



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**DIVISION DE CIRUGIA PLASTICA Y RECONSTRUCTIVA**



**“Efecto del oxígeno hiperbárico en la prevención de cicatriz patológica  
en**

**un modelo experimental”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN CIRUGIA PLASTICA Y  
RECONSTRUCTIVA**

**P R E S E N T A**

**DR. JOSUE LARA ONTIVEROS**

**ASESOR : DRA. CLAUDIA GUTIERREZ GOMEZ**

**Agosto 2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS**

Por la vida y las grandes oportunidades que ha puesto en mi camino.

### **A MIS PADRES**

Por su apoyo incondicional, amor y enseñanzas.

### **A MI ESPOSA KARLA**

Gracias por existir y compartir tu vida conmigo, por todo tu amor, apoyo, cuidados y paciencia.

### **A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE GENERACION :**

Javier, Démian, Erik y Juan Pablo, gracias por estos tres años, por lo momentos buenos y malos. Pero sobre todo, por los que están por venir. Éxito.

### **A LA DRA MARIA LOURDES SUAREZ ROA**

Le agradezco infinitamente su ayuda, tiempo y apoyo en la planeación y redacción de este trabajo, ya que gracias a sus conocimientos y experiencia fue posible su realización.

### **A LA DRA. SARA PARAGUIRRE**

Por su apoyo para la realización de este trabajo.

### **AI DR. JOSE LUIS RIVERA PEDRAZA**

Por su tiempo y ayuda para que este trabajo fuera posible.

## INDICE

Glosario.....	IV
Relación de figuras y tablas.....	V
Resumen.....	VI
Abstract.....	VII
1. Introducción.....	12
2. Antecedentes.....	13
2.1.Inflamación.....	13
2.2.Epitelización.....	14
2.3. Formación de tejido de granulación.....	16
2.4.Neovascularización.....	18
2.5. Contracción de la herida y reorganización de la matriz extracelular.....	20
2.6 Oxígeno hiperbárico y cicatrización.....	22
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos.....	24
6. Material y Métodos.....	24
6.1. Tipo de estudio.....	24
6.2. Ubicación temporal y espacial.....	25
6.3. Criterios de selección de la muestra.....	25
6.3.1. Criterios de Inclusión.....	25
6.3.2. Criterios de Exclusión.....	25
6.4. Variables.....	25
6.4.1. Variables Independientes.....	25
6.4.2. Variables Dependientes.....	25
6.5. Tamaño de la muestra.....	26
6.6. Procedimiento.....	26
6.6.1. Producción de cicatriz patológica.....	28
6.6.2. Administración de oxígeno hiperbárico.....	30
6.6.3. Seguimiento.....	30
6.6.4. Evaluación de características macroscópicas.....	30
6.6.5. Exámen histopatológico.....	30
7. Resultados.....	31
8. Discusión.....	38
9. Conclusiones.....	41
10. Perspectivas.....	41
11. Bibliografía.....	42

## **INTRODUCCION**

Son muchos los estudios que apoyan el uso de oxígeno hiperbárico como adyuvante en la cicatrización de heridas crónicas, en las que el oxígeno hiperbárico ha demostrado mejorar la cicatrización, favoreciendo la angiogénesis, mejorando la función leucocitaria y disminuyendo el edema, sin embargo el mecanismo por el cual favorece la cicatrización no está bien entendido. En base a lo descrito en la literatura decidimos crear un modelo experimental (conejo) en el cual reproducir una cicatriz patológica. Se incluyeron 15 conejos en dos grupos. El grupo control A incluyó 5 conejos, ya que en ellos se utilizaron ambas orejas para realizar la cicatriz patológica. En el grupo caso se incluyeron 10 conejos, utilizando en ellos sólo la oreja derecha para crear la herida patológica y estos fueron sometidos a sesiones con oxígeno hiperbárico. Las heridas se revisaron diariamente a través del apósito para evaluar el progreso de la epitelización, cambios en la morfología de la cicatriz y signos de infección. Los conejos fueron sacrificados en el día 30 del periodo postoperatorio y se tomó la cicatriz quirúrgica con un 1 cm de tejido sano circundante de las orejas para estudio histopatológico y de inmunohistoquímica. No logramos reproducir el modelo de cicatriz patológica referida en la literatura. Sin embargo, en el proceso de cicatrización de segunda intención, al ser valorada las diferencias histológicas entre el grupo control y el grupo tratado con terapia de oxígeno hiperbárico encontramos diferencias interesantes.

## **RESUMEN**

### **“Efecto del oxígeno hiperbárico en la prevención de cicatriz patológica en un modelo experimental.”**

El oxígeno hiperbárico ha sido utilizado clínicamente por alrededor de tres décadas. Diversos estudios apoyan su utilidad como adyuvante en cicatrización de heridas crónicas, favoreciendo dicho proceso, sin embargo sus efectos en la cicatrización patológica han sido poco estudiados. Realizamos heridas de espesor total en la cara ventral de las orejas de 15 conejos, estos fueron divididos en 2 grupos : Grupo control (N=5) y grupo caso (N=10) siendo los de este último grupo los tratados en la cámara hiperbárica, a 1.5 atmósferas durante 60 minutos por 30 días consecutivos y comparamos cambios histológicos. Evaluamos en cada caso: espesor de cicatriz en mm, formación de cartilago (presencia o ausencia), porcentaje de tejido de granulación, neovascularización (cantidad de vasos en 5 campos a 40x), porcentaje de miofibroblastos así como presencia de colágeno. No logramos reproducir el modelo de cicatriz patológica referida en la literatura, sin embargo, en el proceso de cicatrización de segunda intención, al ser valorada las diferencias histológicas entre el grupo control y el grupo tratado con terapia de oxígeno hiperbárico, se observa una mejor evolución en la maduración de la cicatriz en el grupo tratado.

## **ABSTRACT**

**“The effect of hyperbaric oxygen in the prevention of abnormal wound healing in an animal model.”**

Hyperbaric oxygen has been used clinically for 3 decades. Several studies support its utility as an adjuvant in the treatment of chronic wounds, however its effects on abnormal wound healing has been less studied. We produced full-thickness wounds on the ventral area of the ears of 15 rabbits, and were divided in two groups : Control grupo (N=5) and Case group (N=10), the latter were treated with hyperbaric oxygen 100% at 1.5 atmospheres for 60 minutes once daily for 30 consecutive days; and we compare the histological changes. We evaluated in each case : thickness of the scar in mm, cartilage formation (presence or absence), percentage of granulation tissue, neovascular growth (quantity of vessels in 5 fields at 40x), percentage of myofibroblasts and presence of collagen fibers. We were not able to reproduce the abnormal wound healing model as referred on the literature, however, when we evaluated the histological differences in both groups on the second intention wound healing process, we did observed a better evolution on the maturation of the scar on the group treated with hyperbaric oxygen.

## **ANTECEDENTES**

La cicatrización es un proceso dinámico, interactivo que compromete mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular y células. La cicatrización tiene tres fases :

1. Inflamatoria
2. Formación de tejido o epitelización
3. Remodelación.

### **Inflamación**

La lesión tisular causa una disrupción de los vasos sanguíneos, lo cual conlleva a una extravasación de los constituyentes sanguíneos. El coagulo sanguíneo reestablece la homeostasis y provee una matriz extracelular provisional para la migración celular. La plaquetas no solamente facilitan la formación de un tapón hemostático sino que también secretan mucho mediadores que intervienen en el proceso de cicatrización tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas, que atrae y activa macrófago y fibroblastos. Sin embargo, en ausencia de hemorragia, las plaquetas no son esenciales en la cicatrización. Muchos mediadores vasoactivos y factores quimiotácticos son generados por los factores de coagulación y el complemento; y por el parénquima lesionado o activado. Estas sustancias reclutan leucocitos activados en el sitio de la lesión (1).

Los neutrófilos infiltrados limpian el área lesionada de partículas extrañas y bacterias y son extraídos con la costra o fagocitados por macrófagos. En respuesta a quimioatrayentes, tales como fragmentos de proteínas de la matriz extracelular, factor de crecimiento transformante beta y proteína quimioatrayente derivada de monolitos, los monocitos también infiltran el sitio

de la herida y se transforman en macrófagos activados que liberan factores de crecimiento y factor de crecimiento endotelial, los cuales inician la formación de tejido de granulación. Los macrófagos se unen a proteínas específicas de la matriz extracelular por sus receptores, esta acción estimula la fagocitosis de los microorganismos y fragmentos de matriz extracelular por los macrófagos.

La adhesión de la matriz extracelular también estimula a los monocitos para desarrollar metamorfosis de los mismos en macrófagos inflamatorios o reparadores (1,2). La adhesión induce también a los monocitos y macrófagos a expresar factor estimulante de colonias 1, una citocina necesaria para la supervivencia de estas células; factor de necrosis tumoral alfa, una citocina inflamatoria potente; y factor de crecimiento derivado de plaquetas, un quimioatrayente potente y mitógeno para los fibroblastos. Otras citocinas importantes expresadas por monocitos y macrófagos son el factor de crecimiento transformante alfa, interleucina – 1 y factor insulina-like I. Los factores de crecimiento derivados de monocitos y macrófagos son necesarios para la iniciación y propagación de la formación del nuevo tejido. Por lo anterior los macrófagos parecen tener un papel importante entre la inflamación y la reparación (3).

### **Epitelización**

La reepitelización de las heridas comienza apenas unas horas posterior a la lesión. Las células epidérmicas de los folículos pilosos, rápidamente remueven el coágulo y estroma lesionado de la herida. Al mismo tiempo, las células llegan a ser marcadas con alteraciones fenotípicas que incluyen retracción de tonofilamentos intracelulares; la disolución de la mayoría de los desmosomas

intercelulares, los cuales proveen conexiones físicas entre las células; y formación de filamentos de actina periférica citoplasmática, lo cual permite el movimiento celular. Además, las células epidérmicas y dérmicas pequeñas se adhieren una a la otra, debido a la disolución de enlaces de los hemidesmosomas entre la epidermis y la membrana basal, lo cual permite el movimiento lateral de las células epidérmicas. La expresión de los receptores de integrinas sobre las células epidérmicas les permite interactuar con una variedad de proteínas de matriz extracelular (fibronectina y vitronectina) que son entremezcladas con colágena estromal tipo I en el margen de la herida y entretejidas con el coágulo de fibrina en el espacio de la herida (3,4). La migración de las células epidérmicas disecciona la herida, separando la costra desecada del tejido viable. La vía de disección parece ser determinado por la variedad de integrinas que la migración de células epidérmicas expresan sobre sus membranas celulares. La degradación de la matriz extracelular, lo cual es requerido si las células epidérmicas migran entre la dermis colagenasa y la costra de fibrina, depende de la producción de colagenasa por la células epidérmicas, también la activación de plasmita mediante el activador del plasminógeno producto de las células epidérmicas. El activador del plasminógeno también activa la colagenasa (matriz de metaloproteinasas 1) y por lo tanto facilita la degradación de colágena y las proteínas de la matriz extracelular.

De uno a dos días después de la lesión, las células epidérmicas del margen de la herida comienzan a proliferar por detrás de las células que migraron activamente. El estímulo para la migración y proliferación de las células epidérmicas durante la reepitelización no ha sido determinado, pero existen

muchas posibilidades. La ausencia de células vecinas en el margen de la herida (el efecto del borde libre) puede señalar ambas vías de migración o proliferación de las células epidérmicas. La liberación local de factores de crecimiento y el incremento en la expresión de los receptores de los factores de crecimiento también estimulan estos procesos, estos incluyen el factor de crecimiento epidérmico de queratinocitos.

### **Formación de tejido de granulación**

El estroma nuevo, a menudo llamado tejido de granulación comienza a invadir el espacio de la herida aproximadamente 4 días después de la lesión. Muchos capilares nuevos crecen en el nuevo estroma con apariencia granular, macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos crecen en el espacio de la herida al mismo tiempo. Los macrófagos proveen una fuente continua de factores de crecimiento necesarios para estimular fibroplasia y angiogénesis; los fibroblastos producen una nueva matriz extracelular necesaria para el crecimiento celular en el interior; los vasos sanguíneos llevan oxígeno y los nutrientes necesarios para el metabolismo.

Los factores de crecimiento, especialmente el factor derivado de plaquetas y el factor transformante beta 1, junto con las moléculas de la matriz extracelular, presumiblemente estimulan a los fibroblastos del tejido aledaño a la herida para proliferar, expresan apropiadamente receptores de integrinas y migran dentro del espacio de la herida (7). Además, el factor derivado de plaquetas acelera la cicatrización de las úlceras de presión y úlceras diabéticas, el factor de crecimiento fibroblástico básico ha sido usado con éxito para tratar úlceras de presión crónica. Las moléculas estructurales de recién formación en la matriz

extracelular, llamada matriz provisional, contribuye a la formación de tejido de granulación al proveer andamios o conducen a la migración celular. Estas moléculas incluyen fibrina, fibronectina y ácido hialurónico. De hecho, la apariencia de fibronectina y los receptores de integrinas que unidos a la fibronectina, fibrina o ambos sobre los fibroblastos parece ser limitado en la formación de tejido de granulación. Los fibroblastos son responsables de la síntesis, depósito y remodelación de la matriz extracelular. Al contrario, la matriz extracelular puede tener un efecto positivo o negativo en la capacidad de los fibroblastos a sintetizar, depositar, remodelar y generalmente interactúa con la matriz extracelular (8).

El movimiento celular en el coágulo sanguíneo de los enlaces de fibrina ó en unión estrecha con la matriz extracelular puede requerir un sistema proteolítico activo que puede ser la clave en la migración celular. Una variedad de enzimas derivadas de fibroblastos, además de plasmita sérica, son potenciales candidatos para esta tarea, incluyendo activador del plasminógeno, colagenasa, gelatinasa A y estromelisina.

Después de la migración en las heridas, los fibroblastos comienzan la síntesis de matriz extracelular. La matriz provisional es reemplazada gradualmente con matriz colagenosa, como resultado de la acción del factor transformante beta 1. Una vez que una abundante matriz de colágena ha sido depositada en la herida, los fibroblastos detienen la producción de colágena, y el tejido de granulación enriquecido por lo fibroblastos es reemplazado por una costra relativamente acelular. Las células en la herida desarrollan apoptosis por señales desconocidas.

## **Neovascularización**

La formación de vasos sanguíneos nuevos es necesaria para sostener el nuevo tejido de granulación. La angiogénesis es un proceso complejo que favorece la formación de una matriz extracelular en el lecho de la herida así como la migración y estimulación mitótica de las células endoteliales.

La inducción de angiogénesis fue inicialmente atribuida al factor de crecimiento derivado de los fibroblastos ácido ó básico. Subsecuentemente, muchas otras moléculas han sido encontradas en la actividad angiogénica, incluyendo factor de crecimiento endotelial vascular, factor transformante beta, angiogenina, angiotropina, angiopoyetina 1 y trombospindina. La baja tensión de oxígeno y niveles elevados de ácido láctico pueden también estimular angiogénesis. Muchas de las moléculas mencionadas anteriormente parecen inducir angiogénesis por estimulación del factor de crecimiento derivado de fibroblastos básico y factor de crecimiento endotelial vascular. El factor básico de crecimiento fibroblástico puede controlar el proceso de angiogénesis durante los primeros tres días de la reparación de la herida, mientras que el factor de crecimiento endotelial vascular es crítico para la angiogénesis durante la formación de tejido de granulación de los días 4 al 7 (12).

Además de los factores angiogénicos, se requiere de una adecuada matriz extracelular y receptores endoteliales para la matriz provisional necesaria para la angiogénesis. Las células endoteliales microvasculares proliferantes adyacentes a y dentro de las heridas depositan grandes cantidades de fibronectina en las paredes de los vasos. Debido a que la angiogénesis parece requerir de la

expresión de receptores de fibronectina funcional por las células endoteliales, la fibronectina perivascular puede actuar como un conductor para el movimiento de las células endoteliales dentro de la herida. La expresión de proteasas y su actividad son también necesarias para la angiogénesis. La serie de eventos que producen angiogénesis pueden ser lesiones que causan destrucción del tejido e hipoxia. Los factores angiogénicos tales como factor de crecimiento derivado de fibroblastos ácido y básico son inmediatamente liberados por macrófagos después de la disrupción celular, y la producción de factor de crecimiento endotelial vascular por células epidérmicas son estimuladas por hipoxia (12). Las enzimas proteolíticas liberadas en el tejido conectivo degradan las proteínas de la matriz extracelular. Los fragmentos de estas proteínas reclutan monocitos de sangre periférica en el sitio lesionado, donde llegan a ser macrófagos activados y liberan factores angiogénicos. Ciertos tipos de factores angiogénicos derivados de macrófagos, tales como el factor de crecimiento fibroblástico, estimulan a las células endoteliales para liberar activador del plasminógeno y procolagenasa. El activador del plasminógeno convierte el plasminógeno en plasmita y procolagenasa a colagenasa activa y en conjunto estas dos proteasas digieren las membranas basales. La fragmentación de la membrana basal permite a las células endoteliales estimuladas por los factores angiogénicos migrar y formar nuevos vasos sanguíneos en el sitio lesionado. Una vez que la herida es cubierta por tejido de granulación, la angiogénesis cesa y muchos de los nuevos vasos sanguíneos se desintegran como resultado de la apoptosis. Esta muerte celular programada probablemente esta regulada por una variedad de moléculas matriz, tales como trombospondinas 1 y 2, factores antiangiogénicos tales como angiostatina, endostatina y angiopoyetina 2.

### **Contracción de la herida y reorganización de la matriz extracelular**

La contracción de la herida comprende una interacción compleja y orquestada de células, matriz extracelular y citocinas. Durante la segunda semana de la cicatrización, los fibroblastos asumen un fenotipo miofibroblástico caracterizado por túmulos grandes de actina y microfilamentos dispuestos a lo largo del citoplasma de la membrana plasmática de las células y por las uniones célula-célula (11). La apariencia de los miofibroblastos corresponde al inicio del tejido conectivo compactado a la contracción de la herida. La contracción probablemente requiere de la estimulación por el factor transformante beta 1 o beta 2, y factor de crecimiento derivado de plaquetas, uniendo a los fibroblastos a la matriz de colágena a través de receptores integrinas y uniones entre puentes de colágena individuales.

La remodelación de la colágena durante la transición del tejido de granulación a la costra, depende de la síntesis continua y catabolismo de colágena en un bajo porcentaje. La degradación de colágena en la herida esta controlada por muchas enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas, las cuales son secretadas por macrófagos, células epidérmicas y endoteliales así como fibroblastos (13). Las diferentes fases de la cicatrización son realmente una combinación de metaloproteínas e inhibidores de tejido de las mismas. Las heridas ganan en promedio 20% de su fuerza final en las primeras tres semanas, durante las cuales la colágena fibrilar ha acumulado relativamente rápido y ha sido remodelado por la contracción de la herida. Por lo tanto, el porcentaje de ganancia de la fuerza tensil es lenta, reflejando un mucho menor porcentaje de acumulo de colágena y más importante remodelación de

colágena con la formación de grandes cantidades de uniones y un incremento en el número de enlaces intermoleculares. Por lo tanto, las heridas nunca tendrán la misma fuerza tensil, la fuerza máxima de la cicatriz es solamente del 70% de la fuerza de la piel normal.

El nivel de la angiogénesis o flujo sanguíneo en una cicatriz en formación influirá en el tipo de la cicatrización final. Un aumento en la angiogénesis producirá un incremento en la síntesis y depósito de colágena dando lugar a los tipos de cicatrización patológica : hipertrófica y queloide (14). Actualmente la cicatriz patológica se presenta en el 4-16% de los pacientes sometidos a cirugía, provocando deformidad estética y morbilidad asociada con prurito y dolor, requiriendo un manejo combinado para evitar recidiva, hasta las fecha los tratamientos descritos incluyen :

1. Cirugía
2. Radiación
3. Presión
4. Láminas de gel de silicón
5. Láser
6. Esteroides
7. Crioterapia
8. Interferón
9. Otros (5-FU, verapamilo, putrescina, ácido retinoico, colchicina, talidomida, metrotexate, etc.)

## **Oxígeno hiperbárico y cicatrización.**

Son muchos los estudios que apoyan el uso de oxígeno hiperbárico como adyuvante en la cicatrización de heridas crónicas, la cual está basada en experiencias anecdóticas y más recientemente apoyada por hallazgos clínicos y de laboratorio de heridas irradiadas, en las que el oxígeno hiperbárico ha demostrado mejorar la cicatrización, favoreciendo la angiogénesis, mejorando la función leucocitaria y disminuyendo el edema, sin embargo el mecanismo por el cual favorece la cicatrización no está bien entendido.

Otras series clínicas (5) también han abogado por su uso en úlceras crónicas de miembros inferiores con patología diabética o venosa. Recientemente se publicó un artículo que estudia el efecto del oxígeno hiperbárico en células de piel normal y cultivada en donde se encontró un efecto estimulante sobre los fibroblastos a presiones menores de 2.5 atmósferas, así como en la producción de colágena, sin embargo la calidad de la colágena y el tipo de la misma no fue estudiada (16).

Los efectos del oxígeno hiperbárico en la cicatrización anómala y factores de crecimiento y citocina pro inflamatorias no han sido estudiados.

En base a nuestros antecedentes se planteó la siguiente pregunta de investigación ¿ se previene la formación de cicatriz patológica con el uso de oxígeno hiperbárico en el modelo experimental de conejo?

## **HIPOTESIS**

Si la hipoxia es un factor condicionante de cicatriz patológica y el oxígeno hiperbárico ha mostrado efectos benéficos en la cicatrización, entonces el uso de oxígeno hiperbárico prevendrá la formación de cicatrices anormales en el modelo experimental.

## **OBJETIVOS**

Se determinó el efecto macroscópico del oxígeno hiperbárico sobre la cicatriz patológica en el modelo de conejo.

Se determinaron los cambios histológicos causados por la exposición a oxígeno hiperbárico en el modelo de conejo.

Se determinó la cantidad y tipo de colágena en los dos grupos de estudio.

## **JUSTIFICACION**

La formación de cicatrices queloides después de un trauma, es un problema significativo, particularmente en población de piel oscura, en los cuales la incidencia de cicatrices queloides se ha estimado entre 4 y 16% dependiendo la serie. Los fibroblastos son las células responsables para el depósito de colágena, que es necesaria para la reparación del tejido dañado, esta es la proteína más importante en el reino animal., calculada en el 30% del total de las proteínas en el cuerpo humano (15). En tejidos normales, la colágena provee la fuerza, integridad y estructura. Cuando existe un depósito excesivo de la misma, en el sitio de la herida, la estructura anatómica normal se pierde, comprometiendo la función y ocurriendo la fibrosis, lo cual conlleva a la cicatrización anormal (14). Las cicatrices queloides son agresivas localmente y

en contraste con las cicatrices hipertróficas, porque invaden piel sana. A menudo tienen recurrencia a pesar de un tratamiento multimodal y pueden persistir por muchos años, lo cual genera gastos médicos altos, pérdidas laborales por ausentismo y pueden generar en los pacientes trastornos emocionales por implicaciones estéticas.

Las cicatrices queloides comienzan a desarrollarse posterior a eventos comprometidos en la reparación de tejido sano. En donde esta secuencia de reparación normal llega a estar alterada y comprometa la fase proliferativa de la cicatrización.

Los fibroblastos de cicatrices queloides muestran, una respuesta mayor al uso de factores de crecimiento in Vitro y una baja respuesta a los mediadores que inhiben a los fibroblastos de piel sana. Pero a pesar de estas características de crecimiento anormal, los mecanismos de queloidogénesis continúan siendo desconocidos.

Por otro lado, son muchos los estudios que apoyan el efecto benéfico del oxígeno hiperbárico en la cicatrización de úlceras crónicas, infectadas y difíciles de cicatrizar, sin embargo los efectos del mismo sobre la cicatrización anormal no han sido estudiados.

Entender cuales son los principios biológicos de la producción de la cicatrización anormal y el efecto del oxígeno hiperbárico sobre la misma, podrá transmitirse y redundar en nuevas estrategias de tratamiento.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Tipo de estudio**

Estudio experimental, ciego.

### **Ubicación temporal y espacial**

Prospectivo y transversal.

### **Criterios de selección de la muestra**

#### **Criterios de Inclusión**

Se incluirán conejos sanos de raza Nueva Zelanda, machos, libres de ectoparásitos, con peso entre 2,500 y 3,500 gramos, con edades entre 9 y 12 meses, mantenidos en condiciones controladas en Bioterio.

.

#### **Criterios de exclusión**

Conejos que fallezcan por complicaciones anestésicas o por causas ajenas al estudio.

Conejos que no cumplan el seguimiento por causas demostrables ajenas al estudio.

### **Definición de Variables**

#### **Independientes**

Tratamiento con oxígeno hiperbárico y sin oxígeno hiperbárico.

Infección.

## **Dependientes**

Tipo de cicatrización : Patológica ó no patológica a nivel macroscópico.

Parámetros histológicos : Epitelio, espesor de la cicatriz, formación de cartílago, tejido de granulación, neoformación vascular, miofibroblastos y colágeno.

## **Tamaño de la muestra**

Se incluyeron 15 conejos en dos grupos. El grupo control incluyó 5 conejos, ya que en ellos se utilizaron ambas orejas para realizar la cicatriz patológica. En el grupo caso se incluyeron 10 conejos, utilizando en ellos sólo la oreja derecha para crear la herida patológica.

## **Consideraciones éticas**

“Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud”. El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

## **PROCEDIMIENTO**

Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de ventilación y temperatura, por lo menos 7 días antes de la cirugía. Se alimentaron con alimento para conejo (Laboratory Rabbit Diet) y agua ad libitum. El ciclo día-noche se mantuvo constante, con 12 horas de sueño y 12 horas de vigilia.

Cada animal se mantuvo en una jaula individual. Fueron desparasitados con 200-400 microgramos/kg de Ivermectina (Ivomec) por vía subcutánea (Fig. 1).



**Fig.1. 15 Conejos raza Nueva Zelanda. Dividos en dos grupos.**

Previo a la cirugía los animales fueron sedados con 5mg/kg de xilacina (Rompum) vía IM, pesados y canalizados en la oreja. (fig. 2). La anestesia se realizó con ketamina (20mg/kg IM), diazepam (1.5mg/kg. IV) y flunixin meglubina (1.1 mg/kg. IV) (Fig. 3). Se administró una dosis profiláctica (15-20 mg/kg) de cefalotina por vía IV. Se realizó tricotomía de la oreja con rasuradora eléctrica. Se aplicó solución isodine espuma en el área quirúrgica y se cubrió con campos estériles. Durante la cirugía se monitorizaron la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y los reflejos pupilares y se aportó oxígeno suplementario (3L/min) con catéter nasal. La alimentación se reinició el día siguiente a la cirugía.



**Fig. 2. Fueron canalizados en la oreja.**



**Fig.3. La anestesia se realizó con Ketamina y diazepam. Monitoreo de frecuencia cardiaca, respiratoria y reflejos pupilares.**

### **Producción de la cicatriz patológica**

Se realizó una herida de espesor total en la piel de 1 cm (transversal) por 3 cm (longitudinal) en la cara ventral de ambas orejas en el grupo A y en la oreja derecha en el grupo B. La herida orientada en su longitud con el eje mayor de la oreja. Se cubrió con apósito semipermeable transparente (Tegaderm 3M). No se aplicaron medicamentos tópicos (Fig. 4 y 5).



**Fig. 4. Herida de espesor total en la cara ventral de la oreja.**



**Fig. 5. Cobertura de la herida con Tegaderm o con Steri-strips.**

### **Administración de oxígeno hiperbárico**

El grupo B fué sometido a terapia con oxígeno hiperbárico a 1.5 atmósferas, 100% de oxígeno, durante 60 minutos diarios por 30 días. Se utilizó la cámara de oxígeno hiperbárico (Lab Med) disponible en el departamento de Biología Molecular del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

### **Seguimiento**

Las heridas se revisaron diariamente a través del apósito para evaluar el progreso de la epitelización, cambios en la morfología de la cicatriz y signos de infección. Los conejos fueron sacrificados en el día 30 del periodo postoperatorio, siendo el conejo sedado con la aplicación IM de xilacina (5mg/kg), posteriormente fue anestesiado con pentobarbital sódico (30 mg/kg IV) y finalmente se aplicaron 10 mEq de cloruro de potasio IV. Se tomó la cicatriz quirúrgica con un 1 cm de tejido sano circundante de las orejas para estudio histopatológico y de inmunohistoquímica.

### **Evaluación de características macroscópicas**

Las características macroscópicas fueron evaluadas por el investigador principal (JLO) y por el colaborador (JLRP) tomando en cuenta tamaño y coloración.

### **Exámen histopatológico**

Una vez obtenidos los especímenes se fijaron con solución de formaldehído al 4% con ph neutro, se deshidrataron e incluyeron en parafina realizando cortes de 4 micras en la porción de mayor grosor de la cicatriz en continuidad con los

bordes no lesionados, se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina. Fueron analizados por un patólogo (MLSR) y el investigador principal (JLO) previamente calibrados evaluando las características histopatológicas de cada caso: epitelio, espesor de cicatriz en mm, formación de cartilago (presencia o ausencia), porcentaje de tejido de granulación, neovascularización (cantidad de vasos en 5 campos a 40x), porcentaje de miofibroblastos así como presencia de colágeno.

Las reacciones de inmunohistoquímica correspondientes a colagenasa I, colagenasa III y CD34 (MRV) fueron evaluadas por el patólogo (MLSR) y el investigador principal (JLO) considerando al expresión en las fibras de colagena para colagenasa I y III y para CD34 en el componente vascular.

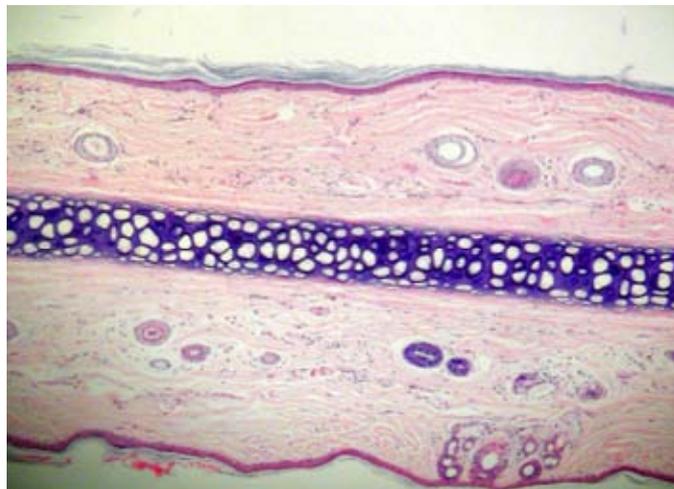
## **RESULTADOS**

### **Evaluación macroscópica**

En ambos grupos se llevo un seguimiento diario de las heridas, observándose en todos los casos la misma evolución, proceso cicatrizal con formación de costra. En tres casos correspondientes al grupo B en los últimos tres días se observó la presencia de ulceración, variando en sus dimensiones como posible consecuencia del rascado del conejo. En ningún caso hubo datos clínicos de infección. En tres casos del grupo A se observaba un ligero aumento de volumen del área quirúrgica.

### **Evaluación histopatológica con H y E**

La valoración de la formación de cicatriz patológica no fue posible debido a que en todos los casos de ambos grupos no se formo, a pesar de realizar el modelo como lo marca la literatura. Sin embargo se realizo la valoración de los parámetros histológicos definidos previamente (Fig. 6).



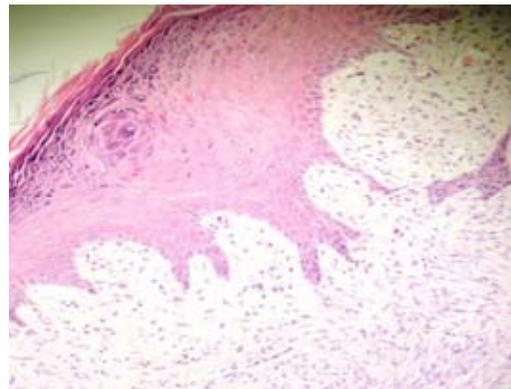
**Figura 6. Tejido normal de la oreja del conejo, corte sagital . Presencia de epitelio simple queratinizado, anexos cutáneos y cartílago.**

De nuestro grupo A se tomaron ambas orejas para un total de 10 muestras y del grupo B solo se tomo la oreja derecha de diez conejos quedando el mismo número de muestra en ambos grupos. Los resultados del análisis histológico en H&E, se presentan en la Tabla 1.

Con respecto al del epitelio se puede observar, que en la mayoría de los casos tanto de grupo A como B, se observa un epitelio escamoso estratificado queratinizado (Fig. 7), en tres de los casos del grupo A encontramos hiperplasia epitelial (Fig. 8), la cual solo se presento en un caso del B, sin embargo en el grupo B se observaron tres casos donde había ulceración, posiblemente causada

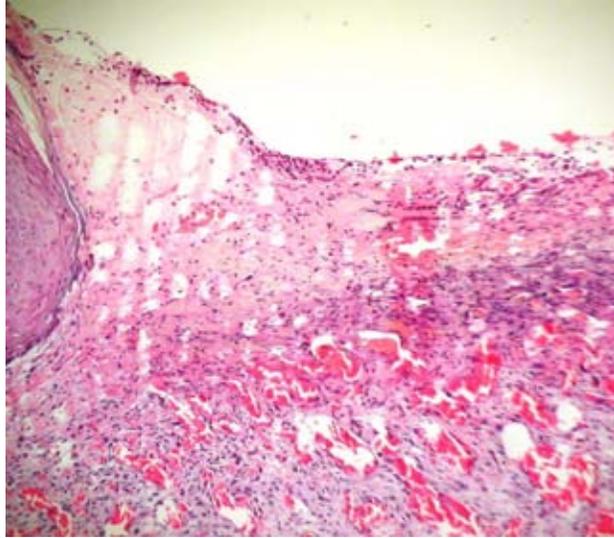


**Figura 7. Epitelio escamoso estratificado queratinizado.**



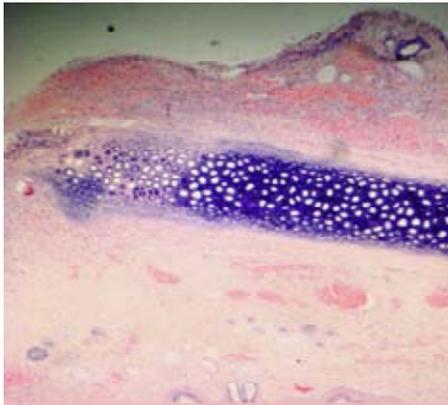
**Figura 8. Hiperplasia epitelial.**

por el mismo conejo (Fig. 9). El mayor espesor de la cicatriz en el grupo A fue de 20 mm y el menor de 0.5mm, mientras que en el grupo B en los casos que se observo ulceración no fue posible medir el espesor de la cicatriz, de los restantes el mayor espesor fue de 0.7 mm y el menor de 0.3 mm.

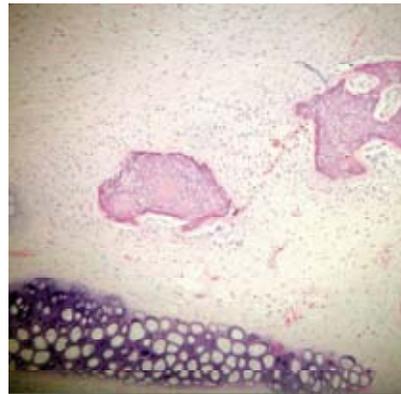


**Figura 9. Ulcera, con presencia de importante infiltrado inflamatorio agudo y tejido de granulación.**

En el grupo A en nueve de los 10 casos se observó en la zona correspondiente a la cicatriz, formación de cartílago y en dos casos metaplasia ósea en la misma área (Fig. 10 y 11).



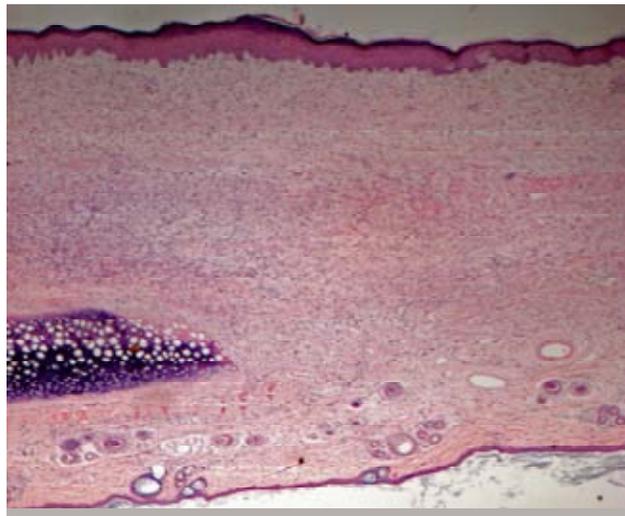
**Figura 10. Formación de cartílago.**



**Figura 11. Metaplasia ósea.**

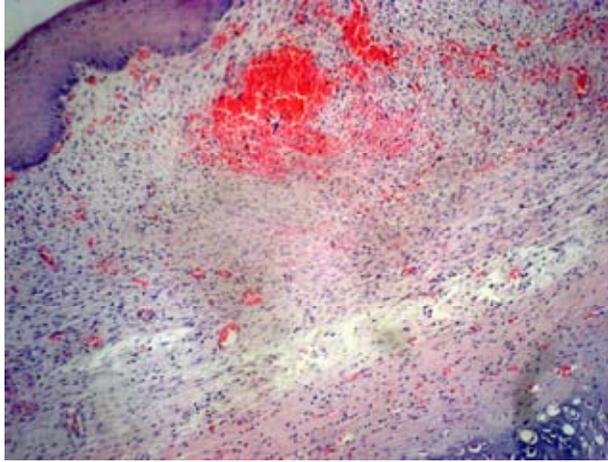
Con respecto al grupo B, en el acto quirúrgico para crear la cicatriz patológica, al levantar el tejido incidentalmente se abarco parte de cartílago auricular, por lo cual

al momento de la valoración histológica se observo ausencia de este (Fig. 12) , sin embargo en la mayoría de los casos se observo la formación de cartílago en un 80%, solo en un caso la formación de cartílago fue mínima en los extremos de la lesión.



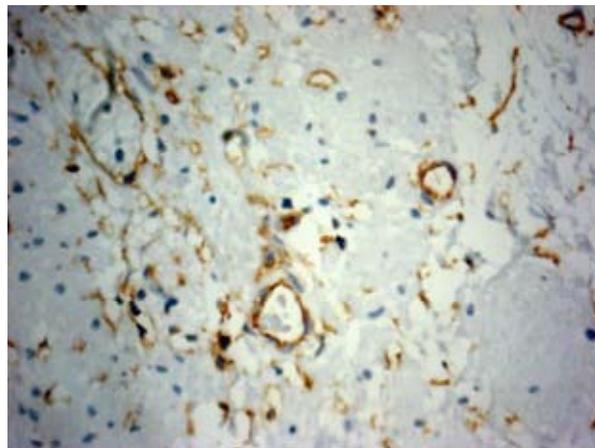
**Figura 12. Ausencia de cartílago**

En relación a la presencia del tejido de granulación tanto en el grupo A como el grupo B los porcentajes fueron muy variados, observándose los mayores porcentajes en el grupo B debido a los casos donde se presentaron las zonas de ulceración y al mismo tiempo los de menor porcentaje de cero a cinco en los que presentaron una cicatrización normal. (Fig. 13).



**Figura 13. Tejido de granulación.**

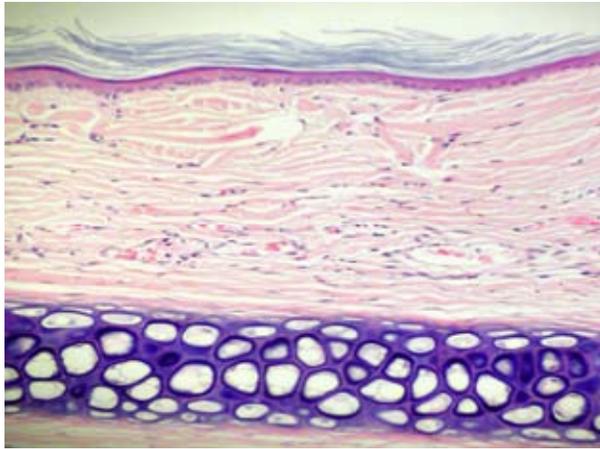
Se contaron los vasos en neoformación con la reacción de inmunohistoquímica correspondiente a CD34, valorándose cinco campos a 40X, tanto en el grupo A como el grupo B, la cantidad de vasos fue muy variable, en dos casos la valoración no fue posible porque se desprendió el tejido (uno de cada grupo). Sin embargo en el grupo A el mínimo de vasos contados fue de 29, mientras que en el grupo B, tres casos estuvieron por debajo de esta cifra (Fig. 14).



**Figura 14. Inmunohistoquímica de vasos sanguíneos. Neoformación.**

La valoración de la presencia de miofibroblastos es muy similar en ambos grupos donde el porcentaje observado era igual o mayor al 60%. Esto es de esperarse porque la fase de cicatriz observada era temprana.

La presencia de colágeno inmaduro en la mitad de los casos del grupo A fue mayor al 70% de colágeno inmaduro, solo en un caso se observó en un 20% la presencia de colágeno maduro (Fig. 15).



**Figura 15. Colágeno inmaduro.**

En el grupo B la presencia de colágeno maduro fue más frecuente (cuatro casos) y en la mayoría de los casos la presencia de colágeno inmaduro fue en menor porcentaje.

Dentro de otras observaciones dos casos del grupo A y tres del grupo B presentaron reacción a cuerpo extraño (Fig. 16).

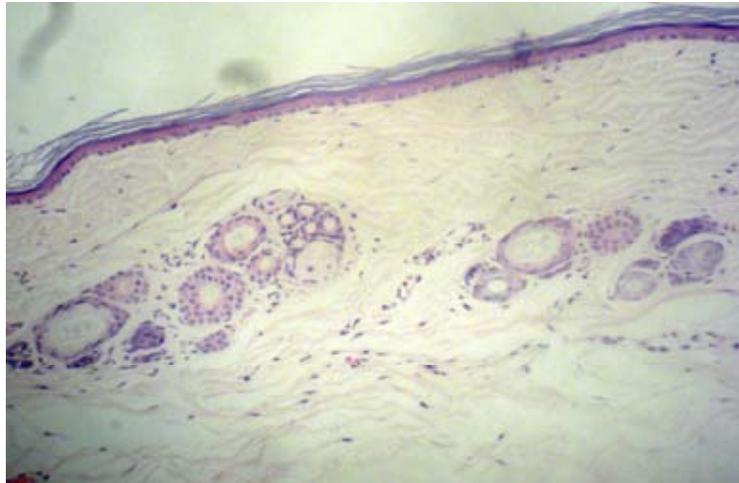


Figura 16. Reacción a cuerpo extraño.

Tabla 1. Características histológicas y de inmunohistoquímica del grupo A y grupo B

PHx	E		EC Mm		FC		TG (%)		NV		M (%)		C/CM (%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	EEQ	U (0.5)	0.7	----	Si	Si	60	90	33	35	60	90	40/0	10/0
2	EEQ	EEQ	0.6	0.6	Si	Si	50	5	38	20	65	80	40/0	90/10
3	EEQ	EEQ	0.5	0.4	Si	Si	20	5	29	10	60	60	80/0	30/70
4	EEQ	EEQ*	0.7	0.5	Si	Si	20	25	32	35	65	80	80/0	60/40
5	EEQ*	EEQ	0.8	0.7	Si	Si	5	20	NV	35	80	90	95/0	50/0
6	HE	EEQ	20	0.3	Si	Si	75	0	31	10	60	60	20/0	30/70
7	EEQ*	HE*	0.6	0.5	Si	Si	0	80	40	NV	60	80	80/20	30/0
8	EEQ	U (0.8)*	10	----	Si	No	70	90	45	50	80	60	30/0	10/0
9	HE	U (40)	0.8	----	Si	Si	20	90	60	50	80	60	30/0	5/0
10	HE	EEQ	20	0.5	Si	Si	15	40	30	30	80	80	70/0	5/0

PHx (parámetros histológicos), A (control), B (problema), Epitelio (EEQ escamoso estratificado queratinizado, HE Hiperplasia epitelial, U ulcera) EC (Espesor de cicatriz), FC (Formación de cartílago), TG (Tejido de granulación), NV (neoformación vascular), M (Miofibroblastos), C (colágeno inmaduro), \* Reacción a cuerpo extraño.

## DISCUSION

En un trabajo realizado por Jeffrey M. Davidson en el 2001 (16) se describe el procedimiento para la formación a nivel quirúrgico de cicatriz patológica como modelo de estudio en conejos. Este modelo fue incluido para nuestro estudio por cumplir con los objetivos que nos planteamos para este. Efectuando todos los pasos señalados, se llevó a cabo el procedimiento, sin embargo, en nuestra

evaluación histológica no se observaron los parámetros histopatológicos para una cicatriz patológica. Por lo tanto, a pesar de estar reportado en la literatura como un modelo adecuado para este fin, nosotros no logramos obtener los resultados esperados.

El proceso cicatrizal comprende varias fases directamente relacionadas con el tamaño de la pérdida de tejido y otros factores como los procesos infecciosos. En la cicatrización de segunda intención las fases varían en tiempos siendo más frecuente encontrar cambios simultáneos de la evolución de una cicatriz. En nuestro estudio tanto en los casos tratados con oxígeno hiperbárico como en los no tratados se observaron las diferentes fases (18).

La epidermis que cubre las orejas de los conejos se conforma por un epitelio simple queratinizado básicamente, en este estudio la epitelización de la herida quirúrgica en el mayor porcentaje de los casos en ambos grupos se conformo de un epitelio escamoso estratificado queratinizado, que cubría el defecto, esto forma parte de el restablecimiento donde este tipo de epitelio presenta una mayor protección evolucionando como fase final para recuperar el grosor habitual (17). Comparando ambos grupos no se observan diferencias en la epitelización de la herida con respecto a la aplicación de la terapia con el oxígeno hiperbárico.

El rascado del animal en la zona de la herida posiblemente se deba a diferentes causas, una podría ser como un reflejo ocasionado por el estrés al que fue sometido el animal en la cámara hiperbárica. Otra segunda opción puede deberse a la presencia de células inflamatorias, específicamente células cebadas, que liberan histamina la cual provoca prurito. Sin embargo esto debe ser mejor sustentado con otro tipo de estudios para su valoración.

La curación de una herida consiste en proporciones variables de procesos distintos como la regeneración, el depósito de tejido fibroso y formación de cicatriz.

La curación con formación de cicatriz se produce cuando la trama de matriz extracelular se encuentra dañada provocando alteraciones en la arquitectura tisular (17).

En la curación de las heridas cutáneas, la síntesis de colágeno por los fibroblastos comienza entre los tres y cinco días después de la lesión, y continúa durante varias semanas dependiendo del tamaño de la herida. La acumulación neta de colágeno no depende únicamente del incremento de la síntesis de colágeno si no también del descenso de su degradación. La trama de tejido de granulación se convierte en una cicatriz compuesta por fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de tejido elástico y otros componentes de la matriz extracelular. Al madurar la cicatriz, continúa la regresión vascular, transformando, finalmente, el tejido de granulación ricamente vascularizado en una cicatriz pálida y avascular (18). Nosotros observamos en ambos grupos que el proceso cicatrizal era inmaduro, debido a la presencia de tejido de granulación, abundantes miofibroblastos, neoformación vascular y colágeno inmaduro. Sin embargo el grupo sometido a la terapia con oxígeno hiperbárico mostró ligeras diferencias en cuanto al espesor de la cicatriz que fue menor en el mayor porcentaje de los casos. Con respecto al tejido de granulación presente aunque la diferencia no es muy evidente si se observa menor porcentaje en el grupo tratado. A pesar de que no se realizó tinción de histoquímica para valorar la presencia de colágeno maduro, por morfología

encontramos mayor porcentaje de casos que presentaban ya esta maduración de la colágena en el grupo sometido a la terapia con oxígeno hiperbárico.

En la angiogénesis originada a partir de los vasos locales preexistentes, el VEGF estimula tanto la proliferación como la movilidad de las células endoteliales, iniciando así el brote de los nuevos capilares. La proliferación de células endoteliales, su diferenciación y migración también pueden verse potenciadas por el FGF-2. En este trabajo la presencia de nuevos vasos valorada en cinco campos en ambos grupos las diferencias fueron mínimas, pero sí se observa una disminución de estos vasos por la maduración de la cicatriz en el grupo tratado.

## **CONCLUSIONES**

No se logró reproducir el modelo de cicatriz patológica referida en la literatura. Sin embargo, en el proceso de cicatrización de segunda intención, al ser valorada las diferencias histológicas entre el grupo control y el grupo tratado con terapia de oxígeno hiperbárico, se observa una mejor evolución en la maduración de la cicatriz en el grupo tratado.

## **PERSPECTIVAS**

- Ampliar la valoración de la intervención del oxígeno hiperbárico en diferentes fases de la cicatrización a nivel molecular.
- La falta de literatura sobre el papel que juega el oxígeno hiperbárico en la cicatrización de segunda intención no relacionada específicamente a úlceras da la pauta para crear una línea de investigación en este campo.
- Crear un modelo experimental reproducible para crear cicatriz patológica.

## RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. 15 Conejos raza Nueva Zelanda. Divididos en dos grupos. Página 27

Figura 2. Fueron canalizados en la oreja. Página 28.

Figura 3. La anestesia se realizó con ketamina y diazepam. Monitoreo de frecuencia cardíaca, respiratoria y reflejos pupilares. Página 28.

Figura 4. Herida de espesor total en la cara ventral de la oreja. Página 29.

Figura 5. Cobertura de la herida con Tegaderm o con Steri-strips. Página 29.

Figura 6. Tejido normal de la oreja del conejo, corte sagital . Presencia de epitelio simple queratinizado, anexos cutáneos y cartílago. Página 32.

Figura 7. Epitelio escamoso estratificado queratinizado. Página 33.

Figura 8. Hiperplasia epitelial. Página 33.

Figura 9. Ulcera, con presencia de importante infiltrado inflamatorio agudo y tejido de granulación. Página 33.

Figura 10. Formación de cartílago. Página 34.

Figura 11. Metaplasia ósea. Página 34.

Figura 12. Ausencia de cartílago. Página 35.

Figura 13. Tejido de granulación. Página 35.

Figura 14. Inmunohistoquímica de vasos sanguíneos. Neoformación. Página 36.

Figura 15. Colágeno inmaduro. Página 37.

Figura 16. Reacción a cuerpo extraño. Página 37.

Tabla 1. Características histológicas y de inmunohistoquímica del grupo A y grupo B. Página 38.

## GLOSARIO

**Herida** : Traumatismo de cualquiera de los tejidos del cuerpo, en especial el causado por medio físicos y con interrupción de su continuidad.

**Cierre primario** : Se produce cuando la herida se cierra dentro de las primeras horas tras su creación. Los bordes de la herida son aproximados directamente.

**Cierre secundario** : El cierre secundario de una herida de espesor total se produce por contracción y epitelización. La herida disminuye de tamaño por la contracción producida por los miofibroblastos.

**Cierre primario retardado o terciario** : Los bordes de la herida son aproximados varios días después del traumatismo, una vez solventado el riesgo de infección de la herida.

**Cicatrización** : Proceso reparativo complejo que conduce a la regeneración del epitelio y el reemplazo de la dermis por un tejido fibroso constituido por colágeno con características diferentes al normal.

**Cicatrización patológica** : Incluyen las calcificadas; las que tras continuos intentos de cicatrización con solo epitelio degeneran en carcinoma epidermoide (úlceras de Marjolin); las hipertróficas y las queloideas.

**Cicatriz hipertrófica** : Cicatriz elevada, eritematosa y que puede originar prurito o dolor. Está limitada a la zona original del trauma.

**Cicatriz queloide** : Cicatriz elevada, eritematosa y pruriginosa, pero que se extiende a la piel sana mas allá de la zona del trauma.

**Cámara hiperbárica** : es un recipiente construido de placa acero generalmente de forma cilíndrica, con cierre hermético adaptado para resistir en su interior el aumento controlado de presión y descompresión (con aire) en el que se encuentra introducido el paciente.

**Terapia con oxígeno hiperbárico** : Se define al tratamiento en el que oxígeno al 100% se administra al paciente a una relación dos veces mayor a la presión atmosférica normal al nivel del mar.

## BIBLIOGRAFIA

1. Singer AJ, Clark RA, Mechanisms of Disease : Cutaneous Wound Healing. NEJM 1999, 341 (10) : 738-746.
2. Diegelmann RF, Cellular and Biochemical Aspects of Normal and Abnormal Wound Healing : An Overview. J Urol 1997; 157 (1) : 298-302.
3. Elias PM, Ansel JC, Woods LDC, Feingold KR, Signaling Networks in Barrier Homeostasis : The Mystery Widens. Arch Dermatol 1996; 132(12) : 1505-1506.
4. Greenhalgh DG, Signaling Networks in Barrier Homeostasis : The Mystery Widens. J Trauma 1996; 41 (1) : 159-167.
5. Leach RM, Rees PJ, Wilmshurts P, ABC of Oxygen : Hyperbaric oxygen therapy. BMJ 1998; 317 (7166) : 1140-1143.
6. Sheridan RL, Shank ES, Hyperbaric Oxygen Treatment : A Brief Overview of a Controversial Topic. J Trauma 1999; 47 (2): 426-435.
7. Rumalla VK, Borah GL, Cytokines, growth factors and plastic surgery. Plast Reconstr Surg 2001; 108 : 719-733.
8. Chin GS, Liu W, Peled Z, Lee TY, Steinbrech DS, Hsu M, Longaker MT. Differential expression of transforming growth factor –B receptors I and II and activation of smad 3 in keloid fibroblasts. Plast Reconstr Surg 2001; 108 : 423-429.
9. Mueller RV, Hunt TK, Tokunaga A, Spencer M. The effect of insulinlike growth factor I on wound healing variables and macrophages in rats. Arch Surg 1994; 129 : 262-265.

10. Babu M, Diegelmann R, Oliver N. Keloid fibroblasts exhibit an altered response to TGF-B. *J Invest Dermatol* 1999; 99: 650-655.
11. Restdorf P, Lawrence DA, Sivan V, Martin M. Alteration of transforming growth factor B1 response involves down regulation of smad3 signaling in myofibroblasts form skin fibrosis. *Am J Pahtol* 2001; 159(1): 263-272.
12. Shah Mamta, Revis D, Herrick S, Thorgeirson S, Ferguson M, Roberts A. Role of elevated plasma transforming growth factor B1 levels in wound healing. *Am J Pahtol* 1999; 154 (4) : 1115-1124.
13. Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen K. The effect of TGF-B on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Recostr Surg* 1996; 98: 827-833.
14. Nakajima H, Kishi T, Tsuchiya Y, Yamada H, Tajima S. Exposure of fibroblasts derived form keloid patients to low energy electromagnetic fields : preferential inhibition of cell proliferation, collagen síntesis and transforming growth factor beta expresión in keloid fibroblasts in Vitro. *Ann Plast Surg* 1997; 39: 536-541.
15. Younai S, Nichter LS, Wellisz T, Reinisch J, Nimni ME, Tuan TL. Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor B in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. *Ann Plast Surg* 1994; 33: 148-154.
16. Bonomo SR, Davidson JD, Tyrone JW, Lin X, Mustoe TA. Enhancement of wound healing by hyperbaric oxygen and transforming growth factor B3 in a new chronic wound model in aged rabbits. *Arch Surg.* 2000; 135: 1148-1153.

17. Bruce A, Dennis B, Lewis J. Molecular Biology of the Cell. 3a. Edicion. España. Ediciones Omega ; 2002.
18. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7a. Edición. España. Elseiver ; 2005.