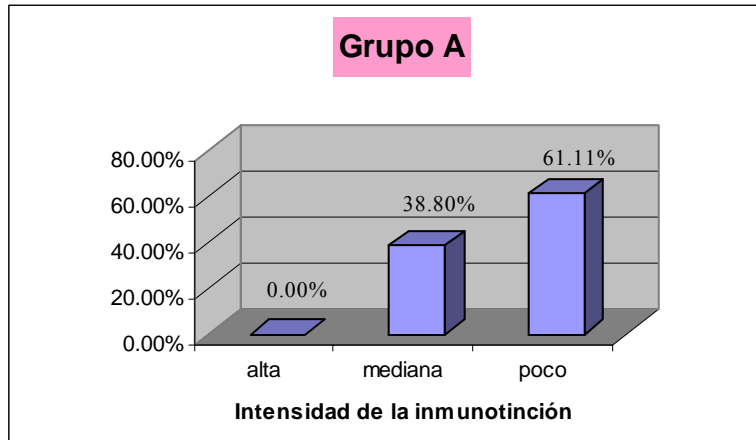


Figura 35. Intensidad de la expresión del Factor de crecimiento beta transformante (TGF- β) en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

Las muestras del grupo B procesadas durante todo el estudio para TGF- β (Cuadro 9), mostraron que: ninguna fue altamente intensa, el 44.44% medianamente intensa y el 55.55% poco intensa (Figura 36).

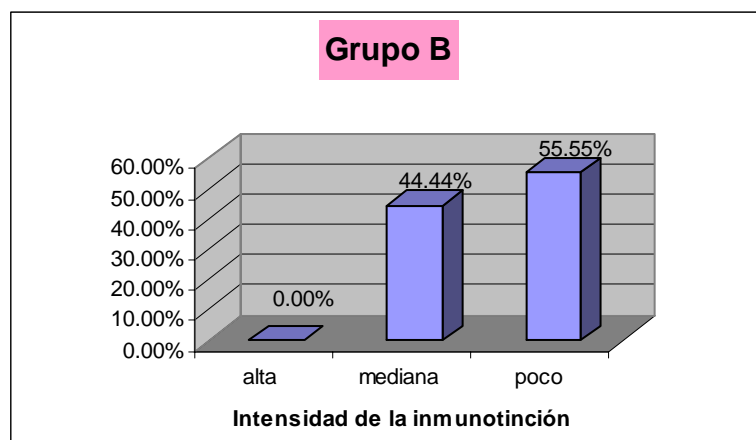


Figura 36. Intensidad de la expresión del Factor de crecimiento beta transformante (TGF- β) en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

En las muestras del grupo C procesadas para TGF- β (Cuadro 10) se detectó que el 44.44% correspondía a una reacción altamente intensa, el 44.44% medianamente intensa y el 11.11% poco intensa (Figura 37).

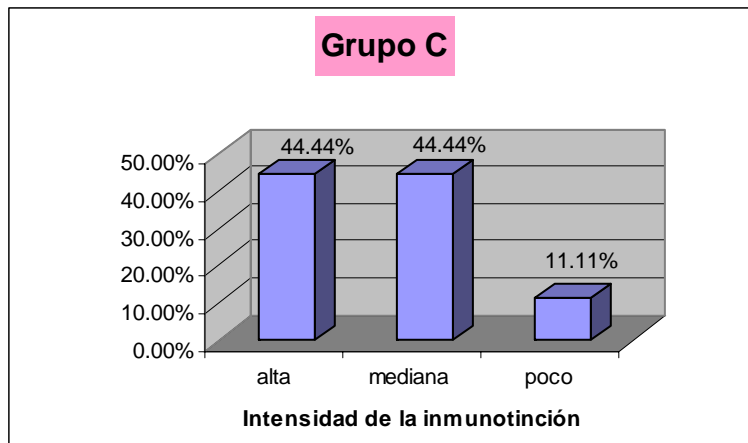


Figura 37. Intensidad de la expresión del Factor de crecimiento beta transformante (TGF- β) en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

En el grupo C (Figura 40) existió una mayor intensidad de la expresión del TGF- β , con respecto a los grupos A y B (Figuras 38 y 39 respectivamente), la Figura 41 muestra el control negativo. Estos resultados fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon, lo que representó una diferencia estadística ($p < 0.0003$).

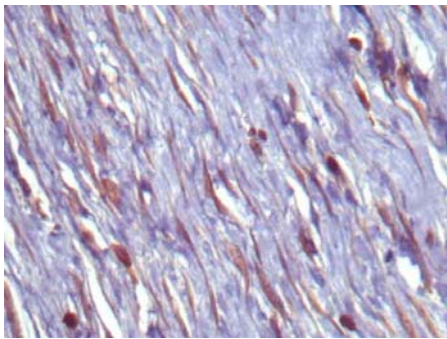


Figura 38. Microfotografía de piel de una rata del Grupo A (día 19). Reacción poco intensa, IHQ, TGF- β . EPOS + HRP / DAB. (400x)

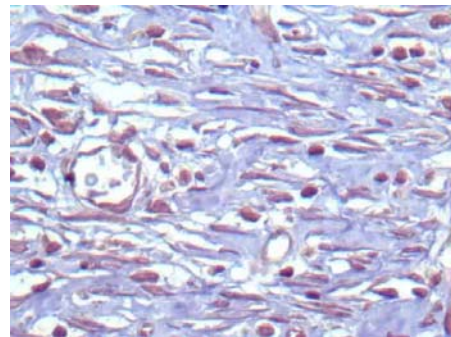


Figura 39. Microfotografía de piel de una rata del Grupo B (día 19). Reacción medianamente intensa, IHQ, TGF- β . EPOS + HRP / DAB. (400x)

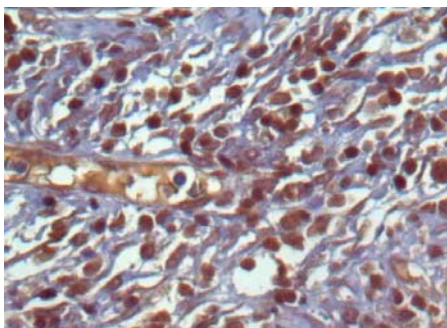


Figura 40. Microfotografía de piel de una rata del Grupo C (día 19). Reacción altamente intensa, IHQ, TGF- β . EPOS + HRP / DAB. (400x)

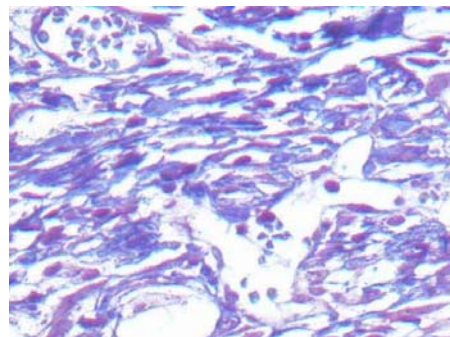


Figura 41. Microfotografía de piel de una rata del Grupo C (día 19). Control negativo, IHQ, TGF- β . EPOS + HRP / DAB. (400x)

De las muestras del grupo A procesadas durante todo el experimento, para AAML (Cuadro 8) se detectó que el 50% correspondió a una reacción altamente intensa, el 44.44% medianamente intensa y el 5.55% poco intensa (Figura 42).

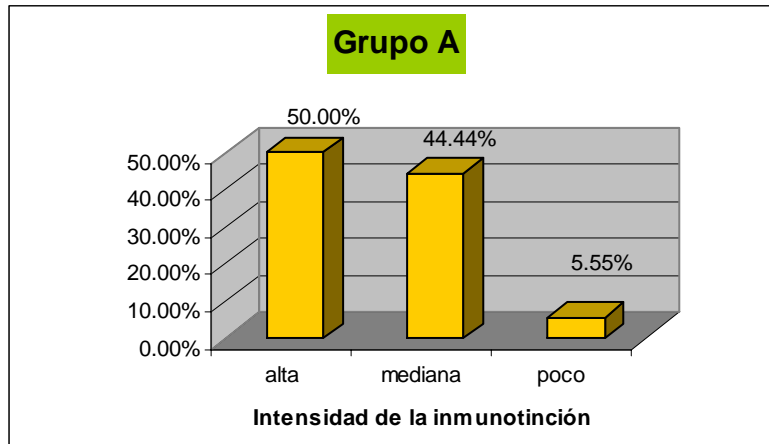


Figura 42. Intensidad de la expresión de AAML en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

En las muestras del grupo B procesadas durante todo el estudio para AAML (Cuadro 9), se estableció que el 33.33% resultaron altamente intensas, el 61.11% medianamente intensas y el 5.55% poco intensas (Figura 43).

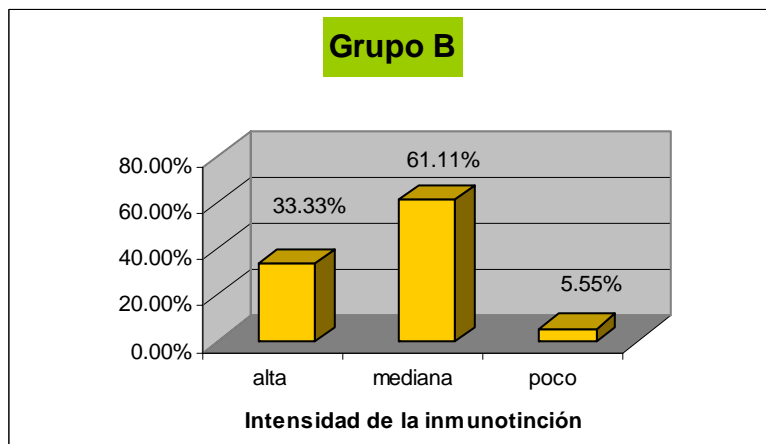


Figura 43. Intensidad de la expresión de AAML en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

En tanto que de las muestras del grupo C procesadas durante todo el estudio para AAML (Cuadro 10) resultó: ninguna altamente intensa, el 16.66% medianamente intensa y el 83.33% poco intensa (Figura 44).

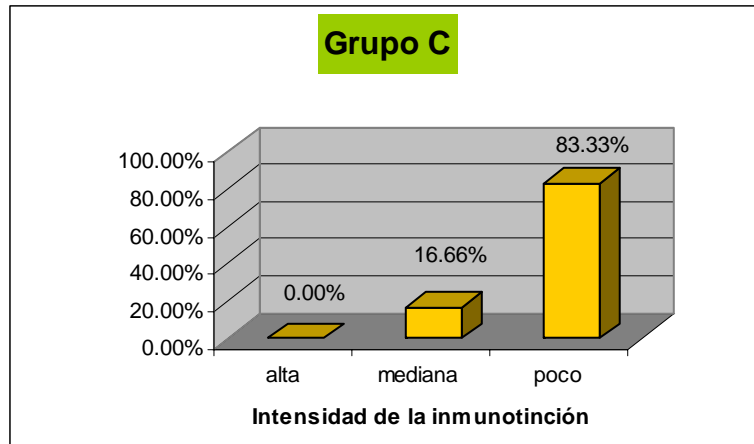


Figura 44. Intensidad de la expresión de AAML en heridas quirúrgicas en piel de ratas.

En el grupo A (Figura 45) existió una mayor intensidad de la expresión del AAML, con respecto a los grupos B y C (Figura 46 y 47 respectivamente), la Figura 48 muestra el control negativo. Estos resultados fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon, lo que representó una diferencia estadística ($p < 0.0001$).

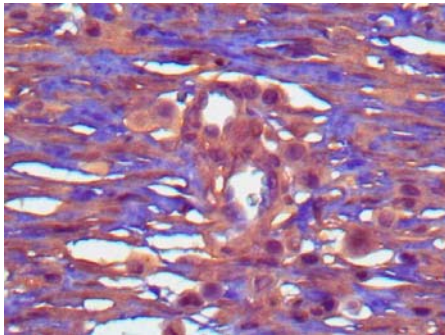


Figura 45. Microfotografía de piel de una rata del Grupo A (día 17). Reacción altamente intensa, IHQ, AAML. EPOS + HRP / DAB. (400x)

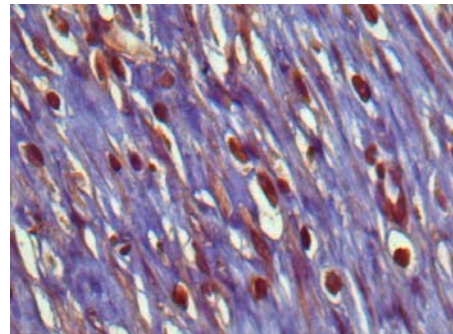


Figura 46. Microfotografía de piel de una rata del Grupo B (día 17). Reacción medianamente intensa, IHQ, AAML. EPOS + HRP / DAB. (400x)

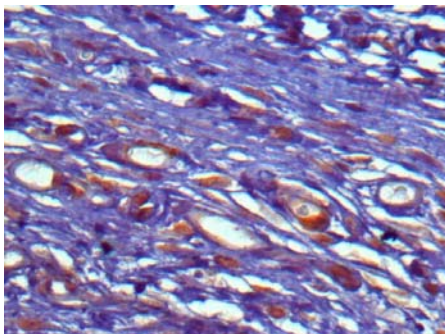


Figura 47. Microfotografía de piel de una rata del Grupo C (día 17). Reacción poco intensa. IHQ, AAML. EPOS + HRP / DAB. (400x)

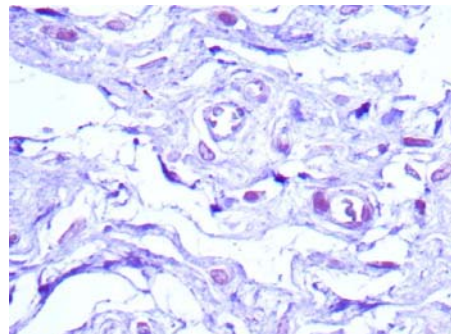


Figura 48. Microfotografía de piel de una rata del Grupo C (día 17). Control negativo. IHQ, AAML. EPOS + HRP / DAB. (400x)

6.5 Medición de fuerza de tensión de la herida

Para este análisis se colocaron las muestras en el tensómetro, se aplicó la fuerza de tensión para que la piel se distendiera, la presión a la cual las heridas cedieron se registró en un manómetro (Cuadro 11). Debido a que el número de observaciones fue limitado, no se realizó prueba estadística alguna, simplemente se realizaron gráficas. Como se puede observar, desde el primer día de registro, las heridas pertenecientes a los animales del Grupo "A" mostraron mayor resistencia a la fuerza de tensión (Figura 49).

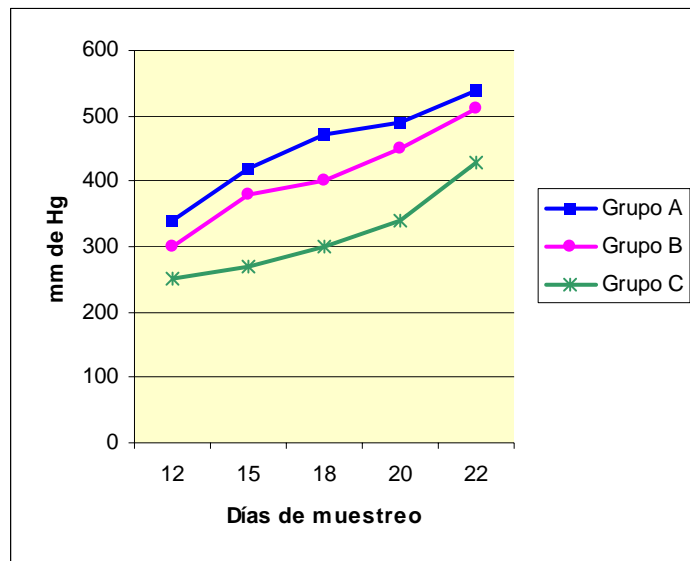


Figura 49. Resistencia a la tensión en piel de ratas.

DISCUSIÓN

En este trabajo se elaboró un liofilizado de epiplón de origen canino el cual fue utilizado en la terapéutica de cicatrización de heridas críticas en piel de ratas.

La resolución de la cicatrización se ve influenciada por la participación de células, tanto inflamatorias como del estroma, así como de la producción de citocinas, enzimas, factores promotores e inhibidores, entre otras.^{12, 25} Las proporciones y el espacio-temporalidad de cada uno de los componentes mencionados, dirigen la intensidad en la resolución del daño; sin embargo, cuando el infiltrado inflamatorio no desaparece en el periodo normal de cicatrización, se generan estímulos que conllevan al establecimiento de un proceso cicatrizal retardado y fibroso.¹⁶

En el presente estudio se observó que las muestras pertenecientes a los animales del grupo "A" los cuales fueron tratados con el epiplón liofilizado, presentaron menor número de macrófagos y neutrófilos representando una inflamación de menor intensidad, con respecto a los grupos "B" y "C". Posiblemente los macrófagos y neutrófilos estaban disminuidos debido a la ausencia de un proceso infeccioso, ya que el epiplón liofilizado actuó como una barrera física, impidiendo la deposición de otros materiales extraños como la viruta de madera (material de cama utilizado para los roedores); pues la permanencia de estos tipos celulares depende del daño al tejido y de la presencia de infección como lo señalaron Janeway *et al.*¹⁶ en 1993.

Se sugiere que el epiplón liofilizado se comportó como una biomembrana, actuando como una barrera física, reduciendo la contaminación, colaborando para la disminución de elementos inflamatorios como los macrófagos, tipo celular más abundante del proceso de cicatrización. Disminuyendo con ello la expresión de TGF- β , ($p < 0.0003$); sin embargo, aunque los macrófagos se encontraron disminuidos, estos fueron suficientes para llevar a cabo una degradación adecuada del tejido local. Esta disminución de los elementos inflamatorios pudo deberse a que el epiplón liofilizado quizá actuó como un biosoporte activo alrededor de las células, como una matriz extracelular temporal. Se considera la existencia de dos tipos de matriz extracelular una "Provisional", la cual es sintetizada por el organismo en un proceso de reparación de tejidos y otra "Temporal" aquella de origen no propio, es decir, que no fue sintetizada por el organismo y fue aplicada como un

procedimiento terapéutico, como lo indica Krötzsch en 1999.²⁵ A través de esta matriz extracelular temporal, la migración de células inflamatorias e indiferenciadas se facilita tal y como lo han reportado Donati *et al.*⁴⁰ en el 2004, con esto, se cuenta con una estructura a la cual se adhieren éstas células antes de que comience a formarse la matriz provisional. Esto disminuye el tiempo de cicatrización ya que al estar presente esta “matriz temporal” el proceso cicatrizal ya no tendría que rellenar espacios, sino tendría que resolver la herida en un espacio más reducido, con menor número de células y proteínas. Todo esto facilitó la reestructuración de las fibras de la matriz extracelular generando un aspecto similar al de la piel normal en las ratas tratadas con el epiplón liofilizado, lo cual concuerda con lo descrito por Greiling *et al.*¹⁵ en 1997. El epiplón liofilizado puede dirigir puntos clave de la cicatrización, a través de interacciones dinámicas en cuanto a la señalización celular; ya que puede comportarse como quimiotáctico para la migración de neutrófilos, monocitos, fibroblastos y células endoteliales como se ha observado con otras biomembranas.^{40, 41, 44}

En el grupo “A” entre los días 1 y 12 se observó un número mayor de fibroblastos, aunque después del día 12 el número de fibroblastos disminuyó en este grupo con respecto a los grupos “B” y “C”. Quizá esto se debió a que la deposición de colágena en la herida fue suficiente, por lo cual los fibroblastos cesan su producción a pesar de la existencia de una alta expresión de TGF- β tal y como lo refieren Granstein *et al.*²⁷, en 1997.

En las biopsias procesadas mediante la técnica de IHQ para TGF- β , se observó en las muestras del grupo “C” tuvieron una mayor intensidad de la expresión de este factor, comparadas con los grupos “A” y “B”, con una diferencia estadística significativa ($p < 0.0003$). La mayor intensidad de la inmunotinción contra TGF- β , en las muestras del grupo C, se puede explicar por el incremento en el número de macrófagos observados en la histopatología. Sin embargo, Gospodawicz *et al.*³⁸ en 1997 señalan que la expresión de Interferón gama (INF- γ) disminuye la síntesis de proteínas de matriz extracelular en los fibroblastos, lo cual puede explicar el porqué los animales del grupo A, después del día 12, presentaron un menor número de fibroblastos; asimismo estos autores señalan que también la matriz de colágena inhibe la síntesis de estas células³⁸.

Hatz *et al.*²² en 1994, señalan que el tiempo para la deposición de colágena y la organización de estas fibras es muy importante durante el proceso de reparación para

promover la integridad tisular en el sitio de daño; en este estudio, se observó en la histopatología, que en el grupo "A", la arquitectura de la zona de la lesión fue mucho más parecida a la piel sin daño, debido a que el orden reticular de las fibras de colágena era homogéneo, estaban alineadas horizontalmente con respecto al plano del borde de la lesión y perpendiculares a los vasos sanguíneos; lo cual fue evidente a partir del día once, comparada con las heridas de los otros dos grupos, en los que las fibras de colágena se organizaron del mismo modo a partir del día diecinueve. Además, las fibras de colágena del grupo "A" se apreciaron más delgadas con respecto a las del grupo "C"; esto puede deberse a que hubo un mayor número de fibroblastos del día 1 al 12 en las muestras del grupo "A" y éstos sintetizan proteínas como: fibronectina, colágena tipo I y tipo III como lo refieren en 1997 Granstein *et al.*²⁷; quizá la síntesis y deposición de la colágena fue más rápida a través de este mecanismo, al igual que el periodo de organización de las fibras, lo que conlleva a una remodelación más intensa de la zona dañada, reflejándose en un periodo más corto de cicatrización. La cicatriz fue menos evidente, posiblemente por el tipo de colágena depositada en la herida, probablemente los fibroblastos sintetizaron mayor proporción de colágena tipo III, cuyo diámetro de fibra es menor a la colágena tipo I, como lo sugieren Varga J. *et al.*³⁵ en el 2002; generando una cicatriz mas aparente en los grupos "B" y "C" con respecto a la del Grupo A. Las pruebas de tensión mostraron que la resistencia de las heridas en el grupo "A", fue mayor con respecto a las heridas de los grupos "B" y "C". Esto muestra diferencia entre los tratamientos y sugiere que la orientación de las fibras de colágena de la matriz extracelular tiene relación con la resistencia de la herida y posiblemente al tipo de colágena depositado en la herida, así los fibroblastos pudieron ser estimulados para sintetizar mayor proporción de colágena tipo III, que colágena tipo I,³⁵ como se describe en los hallazgos de este estudio.

En cuanto a la angiogénesis, se pudieron apreciar en las muestras del grupo "A" abundantes vasos sanguíneos a partir del día 10 de cicatrización, mientras que en los grupos "B" y "C" esto sucedió en el día 11 y en el día 19, respectivamente; aunque sin diferencia estadística significativa entre los tres grupos ($p < 0.02$). Además, las evaluaciones realizadas por medio de la inmunohistoquímica, mostraron que VEGF se expresó con mayor intensidad en el grupo "A" con respecto al grupo "B" y "C"; con una diferencia estadística significativa entre los tres grupos ($p < 0.0001$). Con base en lo anterior y al considerar los resultados obtenidos, se propone que el epiplón liofilizado actúa como matriz extracelular temporal, ya que VEGF tiene capacidad de ser tanto

quimioatrayente como mitogénico para las células endoteliales y participa fuertemente en el depósito de matriz extracelular.²³ De este modo las plaquetas pudieron ser estimuladas por el epiplón liofilizado para producir más VEGF de lo habitual y con ello generar una adecuada y rápida formación de vasos sanguíneos, necesarios para que exista una adecuada matriz extracelular. Asimismo, se requiere de la participación de citocinas para la migración y proliferación de las células endoteliales, factores tales como: VEGF, FGF, TGF- β , entre otros, como ya lo habían indicado Vlodavsky *et al.*²⁸ Además, las plaquetas son la principal fuente de mediadores como VEGF, aunque también los macrófagos y fibroblastos sintetizan este factor de crecimiento celular.^{13, 14}

En el día 22 de cicatrización, cuando existió una cicatriz evidente, en las muestras del grupo "A", la arquitectura de la dermis era mucho mas parecida a la piel normal, al observarse más folículos pilosos y una cicatriz menos evidente, comparada con los otros grupos. La arquitectura de la dermis fue parecida a la normal, quizá por que la colágena se organizó más rápido, debido a que existió un mayor aporte vascular; de este modo se puede justificar la presencia de mayor número de folículos pilosos incluso en el sitio de cicatriz. Este mayor aporte vascular ya había sido descrito en 1994 por Sandoval⁵²; sin embargo, no menciona el mecanismo que pueda explicar la mayor presencia de folículos pilosos, aunque Cohen⁹ en 1994, señala que la presencia abundante de anexos cutáneos después de una lesión, se logra cuando el aporte vascular para estas estructuras es adecuado. Por otra parte Madri *et al.*²³ en 1996, mencionan que para que exista un adecuado aporte vascular, se requiere de la formación de vasos sanguíneos, el cual es un proceso dependiente de la expresión de VEGF. A través del presente estudio se detectó

que la mayor presencia de VEGF estuvo asociado a una mayor presencia de anexos cutáneos como folículos pilosos.

Existe la necesidad de estímulos sistémicos para incrementar o disminuir el tiempo y la calidad de la cicatrización.²² Los resultados obtenidos en este estudio demostraron el incremento en la expresión de VEGF, la disminución de la inflamación y una rápida y eficiente organización de las fibras de colágena.

Con este estudio se pueden sugerir ventajas al emplear el epiplón liofilizado con respecto a otros apósitos biológicos, ya que contiene dentro de su estructura colágena tipo I, III, V, VII y XIV, de las cuales, las dos primeras proteínas tienen un efecto en la promoción de la cicatrización. Se ha demostrado que las biomembranas a base de colágena son capaces de integrarse a la matriz extracelular debido a su tamaño y su pureza; sin embargo, este liofilizado contribuyó a disminuir el tiempo de cicatrización debido a su naturaleza; aunque es necesario conocer de manera más precisa tanto su estructura bioquímica como las proporciones en su conformación.

Además de tener propiedades como: 1) adhesión natural a través de la humedad de la herida, 2) actúa como apósito sin obstruir la lesión ya que tiene permeabilidad selectiva, 3) de fácil e inmediata disponibilidad, 4) se conserva a temperatura ambiente siempre que se mantenga la integridad de su empaque, 5) no requiere recambios o reposición siempre y cuando se proteja esta biomembrana, 6) es transparente lo que permite visualizar la evolución del proceso de cicatrización; por lo tanto es un candidato para el tratamiento de heridas extensas con la pérdida de una gran porción epitelial.

Prospectiva

Para complementar este trabajo se considera necesario realizar estudios posteriores en dos sentidos: 1) Caracterizar de manera más precisa la estructura bioquímica del epiplón liofilizado empleado, y 2) Identificar otros mecanismos de inducción de cicatrización por

parte del epiplón liofilizado, utilizando marcadores de proteínas clave para la cicatrización, como fibronectina, colágena tipo I y colágena tipo III; la evaluación de la expresión de otros factores de crecimiento celular tales como: FGF y DPGF, que también participan de manera muy activa en la cicatrización; los receptores para los diferentes factores de crecimiento celular, para que actúen los factores de crecimiento; los tipos de integrinas de unión a la colágena, con el fin de identificar si existe interacción del epiplón liofilizado con la célula, por medio de la unión a receptores a la matriz.

CUADROS

Cuadro 1	
EFFECTOS DE LAS PLAQUETAS EN LA CICATRIZACIÓN	
Actividad	Efecto
Adhesión	Obstruyen pequeñas aberturas en vasos sanguíneos
Agregación	Obstruyen grandes aberturas en vasos sanguíneos. Inducen la coagulación
Secreción	De vasoconstrictores y agregación plaquetaria
Mediadores	Secreción de factores de crecimiento celular

Cuadro 2		
PRINCIPALES CITOCINAS QUE PARTICIPAN EN LA CICATRIZACIÓN		
Citocinas	Fuente	Función
VEGF	Plaquetas, células endoteliales, macrófagos y músculo liso	Angiogénesis, proliferación de fibroblastos, quimiotaxis metabolismo de colágena, quimiotaxis, activación de neutrófilos y macrófagos
TGF- β	Macrófagos, plaquetas, neutrófilos y otras células	Inhibe la replicación de la mayoría de las células <i>in vitro</i> , puede inhibir o estimular fibroblastos
EGF	Cerebro, pituitaria, macrófagos y otras células	Mitogénico de tejido neural y mesenquimático, estimula el depósito de matriz, contracción de la herida angiogénesis
TGF- α	Macrófagos, plaquetas, queratinocitos y otros tejidos	Mitogénico para tejidos epiteliales, células endoteliales y fibroblastos
EGF	En la mayoría de fluidos del cuerpo y plaquetas	Inhibe o estimula fibroblastos

Cuadro 3

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BIOMEMBRANAS EXISTENTES

<i>Características</i> <i>Producto</i>	<i>Heteroinjerto porcino fresco congelado</i>	<i>Heteroinjerto porcino liofilizado</i>	<i>Membrana amniótica humana</i>	<i>Piel de cadáver</i>	<i>Gasa furacinada</i>	<i>Biofill^{MR}</i>	<i>Duoderm^{MR}</i>	<i>Comfeel^{MR}</i>	<i>Tegaderm^{MR}</i>	<i>Laserskin^{MR}</i>	<i>Alloderm^{MR}</i>
Apósito biológico	*	*	*	*							
Apósito sintético					*	*	*	*	*		
Apósito mixto										*	*
Adherencia con la humedad de la herida	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Transparencia	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Permeabilidad	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Obstrucción de la herida	+++	+++	+	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Riesgo de transmisión viral	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
Tiempo de almacenamiento	+	+++	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Cicatrizante	+	++	++	++	+	++	-	-	-	++	++
Costo	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Adaptado de varias Fuentes ^{40, 41, 42, 43, 44}

- * Tipo de apósito
- Nula
- + Bajo
- ++ Moderado

+++ Elevado

Cuadro 4

RELACIÓN DE ELEMENTOS INFLAMATORIOS EN PIEL DE RATAS CON HERIDAS QUIRÚRGICAS TRATADAS CON LIOFILIZADO GRUPO A (TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA)

<i>Fase</i>	<i>No animal</i>	<i>MQ</i>	<i>NT</i>	<i>FB</i>	<i>HR</i>	<i>ED</i>	<i>VS</i>	<i>OC</i>	<i>RG</i>
Inflamación Día 1 al 6	1	4	4	1	4	4	1	1	1
	2	4	3	1	3	3	1	1	1
	3	3	3	2	3	3	2	2	2
	4	3	3	2	3	2	3	2	1
	5	2	2	3	2	2	3	2	2
	6	3	3	3	3	2	2	3	2
Formación de tejido de granulación Día 7 al 14	7	3	2	3	2	2	3	3	2
	8	2	2	3	2	1	3	3	2
	9	2	2	3	2	1	3	3	1
	10	3	1	4	2	1	4	3	1
	11	2	2	4	2	1	4	4	1
	12	2	1	3	2	1	4	4	1
	13	2	1	4	2	1	4	4	1
14	2	1	3	2	1	4	4	1	
Remodelación Día 15 al 21	15	2	1	3	2	1	4	4	1
	16	2	1	3	2	1	4	4	1
	17	2	1	3	1	1	4	4	1
	18	2	1	3	1	1	4	4	1
	19	1	1	3	1	1	4	4	1
	20	2	1	3	1	1	4	4	1
	21	1	1	3	1	1	4	4	1
	22	1	1	3	1	1	1	4	1

Macrófagos por campo 1000x (MQ)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-2	3	4-5
Neutrófilos por campo 400x (NT)			
ausente = 1	escaso = 2	Moderado = 3	abundante = 4
0	1-10	11-16	17-25
Fibroblastos por campo 400x (FB)			
ausente = 1	escaso = 2	Moderado = 3	abundante = 4
0	1-5	6-10	10-20
Hemorragia por campo 400x (HR)			
ausente = 1	Escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	2 campos	3 campos	4 campos

Edema por campo 400x (ED)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1 campo	2 campos	3 campos
Vasos sanguíneos de neoformación por campo 400x (VS)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-7	8-14	14-20
Organización de la colágena por campo 400x (OC)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-7	8-14	14-20
Reacción granulomatosa por campo 400x (RG)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1	2	3

Cuadro 5

RELACIÓN DE ELEMENTOS INFLAMATORIOS EN PIEL DE RATAS CON HERIDAS QUIRÚRGICAS TRATADAS CON RECOVERÓN^{MR} GRUPO B (TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA)

<i>Fase</i>	<i>No animal</i>	<i>MQ</i>	<i>NT</i>	<i>FB</i>	<i>HR</i>	<i>ED</i>	<i>VS</i>	<i>OC</i>	<i>RG</i>
Inflamación Día 1 al 6	23	4	4	1	4	4	1	1	2
	24	4	4	1	4	4	1	1	2
	25	4	3	1	3	3	2	2	2
	26	3	3	2	3	3	2	2	1
	27	4	3	2	3	2	2	2	2
	28	4	3	2	3	2	3	2	2
Formación de tejido de granulación Día 7 al 14	29	3	2	2	2	2	2	3	1
	30	3	2	3	2	2	3	2	2
	31	2	2	3	2	2	3	3	2
	32	3	2	3	2	2	3	3	2
	33	3	1	3	2	1	4	3	1
	34	3	1	4	2	1	4	3	1
	35	2	1	4	2	1	4	3	1
36	3	1	3	1	1	4	3	1	
Remodelación Día 15 al 21	37	2	1	4	1	1	4	3	1
	38	3	1	4	1	1	4	3	1
	39	2	1	4	1	1	4	3	1
	40	2	1	3	1	1	4	3	1
	41	1	1	3	1	1	4	4	1
	42	1	1	3	1	1	4	4	1
	43	2	1	3	1	1	4	4	1
	44	1	1	3	1	1	4	4	1

Macrófagos por campo 1000x (MQ)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-2	3	4-5
Neutrófilos por campo 400x (NT)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-10	11-16	17-25
Fibroblastos por campo 400x (FB)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-5	6-10	10-20
Hemorragia por campo 400x (HR)			
ausente = 1	Escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	2 campos	3 campos	4 campos

Edema por campo 400x (ED)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1 campo	2 campos	3 campos
Vasos sanguíneos de neoformación por campo 400x (VS)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-7	8-14	14-20
Organización de la colágena por campo 400x (OC)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-7	8-14	14-20
Reacción granulomatosa por campo 400x (RG)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1	2	3

Cuadro 6

**RELACIÓN DE ELEMENTOS INFLAMATORIOS EN PIEL DE RATAS CON HERIDAS QUIRÚRGICAS SIN TRATAMIENTO GRUPO C
(TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA)**

<i>Fase</i>	<i>No animal</i>	<i>MQ</i>	<i>NT</i>	<i>FB</i>	<i>HR</i>	<i>ED</i>	<i>VS</i>	<i>OC</i>	<i>RG</i>
Inflamación Día 1 al 6	45	4	4	1	4	4	1	1	3
	46	4	4	1	4	4	1	1	3
	47	4	4	1	4	4	1	1	2
	48	4	4	1	4	3	1	1	2
	49	4	4	2	4	3	2	1	3
	50	3	4	2	3	3	2	2	3
Formación de tejido de granulación Día 7 al 14	51	4	3	2	3	2	2	2	2
	52	3	3	2	3	2	2	2	2
	53	4	3	2	3	1	2	2	2
	54	3	2	3	3	2	3	2	1
	55	3	2	3	2	2	2	3	2
	56	2	2	3	2	1	3	3	2
	57	3	2	4	2	1	2	2	2
	58	3	1	4	2	1	3	3	2
Remodelación Día 15 al 21	59	3	1	4	2	1	3	3	1
	60	2	1	4	2	1	3	3	2
	61	3	1	4	2	1	3	3	2
	62	2	1	4	2	1	3	3	2
	63	2	1	4	1	1	4	4	2
	64	2	1	4	1	1	4	4	1
	65	1	1	4	1	1	4	4	1
	66	2	1	4	1	1	4	4	1

Macrófagos por campo 1000x (MQ)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-2	3	4-5
Neutrófilos por campo 400x (NT)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-10	11-16	17-25
Fibroblastos por campo 400x (FB)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-5	6-10	10-20
Hemorragia por campo 400x (HR)			
ausente = 1	Escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	2 campos	3 campos	4 campos
Edema por campo 400x (ED)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1 campo	2 campos	3 campos
Vasos sanguíneos de neoformación por campo 400x (VS)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-7	8-14	14-20

Organización de la colágena por campo 400x (OC)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1-7	8-14	14-20
Reacción granulomatosa por campo 400x (RG)			
ausente = 1	escaso = 2	moderado = 3	abundante = 4
0	1	2	3

Cuadro 7

ORGANIZACIÓN DE LA COLÁGENA EN PIEL DE RATAS CON HERIDAS QUIRÚRGICAS
GRUPO A, GRUPO B Y GRUPO C
(TRICRÓMICA DE MASSON)

<i>No animal</i>	<i>Día</i>	<i>Grupo</i>	<i>OC</i>	<i>No animal</i>	<i>Día</i>	<i>Grupo</i>	<i>OC</i>	<i>No animal</i>	<i>Día</i>	<i>Grupo</i>	<i>OC</i>
1	1	A	1	23	1	B	1	45	1	C	1
2	2	A	1	24	2	B	1	46	2	C	1
3	3	A	2	25	3	B	2	47	3	C	1
4	4	A	2	26	4	B	2	48	4	C	1
5	5	A	2	27	5	B	2	49	5	C	1
6	6	A	2	28	6	B	2	50	6	C	2
7	7	A	3	29	7	B	3	51	7	C	2
8	8	A	3	30	8	B	2	52	8	C	2
9	9	A	3	31	9	B	3	53	9	C	2
10	10	A	3	32	10	B	3	54	10	C	2
11	11	A	4	33	11	B	3	55	11	C	3
12	12	A	4	34	12	B	3	56	12	C	3
13	13	A	4	35	13	B	3	57	13	C	2
14	14	A	4	36	14	B	3	58	14	C	3
15	15	A	4	37	15	B	3	59	15	C	3
16	16	A	4	38	16	B	3	60	16	C	3
17	17	A	4	39	17	B	3	61	17	C	3
18	18	A	4	40	18	B	3	62	18	C	3
19	19	A	4	41	19	B	4	63	19	C	4
20	20	A	4	42	20	B	4	64	20	C	4
21	21	A	4	43	21	B	4	65	21	C	4
22	22	A	4	44	22	B	4	66	22	C	4

OC.- Organización de la colágena.

- 1.- Cuando la colágena estaba ausente.
- 2.- Cuando la disposición de las fibras de colágena no tenían dirección definida.
- 3.- Cuando las fibras de colágena tienden a alinearse como aspecto espina de pescado con tendencia a ser horizontales al plano del borde de la lesión.
- 4.- Cuando las fibras de colágena se alinean horizontalmente al plano del borde de la lesión y perpendiculares a los vasos sanguíneos.

Cuadro 8

RELACIÓN DE EXPRESIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO
 CELULAR EN PIEL DE RATAS CON HERIDAS QUIRÚRGICAS
 TRATADAS CON LIOFILIZADO GRUPO A
 (INMUNOHISTOQUÍMICA)

<i>Fase</i>	<i>No animal</i>	<i>VEGF</i>	<i>TGF-β</i>	<i>AAML</i>
Inflamación Día 1 al 6	1	3	2	3
	2	3	2	3
	3	3	2	3
	4	3	2	3
	5	3	2	3
	6	3	2	2
Formación de tejido de granulación Día 7 al 14	7	3	2	3
	8	3	2	3
	9	4	3	4
	11	4	2	4
	12	4	3	4
	14	3	2	3
Remodelación Día 15 al 21	16	4	2	4
	17	4	3	4
	18	4	3	4
	19	4	3	4
	21	4	3	4
	22	4	3	4

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso
Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso
Anti-actina músculo liso (AAML)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso

Cuadro 9

RELACIÓN DE EXPRESIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO
 CELULAR EN PIEL DE RATAS CON HERIDAS QUIRÚRGICAS
 TRATADAS CON LIOFILIZADO GRUPO B
 (INMUNOHISTOQUÍMICA)

<i>Fase</i>	<i>No animal</i>	<i>VEGF</i>	<i>TGF-β</i>	<i>AAML</i>
Inflamación Día 1 al 6	23	3	2	3
	24	3	2	3
	25	3	2	3
	26	3	2	3
	27	3	2	3
	28	3	2	3
Formación de tejido de granulación Día 7 al 14	29	3	2	4
	30	3	3	4
	31	3	2	4
	33	3	2	4
	34	4	3	4
	36	4	3	4
Remodelación Día 15 al 21	38	4	2	4
	39	4	3	4
	40	4	3	4
	41	4	3	4
	43	3	3	4
	44	2	3	3

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso
Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso
Anti-actina músculo liso (AAML)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso

Cuadro 10

RELACIÓN DE EXPRESIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO
 CELULAR EN PIEL DE RATAS CON HERIDAS QUIRÚRGICAS
 TRATADAS CON LIOFILIZADO GRUPO C
 (INMUNOHISTOQUÍMICA)

<i>Fase</i>	<i>No animal</i>	<i>VEGF</i>	<i>TGF-β</i>	<i>AAML</i>
Inflamación Día 1 al 6	45	2	2	2
	46	2	3	2
	47	2	3	2
	48	2	3	2
	49	2	3	2
	50	2	3	2
Formación de tejido de granulación Día 7 al 14	51	2	3	2
	52	2	3	2
	53	2	3	2
	55	2	4	2
	56	3	4	2
	58	2	3	2
Remodelación Día 15 al 21	59	2	4	3
	61	2	4	3
	62	2	4	3
	63	2	4	3
	65	2	4	3
	66	2	4	3

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso
Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso
Anti-actina músculo liso (AAML)			
1	2	3	4
Negativo	Poco intenso	Moderadamente intenso	Altamente intenso

Cuadro 11

RESISTENCIA DE LAS HERIDAS EN PIEL DE RATAS CON
HERIDAS QUIRÚRGICAS
GRUPO "A", GRUPO "B" Y GRUPO "C"

<i>Días de cicatrización</i>	<i>Grupo</i>	<i>mm Hg</i>
12	A	340
15	A	420
18	A	470
20	A	490
22	A	540
12	B	300
15	B	380
18	B	400
20	B	450
22	B	510
12	C	250
15	C	270
18	C	300
20	C	340
22	C	430

9. ANEXO

Protocolo de Inmunohistoquímica para detectar los marcadores utilizados en este estudio VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular), TGF- β (Factor de crecimiento transformante - β) y AAML (Anti-actina músculo liso)

1. Remover la parafina de las laminillas, introduciéndolas en una estufa durante 30 minutos a 60 °C.
2. Eliminar esta parafina sumergiendo las laminillas en xilol, durante 5 minutos.
3. Sumergir las laminillas en cada una de las soluciones de acuerdo al siguiente tren de hidratación: Xilol 5 min, Xilol 30 seg, ETOH Abs. Anhidro 30 seg, ETOH Abs. Anhidro 30 seg, ETOH 96% 30 seg, ETOH 96% 30 seg, ETOH 80% 30 seg, ETOH 70% 30 seg, ETOH 60% 30 seg, ETOH 50% 30 seg, Agua destilada 30 seg, Agua destilada 5 min.
4. Colocar las laminillas en un vaso de Coplin y agregar solución de desenmascaramiento Target 1X pH bajo
5. Colocar el vaso de Coplin con las laminillas dentro de la olla de presión, programar e iniciar el calentamiento de la olla de presión por 5 minutos y detener el calentamiento cuando la válvula de seguridad este levantada.
6. Retirar el vaso de Coplin de la olla de presión, colocar en un baño de agua fría a temperatura ambiente (TA) y esperar hasta que la solución (Target) este fría.
7. Una vez fría la solución, se realizan dos lavados (cambio) con agua destilada a las laminillas.
8. Colocar las laminillas sobre coverplates (sistema de capilaridad).
9. Llenar los contenedores de los coverplates con agua destilada e incubar por 4 min.
10. Agregar 3 gotas (80-100 μ l aprox.) de Peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 0.9% e incubar por 5 min.
11. Inmediatamente agregar solución de lavado (PBST 1X) al contenedor del coverplate e incubar por 4 min.
12. Agregar 100 μ l de solución de anticuerpo primario (TNF- β , VEGF y AAML) e incubar por 30 min a TA. Los anticuerpos se utilizan a una dilución 1/75, 1/50 y 1/50 respectivamente.
13. Agregar solución de lavado (PBST 1X) al contenedor del coverplate e incubar por 4 min.
14. Agregar 80 μ l de solución de polímero / Ab / HRP (anti conejo) e incubar por 30 min.

15. Agregar solución de lavado (PBST 1X) al contenedor del coverplate e incubar por 4 min.
16. El revelado se realiza con 3,3 deaminobencidina (DAB) / Sistema por capilaridad.*
Agregando 100 µl de la solución de DAB a cada laminilla
17. Colocar la laminilla sobre la platina del microscopio, e Incubar la laminilla con DAB un tiempo mínimo de 30 seg. a 60 seg. como máximo y retirar la laminilla del microscopio cuando la reacción calorimétrica es la adecuada al control positivo.
18. La reacción se detiene enjuagando las laminillas con agua destilada.
19. Finalmente se realiza la contra-tinción con hematoxilina, las laminillas se enjuagan con alcohol del 96 y se dejan secar a TA para después montarlas con resina sintética** y el cubreobjetos correspondiente.

* Dako

** Entellan

LISTA DE ABREVIATURAS

AAML:	Anti-actina músculo liso
DAB:	3,3 diaminobenzidina
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular [endotelio vascular growth factor]
ETOH:	Alcohol etílico
ETOH Abs:	Alcohol etílico absoluto
EGF:	Factor de crecimiento epitelial [epidermal growth factor]
FGF:	Factor de crecimiento fibroblástico [fibroblast growth factor]
FGFa:	Factor de crecimiento fibroblástico a [fibroblast growth factor]
FGFb:	Factor de crecimiento fibroblástico b [fibroblast growth factor]
IGF:	Factor de crecimiento similar a la insulina [insulin-like growth factor]
IGF-1:	Factor de crecimiento similar a la insulina 1 [insulin-like growth factor]
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HE:	Hematoxilina eosina
Hopro:	Hidroxiprolina
HRGC:	Cromatografía de gases de alta resolución
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-1:	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-8	Interleucina-8
INF- γ :	Interferón γ
LSAB+/DAB:	Marcador de estreptavidina-biotina para peroxidasas
MEC:	Matriz extracelular
PBST:	Buffer de fosfato salino con Tween 20
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas [platelet derived growth factor]
TA:	Temperatura ambiente
TGF- β :	Factor β de crecimiento transformador [transforming growth factor- β]
TNF- β :	Factor β de necrosis tumoral [tumor necrosis factor- β]

10. REFERENCIAS

1. Arenas R. La piel: sus principales características y funciones. ICYT 1999.12:18-24.
2. Garden, Gray y O'Rahilly. Anatomía. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill, 2001.
3. Eckert R. L. Structure and function of skin, cap. 1 en Pharmacology of skin. Mukhtar H. Estados Unidos: CRC, 1992.
4. Lever W.F. Hystology of skin, cap 3 en Histopathology of skin. 7ª ed. Estados Unidos: J. B. Lippincott Company, 1999.
5. Fawcett DW, Compendio de histología. Madrid: McGraw-Hill, 1999.
6. Steen K.S. The skin in histology, cell and tissue biology. Nueva York: Elsevier Biomedical, 1993.
7. Geneser F. Histología. 3ª ed. Buenos Aires: médica panamericana, 2000.
8. Galit J. and Clark R. Wound repair in the context of extracelular matrix, current opinion in cell biology. 1994; 6:717-25.
9. Cohen I.K. Wound care and wound healthing, cap 8 en Principles of Surgery. 6a ed. Schwartz S. eds. Inglaterra: McGraw-Hill, 1994.
10. Pérez Tamayo Ruy. Introducción a la patología. 2ª ed. México: médica panamericana, 1997.
11. Boratel J.P., Marquart F.X. La cicatrización. México: mundo científico, 1996.
12. Clark R.F.A. Wound repair: overview and general considetations, cap 1 en The molecular and cellular biology of wound repair. Clark R.A.F. 2ª ed. Nueva York: plenum press, 1996.
13. Lydyard D., Grossi C. Cells involved in immune response, cap 2 en Inmunology. Roitt I., Brostoff J., Male D. 3a ed. Inglaterra: Mosby, 1996.
14. Pierce G.F., Mustoe T.A., Altrock B.W., Deuel T.F., Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. Journal of cellular biochemistry 1991. 45:319-326.
15. Greiling D., Clark R.A.F. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matriz. Journal of cell science 1997. 100:861-870.
16. Janeway C.A. How the immune system recognizes invaders. Scientific American 1993, 41-47.
17. Riches D.W.H. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis, cap. 3 en The molecular and cellular biology of wound repair. Clark R.A.F 2a ed.

- Nueva York: plenum press, 1996.
18. Portera C.A., Love E.J., Memore L., Zhang L., Muller A., Browder W., Williams D.L. Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *The American surgeon* 1997. 63:125-131.
 19. Haslett C., Henson P. Resolution of inflammation, cap 4 en *The molecular and cellular biology of wound repair*. Clark R.A.F. 2a ed. Nueva York: plenum press, 1996.
 20. Woodly D.T. reepithelization, cap 10 en *The molecular and cellular biology of wound repair*. Clark R.A.F. 2a ed. Nueva York: plenum press, 1996.
 21. Gallo R.L., Bernfield M. Proteoglycans and their role in wound repair cap 15 en *The molecular and cellular biology of wound repair*, Clark R.A.F. 2a ed. Nueva York: plenum press, 1996.
 22. Hatz R.A., Niedner R., Vanscheidt W., Westerhof W. *Wound healing and wound management*. Springer-Verlag-Berlin Heidelberg. Alemania, 1996.
 23. Madri J.A., Sankan S., Romanic A.M. Angiogenesis cap 11 en *The molecular and cellular biology of wound repair*. Clark R.A.F. 2a ed. Nueva York: plenum press, 1996.
 24. Bissel M.J., Barcellos-Hoff M.H. The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message. *Journal cell sci.* 1987. 8:327-343.
 25. Krötzsch, GFE. Análisis del efecto de la colágena-polivinilpirrolidona sobre la expresión in vitro de algunos mediadores solubles que participan en el metabolismo de la colágena. (Tesis de Doctorado) México D.F.: Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado Colegio de Ciencias y Humanidades. UNAM, 1999.
 26. Uitto J. Bauer EA, Eisen AZ. Biosynthesis of triple helical type I and type III procollagens associated with unaltered expression of collagenase by skin fibroblasts in culture. *Journal clinical invest.* 1996; 64:921-930.
 27. Granstein R.D., Murphy G.F., margolis R. J., Byrne M.H., Amento E.P. Gamma interferon inhibits collagen synthesis in vivo in the mouse. *Journal clinical invest.* 1997. 79:1254-1258.
 28. Vlodavsky I., Folkman J., Sullivan R., Fridman R., Ishai-michaeli R., Sasse J., Klagsbrun M. Endothelial cell derived basic fibroblast growth factor: síntesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *PROC. Natl. Acad. Sci.* 1987. 84:2282-2290.
 29. Robson M. *Cicatrización de heridas y reparación de tejidos*. Buenos Aires:

- Fundación Alberto J. Roemmers, 1998.
30. Albert B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts., Watson J.D. Molecular biology of the cell. 3^a ed. Londres: Garland Publishing Inc, 1994.
 31. Eckers B., Aumailley m., Krieg T. Collagens and the Re-establishment of Dermal Integrity, cap 16 en The molecular and Cellular Biology of Wound Repair. Clark R. A. F. ed 2^a ed. Nueva York: plenum press, 1996.
 32. Bennett N.T., Schultz G.S. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factor and their receptors. The American Journal of surgery 1993. 165:728-737.
 33. Adzick NS, Lorenz HP. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. Ann surgery. 1999; 220(1):10-18
 34. Massague J. The transforming growth factor- β family. Ann rev cell biology. 2000; 6: 597-641.
 35. Varga J, Jimenez SA. Transforming growth factor- β (TGF- β) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin in normal human dermal fibroblast. Biochemical Journal. 2002; 247:597-605
 36. Mast BA, Schultz GS. Interaction of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. Wound repair. 1996; 4: 411-420.
 37. R. Auerbach, W. Auerbach I. Polakowski. Assays for Angiogenesis: A Review. *Pharmacology and Therapeutics*. 1991, 51(1)1-11.
 38. Gospodawicz D., Neufeld G. Schweigerer L. Fibroblast growth factor: structural and biologic properties. Journal cell physiol Suppl. 1997; 5:15-26
 39. Gallico GG. Biologic skin substitutes. Clin, Plast. Surg. 1990, 17:519-526.
 40. Choe JM et al, Autologous, cadaveric and synthetic materials used in sling surgery: Comparative biomechanical analysis. Urology 2001; 58(3): 482-486.
 41. Pruitt B, Levine NS. Characteristics and uses of biologic dressings in skin substitutes. Archiv Surg. 1997, 119:312-322.
 42. Waínwright DJ. Use of an cellular allograft dermal matrix in the management of full-thickness burns. Burns 1995, 21(4):243-248.
 43. Silverman RP et al, Ventral hernia repair using allogenic acellular dermal matrix in a swine model. Hernia 2004; 8(4): 336-342.
 44. Heck EL, Bergstresser PR, Baxter CR. Composite skin grafts: Frozen dermal allografts support engraftment and expansion of autologous epidermis. J. Trauma 2001, 25:106.

45. Wustrow, F. Revascularization of tissue with trasplation omentum. Wound repair 2000; 12: 204-210.
46. Hernando R, Durán MA, Méndez J, Rubio F. Trasplante de epiplón sobre el miocardio, un estudio experimental en perros. Revista México Cardiología 2000; 11(4):301-303.
47. Uso del epiplón en el tratamiento de las complicaciones vasculares en el diabético. Revista Cubana Científica 1992;2:26-34.
48. 2000 Report of the AVMA panel on euthanasia. JAVMA 2001; 218: 683
49. Harris ELV, Angal S. Protein purification methods a practical approach. 2^a ed. Londres: Garland Publishing Inc, 1998.
50. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
51. Wolarsky, E. And Prudden, M.D. A new method of wound tensiometry. Archs. Surg. Chicago, 1962, 85: 404-409.
52. Sandoval, GT. Análisis de la evolución de heridas quirúrgicas en piel de ratas diabéticas tratadas con polietilenglicol (PEG). (Tesis de Licenciatura) México D.F.: Biomédicas. UNAM, 1994.