



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

6
29

“ANALISIS DE LA EVOLUCION DE HERIDAS
QUIRURGICAS EN PIEL DE RATAS DIABETICAS
TRATADAS CON POLIETILENGLICOL (PEG).”

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

TATIANA SANDOVAL GUZMAN

262167

DIRECTOR DE TESIS: DR. LINO DIAZ DE LEON HERNANDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

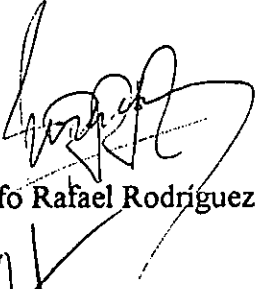
Mayo 14, 1998.

DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA
DIRECTOR
FACULTAD DE MEDICINA
P R E S E N T E .

Por medio de la presente le informo que la tesis "Análisis de la evolución de heridas quirúrgicas en piel de ratas diabéticas tratadas con Polietilenglicol (PEG)", que presenta la alumna TATIANA SANDOVAL GUZMAN con número de cta. 9455633-7, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.


Atentamente,


Dr. Rolando Hernández Muñoz


Dr. Rodolfo Rafael Rodríguez Jurado


Dr. Lino Díaz de León Hernández


Dra. Cristina Fernández Mejía


Dra. Martha Pérez Armendariz

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Fundación UNAM por el apoyo económico prestado durante la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Cristina Fernández Mejía, Dra. Martha Pérez Armendáriz, Dr. Rolando Hernández Muñoz, Dr. Rodolfo Rodríguez Jurado y Dr. Lino Díaz de León Hernández, miembros del jurado, por sus comentarios y sugerencias para mejoramiento de esta tesis.

A Marco H., Clelia D., Emiliano, Alfonso A., Alejandro A., Mariana M., Saúl C., Simona U., Sergio R., Miguel S., David G., Jesús y Guille C., Edgar y Janette K., Juan C., Montse O., Ricardo R., Eréndira V. y Oli S.

Al Dr. Sergio Sánchez y Dr. Rafael Saavedra por ser parte muy importante en mi formación.

A la Dra. Elba Rosa y Dr. Miguel Morales por prestarnos equipo necesario en el trabajo experimental.

A Isabel R., y Blanca H.

A la Universidad.

Por supuesto a mi Madre, que gracias a su fuerza estoy aquí, y a mi hermano Jaime.

*Para Ernesto,
por la dirección, paciencia, tiempo
y amor que le dió a esta tesis
(por no mencionar lo que me enseñaste de la vida).*

"Podrá ser un sueño, mas quien piensa resueltamente por encima de lo existente y lo preexistente, por lo menos se procura una libertad personal frente a nuestra época insensata".

Stefan Zweig. 1932.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio del Dr. Lino Díaz de León Hernández del Departamento de Biología Celular, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, bajo la dirección del Dr. Lino Díaz de León y del M. en C. Ernesto Guerrero Padilla.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
LA PIEL.....	2
Dermis	
Apéndices	
CICATRIZACIÓN.....	3
Inflamación	
Células Inflamatorias	
Epitelización	
Tejido de Granulación	
Fibroplasia	
Angiogénesis	
Remodelación	
Matriz provisional	
Fibrina	
Fibronectina	
Ácido Hialurónico	
Proteoglicanos	
Colágena	
DIABETES MELLITUS.....	11
Insulina	
Microangiopatía	
Retinopatía	
Neuropatía	
Aterosclerosis	
Cetoacidosis	
Glicosilación no Enzimática	
Coagulación	
ANTECEDENTES.....	17
DIABETES Y CICATRIZACIÓN.....	17
POLIETILENGLICOL.....	19
ESTREPTOZOTOCINA.....	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
MATERIALES.....	21
MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	40
PERSPECTIVAS.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN Ácido desoxirribunucleico
AGE productos finales de glicosilación
ATP adenosíntrifosfato
Col I colágena tipo I
Col III colágena tipo III
Ctrl control
DABCO 1,4-Diazabicyclo[2.2.2] octano
DMSO dimetilsulfóxido
E experimental
EDRF factor relajante derivado de endotelio
EGF factor de crecimiento endotelial
FGF factor de crecimiento fibroblástico
FN fibronectina
GAG glicosaminoglicano
IL interleucinas
KGF factor de crecimiento de queratinocitos
MMP metaloproteinasas
NADH nicotín adenín dinucleótido
PA proteinasas
PBS solución amortiguadora de fosfatos
PD-ECGF factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas
PDGF factor derivado de plaquetas
PEG polietilenglicol
T testigo
TGF- β factor de crecimiento transformante beta
TIMP inhibidores de metaloproteasas tisulares
TNF- α factor de necrosis tumoral alfa
VEGF factor de crecimiento endotelial vascular

ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE HERIDAS QUIRÚRGICAS EN PIEL DE RATAS DIABÉTICAS TRATADAS CON POLIETILENGLICOL (PEG).

Tatiana Sandoval Guzmán.

La cicatrización es una secuencia de eventos que se desencadena como respuesta a un daño o lesión tisular y que comprende factores humorales y respuestas celulares que llevan a la reparación del tejido lesionado. Estos eventos pueden verse alterados en algunas ocasiones por la presencia de cuerpos extraños, por infecciones o por problemas vasculares. En algunas patologías como es el caso de la *Diabetes mellitus*, la cicatrización constituye un problema de importancia ya que el porcentaje de infección en cualquier tipo de lesiones y heridas es alto en particular en intervenciones quirúrgicas. Aún después de controlada la infección, las úlceras y las heridas cicatrizan con mucha dificultad, lo que indica que el proceso de la cicatrización en diabéticos es deficiente. Por lo anterior, la cicatrización en piel de pacientes diabéticos es un proceso que requiere de estudios más completos, para comprenderlo mejor y aportar luz a este tipo de complicaciones; es de importancia, considerando que por lo menos el 60% de los pacientes con *Diabetes mellitus* requerirán una cirugía.

Se ha observado que en ratas normales la aplicación de una solución Polietilenglicol-Dimetilsulfóxido (PEG/DMSO) acelera el proceso cicatrizal de piel, además de aumentar la resistencia de la herida cuando se aplica una fuerza de tensión. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue valorar los efectos del PEG en animales diabéticos a diferentes tiempos de su aplicación en heridas quirúrgicas.

Para lograr este objetivo se indujo la diabetes en ratas machos de la cepa Wistar con estreptozotocina a una dosis intraperitoneal de 60mg/Kg. de peso y una vez establecida la diabetes (400 mg de glucosa en 100 ml de sangre), se les

practicaron dos incisiones de tipo quirúrgico en línea en la región dorsal. Antes de suturar, se les aplicaron a las heridas experimentales la solución PEG/DMSO de manera tópica. Se tomaron muestras de las heridas a los diferentes días y se realizó el análisis histológico en grupos de 5 ratas. Las tinciones que se utilizaron fueron la tricrómica de Mason y la tinción de Herovici.

Los resultados nos muestran que en general el tiempo de cicatrización de las heridas experimentales se realizó en menor tiempo comparándolas con las heridas testigo. Se observó que a los 14 días en la herida experimental la epidermis se manifiesta con aspecto normal y la dermis presenta una estructuración de colágena más homogénea y con escaso infiltrado celular; mientras que en la herida testigo se observa un retraso considerable en el proceso cicatrizal. Posteriormente se hicieron estudios inmunohistoquímicos para evaluar la presencia de proteínas importantes dentro del proceso cicatrizal como lo son la fibronectina, la colágena tipo I y la colágena tipo III. Se observó que en general la maduración de la herida es más rápida en las heridas experimentales. El último parámetro de evaluación fue medir la resistencia de las heridas al aplicárseles una fuerza de tensión; se observó que las heridas experimentales son más resistentes que las heridas testigo. Estos resultados nos sugieren que la solución PEG/DMSO influye en la cicatrización acelerando el proceso y nos llevan a considerar estudios moleculares para intentar dilucidar su mecanismo de acción, tales como la presencia de factores de crecimiento y receptores que participan en la cicatrización.

INTRODUCCIÓN

LA PIEL

La piel es un órgano que cubre más de 19.3 metros cuadrados de área de superficie de un adulto; pesa alrededor de 2.7 Kg y recibe casi una tercera parte de toda la sangre circulante. La piel es elástica, casi impermeable, proporciona una barrera térmica ampliamente regulada y eficaz, participa en funciones de evaporación del agua y regulación de la temperatura del cuerpo, es el límite de nuestra individualidad (Arenas et al., 1990).

EPIDERMIS.- La primera capa de la piel, la más externa, es la epidermis; está compuesta de células epiteliales escamosas estratificadas. El tipo celular más abundante son los queratinocitos (Eckert et al., 1992). La epidermis es más gruesa a medida que circunda las palmas de las manos y las plantas de los pies, y se hace más delgada en la cara ventral del tronco. Se compone de cinco capas, de la más externa a la más interna son los estratos córneo, lúcido, granuloso, espinoso y germinativo (Lever et al., 1990).

El estrato córneo, la capa más externa de la epidermis consta de células muertas en forma de escamas, altamente ordenadas. El componente con una mayor abundancia es la queratina. Como constantemente se están desprendiendo, necesitan ser renovadas. Sirven de barrera física para las ondas de luz y de calor, microorganismos y la mayor parte de las sustancias químicas.

El estrato lúcido está inmediatamente abajo del estrato córneo y es una capa que consta de una a cinco células de espesor, son células aplanadas y transparentes, quiescentes, que por lo general han perdido sus núcleos.

El estrato granuloso consta de cinco a diez capas de células aplanadas. Los gránulos que dan nombre a este estrato, se

acumulan en las células y participan activamente en la queratinización de las células, proceso en el cual pierden sus núcleos y se hacen más compactas. Existe evidencia de que estas células están vivas, ya que mantienen su metabolismo celular intacto.

El estrato espinoso está compuesto de células con forma poligonal. Las células espinosas más externas tienen forma de espina, y de ahí su nombre.

El estrato germinativo es la capa más profunda y más importante de la epidermis, ya que son las únicas células de esta capa que tienen capacidad de dividirse. Las células que son formadas en este estrato, sufren cambios morfológicos y nucleares a medida que se mueven hacia la capa más superficial. La epidermis se regenerará sólo mientras el estrato germinativo permanezca intacto. Inmediatamente después de la última capa de células, se encuentra la membrana basal, que ofrece sostén y mayor protección contra el medio ambiente; está compuesta por células basales y tejido conjuntivo. La melanina, pigmento principal de la piel, se forma en células llamadas melanocitos. Una variación en el contenido de melanina es el principal factor que explica las diferencias de color entre las razas.

DERMIS.- La segunda capa de la piel es la dermis o corion y se compone principalmente de tejido conjuntivo siendo responsable de la fuerza estructural de la piel. La acción de los principales componentes de su matriz extracelular se encuentra en la Tabla I. Vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos, folículos pilosos y glándulas sudoríparas, constituyen los anexos cutáneos. Los principales tipos celulares de la dermis son los fibroblastos, macrófagos y células cebadas, además de otros tipos celulares que pueblan la dermis en respuesta a un daño u otro estímulo (Eckert et al., 1992). La dermis se divide en dos partes, una lámina papilar y una lámina

reticular. La lámina papilar se encuentra justo abajo de la lámina basal, esto es, justo abajo de la epidermis. Su principal tipo celular son los fibroblastos, que contienen una gran capacidad de síntesis y proliferación; siendo el principal producto de esta síntesis la colágena tipo III. La lámina reticular se encuentra adyacente a la lámina papilar, con presencia de colágena tipo I y otras fibras que proveen elasticidad a la dermis. Una lámina de tejido adiposo subcutáneo une la dermis con sus estructuras subyacentes y es llamada la hipodermis (Stern et al., 1983).

APÉNDICES.- Los apéndices que acompañan a la piel son: pelo, uñas, glándulas sebáceas y sudoríparas.

El pelo consta de una cutícula externa, de una corteza central y médula interna. La porción visible es el tallo y la

raíz está en la base. El crecimiento del pelo es por división de las células de la matriz en la base del folículo piloso. Las células hijas se mueven hacia arriba y se queratinizan. Las uñas están formadas por queratina dura, una modificación de las células epidérmicas corneales. Las glándulas sebáceas se encuentran generalmente en los folículos pilosos y su secreción consta de sustancias oleosas y partículas de células desintegradas. Las glándulas sudoríparas pueden abrirse directamente en la superficie de la piel o en el interior de los folículos pilosos. Las primeras secretan un líquido fino que contiene los mismos componentes de la sangre pero en menor concentración, y se secretan en respuesta a una elevación de la temperatura; las segundas secretan un líquido viscoso y oloroso en respuesta a estímulos emocionales.

TABLA I. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SU FUNCIÓN.

COMPONENTE	ESTRUCTURA	FUNCIÓN
COLÁGENA	Triple hélice, glicoproteína molecular rica en prolina, hidroxiprolina y glicina	Resistencia, soporte y estructura para todos los tejidos y órganos.
ELASTINA	Proteína hidrofóbica elástica que interacciona con microfibrillas glicosiladas	Permite que estructuras y tejidos se expandan y contraigan.
FIBRONECTINA	Glicoproteína adhesiva especializada	Regula adhesión de célula-matriz.
LAMININA	Glicoproteína de adhesión, larga y compleja	Une células con colágena tipo IV y heparansulfato.
PROTEOGLICANOS	Heterogéneos, cadenas de glicosaminoglicanos unidas covalentemente a una proteína central.	Guardan humedad, secuestran citocinas.
ÁCIDO HIALURÓNICO	Glicosaminoglicano no sulfatado de gran tamaño y especializado	Provee un ambiente fluido para el movimiento y diferenciación celular, además de unir citocinas.

CICATRIZACIÓN

La reparación del daño es una cualidad fundamental del tejido vivo. La cicatrización es una secuencia de eventos interactivos y dinámicos que se desencadenan como respuesta a un daño o lesión tisular y que comprende factores humorales y respuestas celulares que llevan a la reparación del tejido lesionado. El proceso cicatrizal generalmente se acompaña de la substitución con tejido conjuntivo del área

dañada, en ausencia de regeneración en tejidos adultos. La cicatrización se ha dividido en tres grandes fases: Inflamación, formación de tejido y finalmente la remodelación. Las tres fases no son mutuamente excluyentes, sino que se superponen en el tiempo a pesar de seguir una cronología (Cohen et al., 1994).

En cuanto a la fisiopatología de la cicatrización, el proceso puede tener una formación insuficiente de tejido conjuntivo o una destrucción excesiva de la cicatriz o

una combinación de los dos. Las úlceras son heridas con deficiente cicatrización y son de tipo vasculares, neuropáticas o multifactoriales. El caso contrario son las cicatrices queloides en

donde el depósito de tejido conjuntivo es exagerado y la cicatriz toma tamaños desproporcionados comparados con la gravedad de la lesión, continúa creciendo durante periodos prolongados y no son reversibles en situaciones sin tratamiento. (Pérez-Tamayo, 1987).

Otros factores que son determinantes en la cicatrización, son padecimientos del tejido conjuntivo, diabetes mellitus, cualquier tipo de vasculitis, aterosclerosis, deficiencias en proteínas o vitaminas, hiperbilirrubinemia, anemia ferropénica, infecciones generalizadas y la edad (Hatz et al., 1994).

INFLAMACIÓN.- Las primeras reacciones del organismo a la separación de tejidos normalmente asociados, apertura de la barrera cutánea y daño a los vasos sanguíneos, son la vasoconstricción, adhesión de las células y coagulación. El contacto de factores circulantes de los vasos con las moléculas de los tejidos afectados es el punto de partida para que se desencadene el proceso cicatrizal. Estos factores son las calicreínas plasminógeno, proteínas de complemento y el factor de Hageman (Boretal et al., 1992), que actúan como proteasas en reacciones sucesivas de la cascada de activación. Una vez activadas las plaquetas se secretan proteínas de adhesión como fibrinógeno, trombospondina, fibronectina y factor VIII de von Willebrand, de los cuáles los tres primeros participan en la agregación plaquetaria, mientras que el factor VIII de von Willebrand participa en la adhesión de plaquetas a componentes de matriz extracelular principalmente colágena (Clark

et al., 1996), adhesión regulada por integrinas. Además de funcionar como tapón, las plaquetas tienen una función secretoria, en la cuál se presentan una serie de mediadores, incluyendo factores de crecimiento, que activarán y reclutarán células participantes del proceso cicatrizal. Los efectos de las plaquetas en la cicatrización se encuentran resumidos en la Tabla II. De las citocinas secretadas por estas células se encuentran el PDGF, TGF β , EGF y TGF α , cuyo efecto se resume en la Tabla III (Lydyard et al., 1993; Pierce et al., 1991).

Paralelo a este proceso se lleva a cabo la producción de fibrina, que forma una malla provisional con una doble función: sirve de nicho para la adhesión y agregación de plaquetas, y sirve de sostén para las células migratorias como fibroblastos y células de inflamación, lo que permite llenar la discontinuidad del tejido. Esta matriz provisional, además de fibrina, contiene dos proteínas más: fibronectina y colágena, pero en mucho menor cantidad. La fibrina es producto del fibrinógeno que es lisado por la trombina, la fibrina se polimeriza estabilizada por el factor XIII activado, formando así la malla (Greiling et al., 1997).

Es necesario mantener el equilibrio de la coagulación dentro de una escala fisiológica, por lo que el endotelio produce factores reguladores como la prostaciclina que inhibe la agregación plaquetaria, la proteína C que inactiva factores de coagulación y plasminógeno T que activa la fibrinolisis (Eckersley et al., 1988).

Tabla II. PLAQUETAS EN LA CICATRIZACIÓN

ACTIVIDAD	EFEECTO
ADHESIÓN	Obstruye pequeñas aberturas en vasos.
AGREGACIÓN	Obstruye grandes aberturas en vasos. Induce coagulación.
SECRECIÓN DE	Vasoconstricción, agregación plaquetaria,
MEDIADORES	secreción de factores de crecimiento.

CÉLULAS INFLAMATORIAS.- Las primeras células inflamatorias arriban a la herida en las primeras horas después del daño. Los quimioatrayentes responsables de dicha aparición incluyen fibrinopéptidos (productos de degradación de la fibrina), elementos de la cascada de complemento como C5a1 y C3a, proteínas bacterianas de membrana, leucotrieno B4 y PDGF. En la primera fase de la inflamación conocida como fase temprana, la herida recibe células granulocíticas polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), principalmente neutrófilos (Lydyard et al., 1993), que se adhieren al endotelio de los vasos, además secretan gránulos que contienen enzimas proteolíticas como elastasa, hidrolasas ácidas, 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 (Davidson et al., 1996). La permanencia de este tipo celular depende del daño en el tejido y de la presencia o no de infección (Janeway et al., 1993).

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

TGF- β (Riches et al., 1996). Una vez que el monocito llegó a la zona de daño y se activa, recibe el nombre de macrófago. Los macrófagos refuerzan la limpieza que comenzaron los polimorfonucleares, son capaces de fagocitar y digerir materia extraña, además de secretar enzimas proteolíticas como colagenasas que facilitan la limpieza (Portera et al., 1997). Los macrófagos se adhieren a componentes de matriz extracelular, la adherencia induce la expresión del factor 1 estimulante de colonias (necesario para la sobrevivencia del macrófago), TNF- α , PDGF; otras citocinas son también sintetizadas pero su expresión es independiente de la adhesión, éstas son el TGF- β , IL-1, IGF-1 y FGF (Haslett et al., 1996).

Toda esta gama de factores son necesarios para que inicie la formación de tejido nuevo. Una breve descripción de los efectos de estos mediadores se encuentra en la Tabla III (Bennett et al., 1993; Schultz et al., 1991). Los macrófagos permanecen en la herida varias semanas, lo cual indica que están presentes en las tres fases de la cicatrización: Inflamación, Epitelización y formación del tejido de granulación y la fase final remodeladora, siendo los macrófagos el puente entre ellas.

Tabla III. CITOCINAS QUE PARTICIPAN EN LA CICATRIZACIÓN

CITOCINA	FUENTE	FUNCIÓN
PDGF	Plaquetas, macrófagos células endoteliales y de músculo liso.	Proliferación de fibroblastos, quimiotaxis, metabolismo de colágena, quimiotaxis y activación de neutrófilos, macrófagos y angiogénesis
FGF	Cerebro, pituitaria, macrófagos y otras células	Mitógeno de tejido neural y mesenquimático, estimula depósito de matriz, contracción de la herida y angiogénesis.
TGF- β	Plaquetas, neutrófilos, macrófagos y otras células	Inhibe la replicación de la mayoría de células in vitro. Puede inhibir o estimular fibroblastos.
TGF- α	Macrófagos, plaquetas, queratinocitos y otros tejidos.	Mitogénico para tejidos epiteliales, células endoteliales y fibroblastos
EGF	En casi todos los fluidos del cuerpo y plaquetas.	Similar al TGF- α .

IGF	Casi todos los tejidos, fibroblastos y macrófagos.	Estimula síntesis de proteoglicanos, colágena; mitógeno de fibroblastos.
KGF	Fibroblastos.	Proliferación de células epiteliales.
VGEF		Permeabilidad vascular, angiogénesis.
IL-1	Macrófagos, linfocitos y otras células.	Proliferación de fibroblastos. Colagenasa, quimiotaxis a neutrófilos.
T	Macrófagos, linfocitos T y células cebadas.	Proliferación de fibroblastos
IFN- γ	Linfocitos y fibroblastos.	Inhiben la proliferación de fibroblastos y síntesis de colágena.
HBEGF	Macrófagos.	Mitogénico para queratinocitos y fibroblastos.

EPITELIZACIÓN.- La epitelización es un proceso que indica el recubrimiento de la herida con un nuevo epitelio. La epitelización comienza después de las primeras 12 horas 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 (Woodly et al., 1996). Los queratinocitos además de su capacidad de movimiento, pueden sintetizar fibronectina (O'Keefe et al., 1985), pudiendo así producir su lámina basal provisional, que durante la migración celular se transforma en lámina basal por la producción de colágena tipo IV y laminina. Esta lámina basal provisional contiene además fibronectina, colágenas tipo V y I y fibrina.

Las tres principales fases de la epitelización son : migración de células por la matriz provisional, mitosis y maduración de las células recién generadas (Hatz et al., 1994).

En el daño epitelial las células pierden contacto entre sí mismas, se pierden los desmosomas (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, HBEGF, FGF y TGF- β (Hatz et al., 1994).

El paso final de la epitelización es la maduración de la epidermis, en donde se da lugar a la diferenciación de células que

dirigen funciones sensoriales, de pigmentación y barrera inmune.

TEJIDO DE GRANULACIÓN.- 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. La llegada de estas células es a partir del cuarto día, y nuevamente son tres los factores principales que intervienen para que se forme el tejido de granulación: las citocinas, con actividades mitogénicas, quimioatrayentes y reguladoras, el nivel de actividad de las células blanco y la matriz extracelular presente.

Los macrófagos, fibroblastos y vasos sanguíneos, migran juntos hacia la herida. Los macrófagos proveen de citocinas necesarias para estimular la formación de la nueva matriz extracelular (fibroplasia) y angiogénesis; los fibroblastos sintetizan los componentes de esa nueva matriz y los vasos sanguíneos proveen el oxígeno y nutrientes necesarios para que las células lleven a cabo esta fase de la cicatrización.

FIBROPLASIA.- La fibroplasia es una mezcla de fibroblastos y matriz extracelular. El proceso comienza con la matriz provisional, que sirve de guía (vía integrinas) y de reserva de citocinas para los fibroblastos. Aquí se lleva a cabo un efecto interesante entre la matriz extracelular y los fibroblastos: los fibroblastos la modifican con la síntesis y depósito de componentes de matriz extracelular, mientras que la matriz afecta a los fibroblastos regulando su

función incluyendo su habilidad para sintetizar y depositar componentes de matriz extracelular (Bissel et al., 1987). 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, pero la matriz extracelular altera la regulación que ejerce este factor de crecimiento. Cuando los fibroblastos se encuentran en una matriz rica en fibronectina o fibrina, PDGF estimula la expresión de receptores para estos ligandos, mientras que si se encuentran los fibroblastos en una matriz rica en colágena, aumenta el número de receptores a colágena. Los fibroblastos responden al PDGF dependiendo de la matriz extracelular en la que se encuentren.

Una vez instalados los fibroblastos en la herida, gradualmente aumenta su síntesis de proteínas: fibronectina y colágenas tipo I y tipo III. Los factores de crecimiento responsables de inducir este proceso son TGF- β y en menor cantidad la IL-4, producida por las células cebadas de la herida. Cuando ya se ha depositado suficiente colágena en la herida, los fibroblastos cesan su producción a pesar de que siga una alta expresión de TGF- β , lo cual indica que debe existir un factor que regule a la baja la síntesis de proteínas de matriz extracelular en los fibroblastos, éste es el INF- γ (Granstein et al., 1987), además de existir inhibición por la misma matriz de colágena, lo que no sucede con la fibrina ni la fibronectina.

En situaciones normales, los fibroblastos presentan un núcleo picnótico a partir del décimo día de cicatrización, signo de apoptosis o muerte celular programada, lo que convierte a la herida en una cicatriz pobre en células. A pesar de que la fibroplasia es altamente regulada, existen alteraciones en este proceso que ocasionan la formación de cicatrices queloides y escleroderma entre otros trastornos.

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 la adecuada matriz extracelular, los nuevos vasos no podrían formarse. Las células endoteliales que están cerca del 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 suficiente para la angiogénesis. Para que se de una apropiada formación de vasos sanguíneos, es necesario que exista una adecuada matriz extracelular, así como determinadas citocinas para la migración y proliferación de las células endoteliales. Los factores hasta ahora encontrados para realizar dicha tarea son: FGFa y FGFb principalmente, pero también participan TGF- β , TNF- α , PD-ECGF, VEGF, IL-8, PDGF y ácido láctico (Vlodavsky et al., 1987).

Se ha demostrado que la fibronectina estimula la proliferación de células endoteliales y que el PDGF tiene capacidad de ser tanto quimioatrayente como mitógeno para este tipo celular.

La angiogénesis se desencadena a partir del daño tisular, la destrucción celular, las enzimas proteolíticas presentes degradan las proteínas de matriz extracelular dañadas, incluyendo fibronectina, los fragmentos de fibronectina y otros productos de degradación atraen células inflamatorias que en respuesta secretan FGF; esto origina una síntesis de activador del plasminógeno y procolagenasa para activar la colagenasa. Los componentes de la membrana basal son degradados permitiendo así que las células endoteliales migren sobre una matriz rica en fibrina y fibronectina. A partir de este momento se empiezan a formar tubos en donde se expresan integrinas del tipo $\alpha\beta_3$ que facilitan la adhesión y migración del nuevo vaso sanguíneo. La matriz provisional de esta neovasculatura

finalmente desaparece para quedar la verdadera membrana basal. Los nuevos vasos sanguíneos, sin embargo, sufren una involución en la última fase de la cicatrización, mediada por apoptosis de células endoteliales y por pérdida de interacciones con la matriz extracelular mediada por integrinas, mecanismos que muy posiblemente estén relacionados con la acción de proteinasas como PAu, MMPs y TIMPSs (Madri et al., 1996).

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. Comienza mientras aún está el tejido de granulación invadiendo 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 para restablecer la barrera de permeabilidad. Las células endoteliales son las primeras que presentan apoptosis, después los miofibroblastos. Los cambios en la matriz extracelular se presentan aún meses después de empezar la cicatrización.

Primeramente, la matriz extracelular se deposita al lado del tejido de granulación mientras éste se desarrolla; después va tomando posiciones centrales al momento de que el tejido de granulación crece dentro de la herida. La composición y estructura de la matriz extracelular depende del tiempo del que dista una vez hecho el 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.

MATRIZ PROVISIONAL.- Una matriz provisional es cualquier matriz extracelular que esté sólo temporalmente presente o que tenga alguna función provisional; el mejor ejemplo es el tapón de fibrina que se forma durante la coagulación.

FIBRINA.- La primera matriz extracelular en depositarse en la herida está principalmente compuesta de fibrina, con cantidades menores de fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand, factores de crecimiento y trombospondina. Estos componentes juntos son los que se conocen como matriz provisional. La fibrina, como ya se ha mencionado, se deriva del fibrinógeno, que es una proteína formada por tres pares de cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro. La fibrina se forma cuando la trombina corta los fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno, con lo cual se generan sitios amino terminales que interaccionan con los sitios carboxi-terminal de cadenas adyacentes de fibrinógeno. Como resultado, se forman fibras que devienen en una malla que es capaz de unir factores de crecimiento y otros tipos de citocinas que una vez degradada la malla, se destruyen o se desprenden en forma activada. También se sabe que la matriz de fibrina, además de ser un sostén de células, es potencialmente participativa en la expresión de genes en los fibroblastos. La fibrina incrementa la habilidad del PFGF para inducir la expresión de integrinas. Es claro que la matriz de fibrina facilita la formación del tejido de granulación, y una vez formado este, la matriz de fibrina comienza a ser lisada por las proteasas presentes en el tejido de granulación, al tiempo que los fibroblastos depositan mayor cantidad de fibronectina.

FIBRONECTINA.- La fibronectina es una proteína de adhesión multifuncional, se

encuentra en sangre y en la mayoría de los tejidos. Sus dominios funcionales específicos y sitios de unión a células le permiten interactuar con un número considerable de tipos celulares, otras proteínas de matriz extracelular y citocinas. Está compuesta por dos cadenas similares unidas por enlaces disulfuro, es secretada por más de un tipo celular y es capaz de opsonizar restos de moléculas inservibles para facilitar la limpieza de la herida a los macrófagos, además, es fundamental para el depósito de colágena y de base para la angiogénesis (Greiling et al., 1997). Como fue mencionado anteriormente, la matriz de fibrina, contiene fibronectina, que también se fragmenta al momento en que el tejido de granulación invade la herida; estos fragmentos ocasionan una retroalimentación positiva para enzimas digestivas de esa matriz (Grinnell et al., 1981); pero una vez que se ha digerido ésta, la fibronectina es nuevamente sintetizada por las nuevas células que llegan a la herida, ahora en mayor cantidad en comparación con su concentración en la matriz de fibrina. La participación de la fibronectina en la cicatrización se señala en la Tabla IV (Calvin et al., 1989).

ÁCIDO HIALURÓNICO.- Pertenece a los llamados glicosaminoglicanos (GAGs), que son polisacáridos compuestos por hexosamina alternada con azúcares ácidos, ya sea ácido urónico o galactosa sulfatada. El ácido hialurónico es el GAG más sencillo que se conoce, está compuesto por glicosaminos alternados con ácido glucorónico. Su cadena es altamente hidratada y ocupa una gran cantidad de espacio extracelular, ofreciendo viscosidad a los tejidos y fluidos (Gallo et al., 1996). Las células se pueden unir al ácido hialurónico por medio de varios mecanismos, incluyendo receptores como CD44 (receptor ampliamente difundido en las células). Es el mayor componente del tejido de granulación primario y desaparece del día

quinto al décimo por la acción de la hialuronidasa, lo que no ocurre en la cicatrización fetal, siendo un mecanismo que pudiera explicar la ausencia de cicatrices en los fetos. El principal productor de ácido hialurónico en la cicatrización son los fibroblastos y es una molécula que se puede sintetizar y secretar fácilmente por las células, es muy útil para rellenar espacios por su capacidad de hidratarse, es un excelente lubricante.

Tabla IV. FIBRONECTINA EN LA CICATRIZACIÓN

CÉLULAS	FUNCIÓN
Fibroblastos	Base para la migración, quimiotaxis. Unión para la contracción de la matriz, base para el depósito de colágena.
Epitelio	Base para la migración, efecto en la función.
Endotelio	Base para la migración, quimiotaxis.
Macrófagos	Base para la migración, quimiotaxis opsonización, agregación, estímulo para producción de factores de crecimiento.
Neutrófilos	Opsonización de bacterias.
Neuronas	Haptotaxis.
Células de Parénquima	Inhibe diferenciación.

El ácido hialurónico es necesario para el movimiento celular del tejido de granulación, facilita la adhesión y desprendimiento entre la membrana celular y la matriz extracelular durante el movimiento celular; al estar altamente hidratado, el espacio intersticial se expande, permitiendo así, que existan áreas grandes de reclutamiento celular y moléculas de cicatrización. Los fibroblastos depositan primeramente una matriz rica en fibronectina y ácido hialurónico que va a funcionar como un conducto para la migración celular y proliferación y luego deposita una matriz rica en colágena y proteoglicanos que incrementa la fuerza y resistencia de la herida.

PROTEOGLICANOS.- Los proteoglicanos son proteínas que tienen al menos una cadena unida de glicosaminoglicanos. Las

proteínas que sirven de núcleo a estas moléculas son diversas, pero todas tienen la capacidad de unirse a las cadenas de GAGs. Los proteoglicanos pueden llegar a unirse a moléculas de ácido hialurónico, lo que les da versatilidad y les permite tener diversas estructuras y funciones en los tejidos. Se les puede encontrar en gránulos secretorios, en la superficie celular y en la matriz extracelular; sus principales funciones comprenden organización extracelular, almacenaje de factores de crecimiento, promoción de la unión de factores con sus receptores y regulación de la coagulación.

Su actividad en la coagulación es en las membranas de las células cebadas, donde pueden unirse con antitrombina III y el factor Xa funcionando como anticoagulante.

Sus funciones estructurales no están enteramente establecidas, pero se tiene evidencia *in vitro* de que un tipo de proteoglicano, 4-sulfatocondroitina, acelera la polimerización de la colágena y facilita su depósito en la matriz extracelular.

Los proteoglicanos pueden regular funciones celulares opuestas, promueven la migración celular desprendiendo a las células de la matriz; otros por el contrario promueven la adhesión de las células; pueden inclusive inhibir la proliferación celular y pueden también inducirla indirectamente, por ejemplo, el FGF para unirse a su receptor debe estar primero unido a un proteoglicano. Otros factores que se unen a proteoglicanos son PDGF, IL-3, TGF β -1 y VEGF.

Debido a la gran diversidad de estructura y función que presentan los proteoglicanos, su presencia en la cicatrización es variada. Los diferentes tipos de estas moléculas se pueden fluctuar desde los primeros días hasta la maduración de la cicatriz.

COLÁGENA.- La colágena es el mayor constituyente de todas las matrices extracelulares, es la proteína más

abundante, constituye el 25 % de las proteínas totales en los mamíferos y, como se verá más adelante, su función no es únicamente estructural. Las colágenas son una familia de glicoproteínas de triple hélice que se encuentran en la matriz extracelular, pueden ser homo o heterotriméricas, compuestas de diferentes cadenas alfa. Se conocen al menos 25 cadenas alfa diferentes, codificadas en diferentes genes. Con las 25 cadenas podrían hacerse combinaciones que dieran origen a 10 000 tipos diferentes de colágenas, pero sólo se conocen 24 (Alberts et al., 1994). Las cadenas alfa tienen en común la presencia frecuente de motivos Gly-X-Y, lo que permite a la molécula plegarse en triples hélices. Por lo general, las colágenas son resistentes a la lisis no específica, por lo que se requiere de enzimas específicas 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 colágena que 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-XVIII) (Eckes et al., 1996). Una de las características principales de las colágenas es que se pueden polimerizar formando agregados fibrilares que van a proveer resistencia a la herida. El primer tipo de colágena en depositarse durante la cicatrización es el tipo III que es muy común en la piel de embrión. A partir del quinto día de empezado el proceso cicatrizal, 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 en que se encuentra en mayor cantidad la colágena, se da entre los 5 y 14 días, terminado este periodo, la

síntesis y depósito de colágena es ampliamente regulado por la degradación de la molécula y la inhibición de actividad en los fibroblastos. El tipo V aparece en los días en que la angiogénesis se está desarrollando, lo que indica que existe una asociación de esta proteína con las células endoteliales. El tipo VI aparece a las dos semanas después del daño, secretada por fibroblastos y células endoteliales. Sumado a su función estructural, la colágena también ejerce efecto sobre las células. La matriz extracelular rica en colágena altera la función de varios tipos celulares: los fragmentos de colágena sirven de quimioatrayentes para fibroblastos; las matrices de colágena reducen la síntesis de colágena y la proliferación celular e inducen la síntesis de colagenasas. La colágena puede adherir factores de crecimiento como el FGFb 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.

Una vez que se han depositado los diferentes tipos de colágena, durante la remodelación, los miofibroblastos, que son fibroblastos con características de células de músculo liso, 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 necesario la presencia de la matriz de colágena y de la expresión de receptores de integrinas del tipo $\alpha 2\beta 1$. 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 que el organismo es capaz de llevar a cabo en respuesta a un daño.

DIABETES MELLITUS

La *Diabetes mellitus* es una enfermedad metabólica crónica, generalizada y multifactorial que se define como la deficiencia en la secreción o acción de la hormona pancreática insulina. La diabetes se manifiesta en su forma totalmente desarrollada con hiperglucemia (alta concentración de azúcar en sangre), glucosuria (azúcar en la orina), poliuria (incremento en el número de micciones), polidipsia (incremento en la ingesta de agua), incremento en la degradación proteica (principalmente músculo) y cetoacidosis (Pérez Tamayo, 1987). También se presentan complicaciones particulares como la aterosclerosis, retinopatía, nefropatía, neuropatía y glicosilación no enzimática de proteínas (Ward et al., 1989).

La diabetes se divide en dos grupos: la Diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) o tipo I y la Diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID) o tipo II.

La Diabetes tipo I generalmente se puede diagnosticar antes de los 30 años de edad y está asociada con individuos con los haplotipos HLA DR3 y HLA DR4 del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Se caracteriza por la ausencia de insulina debido a la destrucción de las células beta del páncreas; estudios han revelado que en este tipo de diabetes existen anticuerpos contra las células tipo β del páncreas, productoras de insulina, lo que explica la dependencia de insulina en estos enfermos y la insulinopenia. La falta de insulina disminuye la entrada de glucosa al músculo y al tejido adiposo, mientras que en hígado aumenta la degradación de glucógeno y aumenta la gluconeogénesis, lo que incrementa los niveles de glucosa en sangre. En este tipo de diabetes, los pacientes son

más propensos a la cetoacidosis, siendo esta incluso, una característica clínica diferencial entre los dos tipos de diabetes; además en la diabetes tipo I, los síntomas son más acentuados: poliuria, polidipsia, glucosuria y pérdida de peso (Bottazzo et al., 1989).

En la diabetes tipo II, el diagnóstico es generalmente después de los 30 años de edad y más del 70% de los pacientes son obesos. La principal característica de este tipo de diabetes es que al principio de la enfermedad existe en el paciente hiperinsulinemia; la resistencia a la insulina puede darse por la ineficacia de los receptores de la hormona en las células o algún factor genético, razones por las cuáles este tipo de diabetes es insulino independiente. Las concentraciones normales de insulina no son suficientes para efectuar las funciones que normalmente se llevan a cabo por efecto de la insulina, lo que genera una sobreproducción de la hormona en el páncreas, pero las células beta llegan a ser incapaces de producir insulina adicional para contrarrestar los efectos de la resistencia (Fernández-Mejía 1996) y es cuando se manifiesta la enfermedad. Los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la enfermedad no han sido todavía descritos ampliamente, se sabe que la dieta y la obesidad son factores importantes pero no definitivos.

En ambos tipos de diabetes se presentan los siguientes síntomas: hiperglucemia, aterosclerosis en arterias coronarias, periféricas y del cerebro, retinopatía, nefropatía, neuropatía y glicosilación no enzimática de proteínas.

INSULINA.- Es una molécula de 51 aminoácidos y consiste de dos cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro. La cadena A contiene 21 residuos mientras que la cadena B contiene 30. La biosíntesis de la insulina ocurre en las células tipo B del páncreas y su síntesis se estimula por glucosa principalmente, además de otros

azúcares y otros metabolitos. Se secreta por exocitosis y se almacena en gránulos que mantienen adhesión con microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto (Derewenda et al., 1989). Los factores que estimulan la secreción de la proteína se dividen en dos grupos: iniciadores, que tienen acción directa en la secreción como lo son la glucosa y algunos aminoácidos; y los potenciadores que son ineficientes por sí solos pero amplifican la secreción en respuesta a glucosa o aminoácidos como los inhibidores de fosfodiesterasa (Howell et al., 1989).

Las funciones de la insulina se resumen de la siguiente manera:

- Estimula la entrada de glucosa a la célula.
- Inhibe la glucogenólisis.
- Estimula la síntesis de proteínas.
- Estimula la entrada de aminoácidos a la célula.
- Estimula la síntesis de ácidos grasos y su almacenamiento.

Los efectos metabólicos de la deficiencia de insulina emulan la inanición. Los primeros efectos se desencadenan a partir de la imposibilidad de utilizar la glucosa por los tejidos periféricos, en especial músculo esquelético y tejido adiposo, lo que contribuye a la hiperglucemia. La gluconeogénesis y glucogenólisis son otros procesos que contribuyen a la hiperglucemia, que cuando supera el umbral renal se produce la glucosuria causando una diuresis osmótica, lo que explica la poliuria, síntoma grave que no se acompaña de reposición de agua y que puede ocasionar deshidratación en el enfermo. La enfermedad no afecta específicamente a un órgano, sino a la mayoría de ellos. Un breve resumen de los efectos se proporciona a continuación.

MICROANGIOPATÍA.- La microcirculación se define como el transporte y el intercambio entre la sangre y el tejido; normalmente en el sistema vascular se necesita una presión que asegure la circulación, por lo cual también es necesaria

cierta permeabilidad capilar. El intercambio de moléculas es a través de receptores específicos o por difusión como en el caso de los iones.

Para ejercer control sobre la presión sanguínea, existen procesos un poco más complicados. En general la regulación de la hemodinamia microvascular es ejercida por el sistema nervioso simpático que inerva las arteriolas. La actividad de este control está coordinada con el centro vasomotor.

La hemodinámica del cerebro y retina no depende del sistema nervioso sino que elementos locales responden a la falta de oxígeno (hipoxia). El caso opuesto se presenta en la piel que depende de un amplio control neurogénico y mostrando muy baja autorregulación (Tooke et al., 1989).

Estos procesos de microcirculación se ven afectados en la diabetes por la microangiopatía. La microangiopatía se ha definido como el daño en la microcirculación de la retina, riñón y neuronas principalmente, pero también considerando que afecta corazón, piel, tejido graso subcutáneo y músculo.

Las paredes de la microvasculatura están formadas por una membrana basal y células endoteliales. La membrana basal se componen de colágena tipo IV, laminina y proteoglicanos. La colágena está altamente glicosilada en la diabetes lo que le confiere mayor resistencia a la degradación, contribuyendo al engrosamiento de la membrana basal pero, paradójicamente, a pesar de su mayor grosor ofrece mayor permeabilidad a macromoléculas y menor a micromoléculas. Esto se explica por la diferencia de carga que la membrana adquiere por la glicosilación de la colágena.

El endotelio posee funciones de síntesis relacionadas con el fluido sanguíneo y la modulación local del flujo, funciones que se ven afectadas por la diabetes. Otros factores que también son afectados son: el factor von Willebrand, la prostaciclina, EDRF, las plaquetas y en general células blancas que presentan poca

afluencia y migración (Walker et al., 1991). Como consecuencia de esto, aumenta la viscosidad de la sangre y se agregan plaquetas anormalmente.

El daño causado por la microangiopatía se resume como el incremento del flujo microvascular y, por lo tanto, a la presión sanguínea, seguido de esclerosis microvascular, reduciendo la perfusión y finalizando con la pérdida de autorregulación de los tejidos (Figura 1). Los principales órganos dañados por la microangiopatía son el cerebro, hígado, ojo y riñón (Meyer et al., 1996)

RETINOPATÍA.- La retinopatía está presente en el 75% de los pacientes con diabetes tipo I y en el 50% de los pacientes con diabetes tipo II. Las anomalías se presentan sobre la sensibilidad a contrastar, la habilidad para diferenciar colores e incluso cegueras parciales; aunque no todas las retinopatías están directamente relacionadas con la ceguera. La gravedad de las lesiones de retina en pacientes diabéticos depende en gran medida de otros factores de riesgo además de la diabetes, como eventos genéticos, oculares e hipertensión. Se ha asociado la retinopatía con las moléculas HLA DR4 y DR3 del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, también está asociada con la neovascularización (Kohner et al., 1989). Como respuesta a la isquemia, las células epiteliales se duplican para generar nuevos vasos, pero los vasos existentes y los vasos nuevos son más permeables de lo normal, lo que puede llegar a generar hemorragias.

NEUROPATÍA.- Las células del cerebro no requieren de la hormona insulina para obtener glucosa, por lo que la hiperglicemia está directamente relacionada con el daño a los nervios. Se ha comprobado que la acumulación de sorbitol en los nervios, catalizada por la enzima aldosa reductasa, contribuye a la disminución de mioinositol y baja actividad de la ATPasa de Na y K, actividad asociada con la disfunción

nerviosa. El proceso se explica mas adelante. Uno de los cambios importantes que ocurren en esta patología es la

disfunción en el transporte de proteínas a nivel axonal (Ward et al.,1989).

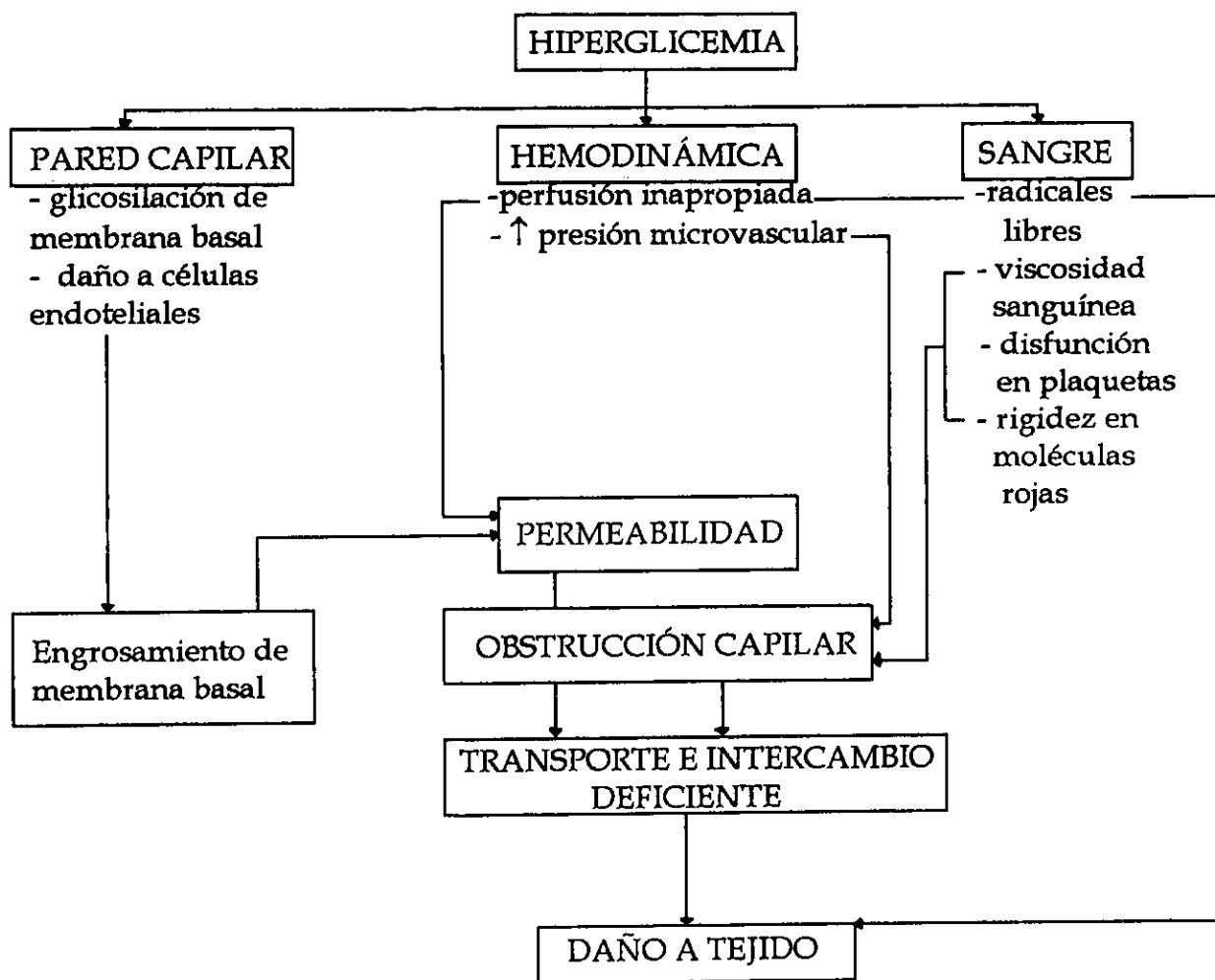


Figura 1. Cascada de eventos de la microangiopatía en la *Diabetes mellitus*.

La glicosilación no enzimática de proteínas se ha relacionado recientemente con la desmielinización de las células nerviosas, lo que contribuiría a la ineficiencia del axón

para transportar proteínas. También se ve afectada la velocidad de conducción del nervio, lo que conlleva a disfunciones a cualquier nivel del organismo. Las

disfunciones directamente relacionadas son a nivel de movilidad gastrointestinal, funciones eréctiles, cardíacas, microcirculación y tono vascular. El mecanismo por el cuál el sorbitol causa daño a las células es el siguiente: la glucosa se metaboliza a sorbitol por la aldosa reductasa y la reacción requiere reducir NADPH. El consumo de sorbitol es lento, por lo que la hiperglicemia causa acumulación de sorbitol. Las consecuencias de la acumulación intracelular de sorbitol son dos. Primero, puede actuar como osmolito facilitando por ejemplo la formación de cataratas; segundo, el sorbitol puede actuar como inhibidor competitivo en la obtención de mioinositol por las células, resultando en una señalización de inositol anómala. Como consecuencia de la excesiva utilización de NADPH, el tejido se vuelve más susceptible al estrés oxidativo y en particular los neutrófilos tienen menor capacidad bactericida.

NEFROPATÍA.- El riñón del paciente diabético muestra lesiones con diferentes patrones de alteración de tipo glomerular y arteriales, lo que ocasiona isquemia con subsecuente atrofia tubular con fibrosis intersticial y contracción del tejido renal (Drury et al., 1989). Como resultados fisiopatológicos de la microangiopatía y la hiperglicemia en el riñón se mencionan decaimiento en la filtración glomerular. Los signos para evaluar el daño en el riñón son la poliuria, glucosuria y proteinuria; estos signos se presentan con mayor frecuencia en los pacientes con diabetes tipo I, lo que complica el diagnóstico en pacientes con diabetes tipo II (Meyer et al., 1996).

ATEROESCLEROSIS.- A nivel macrovascular el daño se manifiesta como aterosclerosis. Los niveles de lípidos y lipoproteínas dependen en gran medida de la deficiencia de insulina, hiperglicemia, obesidad y la dieta. Existen moléculas compuestas por colesterol, triglicéridos y

proteínas que realizan el transporte de colesterol en forma de ésteres de colesterol las cuales son llamadas lipoproteínas de baja densidad (LDL), y son endocitadas por las células a través de receptores específicos (Leghninger et al., 1993).

La diabetes afecta el mecanismo de las LDL de diferentes maneras; primeramente, la insulina es necesaria para incrementar el número de receptores para las LDL en las células y además estimular la degradación de las LDL, lo que implica que la falta o deficiencia de insulina ocasiona una asimilación ineficiente de colesterol y su acumulación en las venas. Además, otro factor que puede alterar la unión de las LDL con su receptor en la célula es la glicosilación no enzimática de las moléculas LDL, lo que ocurre en residuos de lisina, que son importantes para la unión con el receptor. En modelos animales de aterosclerosis se ha descubierto que en etapas tempranas de la lesión se encuentran monocitos adheridos a las paredes endoteliales con acumulación subsecuente en el espacio subendotelial, en donde adquieren características de macrófagos, que al activarse dañan al endotelio. Esto permite la agregación de plaquetas, proliferación de células del músculo liso y la formación de fibrosis en la lesión (Betteridge et al., 1989).

CETOACIDOSIS.- En los seres humanos y en la mayoría de los mamíferos el acetyl CoA formado en el hígado durante la oxidación de los ácidos grasos puede entrar en el ciclo del ácido cítrico o puede ser convertido en cuerpos cetónicos que son transportados a tejidos extrahepáticos para proporcionar energía al ser oxidados. Un factor determinante de la ruta tomada por el acetyl CoA en las mitocondrias hepáticas es la disponibilidad del oxaloacetato para iniciar la entrada de acetyl CoA en el ciclo del ácido cítrico. En algunas circunstancias como la inanición y la diabetes se extrae el oxaloacetato del ciclo del ácido cítrico para

utilizarlo en la síntesis de glucosa. Si la concentración de oxaloacetato es muy baja, entra muy poco acetil CoA al ciclo y se favorece la formación de cuerpos cetónicos. Además, la falta de insulina provoca un aumento de la lipólisis para utilizar los ácidos grasos como fuente de energía, por lo cuál se explica que en la diabetes tipo I, donde no hay insulina, se incrementa la formación de los cuerpos cetónicos. Los cuerpos cetónicos son utilizables para la obtención de energía en las células ante la imposibilidad de utilizar la glucosa, pero no pueden ser asimilados tan rápido como se sintetizan en el hígado, provocando una alta concentración de ellos en la sangre, lo cuál hace descender el pH sanguíneo originando una acidosis; aunado a esto, la oxidación de triacilgliceroles para dar cuerpos cetónicos produce ácido carboxílico que al ionizarse liberan protones contribuyendo a la acidosis. Los principales cuerpos cetónicos son el acetoacetato, D- β hidroxibutarato y acetona, el exceso de ellos en la sangre tiene consecuencias sistémicas, ya que no es uno el órgano afectado por la presencia exacerbada de ellos y la acidosis.

GLICOSILACIÓN NO ENZIMÁTICA.- La glicosilación no enzimática es un proceso que se conoce como la unión de un azúcar reductor y un aminoácido. La importancia de la glicosilación no enzimática radica en que una proteína glicosilada puede perder funciones específicas de su metabolismo normal y, además, provoca alteraciones en la estructura y propiedades físicas de la molécula así como cambios en la carga. A pesar de que la glicosilación no enzimática ocurre normalmente en la célula, los niveles altos de glucosa en la sangre provocan un incremento en el número de proteínas glicosiladas y aún tres semanas después de controlada la hiperglicemia, sigue habiendo entrecruzamiento entre moléculas glicosiladas (Kennedy et al., 1989).

La glicosilación no enzimática está directamente relacionada con las complicaciones en pacientes diabéticos mencionadas anteriormente: retinopatía, nefropatía, padecimientos vasculares (Paul et al., 1996) y cicatrización por mencionar sólo a los más estudiados; particularmente afecta a moléculas como colágena hemoglobina, albúmina, mielina, LDL, inmunoglobulinas (Cohen et al., 1996) y enzimas en general. La glicosilación de la colágena ha sido de las más estudiadas y se sabe que la unión del azúcar se realiza en residuos de lisina o hidroxilisina; el azúcar no sólo puede ser glucosa, sino también derivados de ésta como la glucosa-6-fosfato e incluso ribosa (Bailey et al., 1995). La unión es a nivel del aldehído del azúcar y el grupo amino del aminoácido, formando lo que se conoce como base de Schiff o aldimina que sufre cambios para formar productos más estables llamados productos de Amadori o cetoaminas. Este primer paso se conoce como productos tempranos de la glicosilación, los productos son reversibles y no causan gran daño celular.

El segundo paso sucede a partir de la modificación de las cetoaminas que resulta en los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs), que en caso de la colágena son polímeros pigmentados llamados melanoidinas (Reiser et al., 1990). Otros productos de la glicosilación avanzada son : carboximetil-lisina, pentosidina y piralina. El segundo paso es irreversible y es a partir de donde comienza el daño.

La glicosilación no enzimática de la colágena depende en gran medida del tipo de colágena ya que ,por ejemplo, la colágena tipo I no se glicosila uniformemente ni al azar, sino que ocurre en lugares específicos; en el caso de la colágena tipo IV, la glicosilación inhibe la agregación lateral de la colágena en forma helicoidal.

Los efectos directos de la glicosilación no enzimática de la colágena son: resistencia a la degradación, disminuye

su solubilidad, presenta mayor rigidez y menor movilidad, disminuye el tránsito de células en la matriz extracelular y facilita la unión inespecífica de ligandos como las plaquetas llegando incluso a facilitar la trombosis.

En general, como se ha visto, la glicosilación no enzimática de un sinnúmero de moléculas tiene efectos en el ámbito sistémico.

COAGULACIÓN.- Los desordenes hemostáticos en personas que padecen *Diabetes mellitus* son causa de los efectos en la coagulación y anomalías en las interacciones celulares. El endotelio en una situación de hiperglicemia, sintetiza menor prostaciclina y aumenta la síntesis del factor de von Willebrand, fibrinógeno y factor VII y se reduce la actividad biológica de la antitrombina y de la proteína C. El sistema fibrinolítico facilita la lisis de la fibrina, que como se mencionó en el párrafo de la coagulación en situaciones normales, es de gran importancia para el proceso. El sistema plaquetario se ve afectado también, mostrando hipersensibilidad en agregarse a moléculas agonistas como colágena, ácido araquidónico y trombina; disminuye la fluidez de la membrana y por lo tanto la secreción y su volumen. Y nuevamente la glicosilación no enzimática de proteínas de membrana de plaquetas, así como del factor heparán II y fibrina, convergen en desórdenes de la coagulación.

ANTECEDENTES

DIABETES Y CICATRIZACIÓN.- Como se mencionó en la introducción, la *Diabetes mellitus* es un padecimiento que presenta múltiples complicaciones que no podrían explicarse con un sólo mecanismo, es necesario tener aproximaciones multidisciplinarias para comprender el mecanismo de la enfermedad y dar a la luz procesos de prevención y tratamiento. En la

introducción se describieron brevemente las complicaciones, siendo casi imposible hacerlo de manera puntual. En el caso de este trabajo, nos hemos preocupado por una complicación en particular: la cicatrización. Es sabido que las personas con *Diabetes mellitus* tienen grandes dificultades para cicatrizar, especialmente si no existe un control de la hiperglicemia, además de que son más susceptibles a infecciones (Johnston et al., 1994).

Las razones por las cuales la cicatrización es deficiente se han mencionado indirectamente en la introducción, ya que cada complicación de la diabetes tiene repercusiones en la cicatrización, pero se hará un breve resumen de eventos:

MICROANGIOPATÍA.- Disminuye el aporte de oxígeno, nutrientes, citocinas y células, lo que disminuye la eficiencia del proceso cicatrizal (Vyalov et al., 1996).

GLICOSILACIÓN NO ENZIMÁTICA.- En particular de la colágena y fibrina, disminuye la resistencia de la herida y el tránsito de células que participan en el proceso cicatrizal. La glicosilación de inmunoglobulinas disminuye la resistencia a infecciones, así como la de proteoglicanos, la unión a factores de crecimiento que se almacenan en la matriz extracelular. En el caso de proteínas de membrana puede ocasionar pérdida de función de la célula o disfunciones como el caso de los leucocitos polimorfonucleares, que pierden la capacidad de reconocer receptores; o las plaquetas, que se agregan de manera anormal. La glicosilación excesiva de componentes de membrana basal, ocasiona el engrosamiento del endotelio que incrementa la microangiopatía. Finalmente la glicosilación de la mayoría de las enzimas contribuye a la deficiencia en la reparación.

INFLAMACIÓN.- Existe deficiencia en la inflamación a causa del aporte sanguíneo, la reducida respuesta de las células a factores quimiotácticos y la misma insuficiencia de quimioatrayentes, además, la inadecuada matriz extracelular.

RESPUESTA INMUNE.- En diabetes no existe opsonización que es un proceso de defensa para resistir a las infecciones, así como tampoco existe el componente C4 de la cascada de complemento (otra estrategia del organismo para combatir cuerpos extraños). Es insuficiente la adherencia de las células a las paredes de los vasos sanguíneos, así como a componentes de matriz extracelular; también está disminuida la fagocitosis, además las células van perdiendo la capacidad de atravesar las paredes de los capilares. La glicosilación no enzimática de inmunoglobulinas y también la falta de NADPH, que se utiliza para la vía del poliol, ocasiona que los polimorfonucleares no pueden destruir bacterias intracelularmente (Schäffer et al., 1996).

CETOACIDOSIS.- Ocasiona problemas en general a enzimas y proteínas, lo que lleva al paciente diabético a tener una deficiente degradación de material inservible en la zona de la herida y un inadecuado recambio de proteínas.

ATP.- La síntesis de ATP en las células disminuye ocasionando retraso metabólico.

SÍNTESIS PROTEICA.- Se ha dicho que la cicatrización depende en gran medida del

recambio de proteínas en el lugar del daño, lo que se ve afectado por la disminución de la síntesis de proteínas, en especial colágena, fibronectina y citocinas (Spanheimer et al., 1992).

NEUROPATÍA.- De manera general, causa afecciones en cualquier biomecanismo, siendo otra de las causas que influyen en la cicatrización.

INFECCIONES.- La insuficiente quimiotaxis, adherencia, actividad bactericida, producción de prostaglandinas, factores de crecimiento, actividad del complemento y células inmunes, afluencia celular, actividad de inmunoglobulinas y la falta de opsonización, tienen como resultado la susceptibilidad a infecciones. En el caso de la piel y tejidos blandos, las principales enfermedades son las otitis, coliocistitis enfisematosa, paniculitis granulomatosa y candidiasis.

Siendo la *Diabetes mellitus* un problema que afecta a una considerable parte de la población mundial, se ha buscado explorar métodos terapéuticos que atenúen la enfermedad. La Tabla V intenta enumerar las diferentes terapias que se han probado en pacientes diabéticos.

Tabla V. Métodos Terapéuticos para Pacientes Diabéticos.

MÉTODO	MECANISMO	REFERENCIA
Factores de crecimiento	↑ cicatrización	
FGFa		(Mellin et al., 1995)
FGFb		(Taubol et al., 1990)
PDGF		(Grontendorst et al., 1985)
EGF		(Hennessey et al., 1990)
Aminoguanidina	↓ formación de AGEs	(Paul et al., 1996)
Sorbinil	↓ actividad de aldosa reductasa	(Kennedy et al., 1989)
Hormona de crecimiento biosintética	↑ cicatrización	(Kamal et al., 1996)
Antioxidantes	↓ formación de radicales libres	(Kamal et al., 1996)
Transplante de páncreas	provisión de insulina	(Morris et al., 1989)
Estimulación eléctrica	↑ cicatrización	(Baker et al., 1997)

La deficiente cicatrización en la *Diabetes mellitus*, lleva a que los pacientes con heridas o que requieren cirugías, necesiten de grandes cuidados e incluso de un estricto control de la hiperglicemia en situaciones prequirúrgicas (Verhofstad et al., 1996).

POLIETILENGLICOL.- Se ha observado que el uso de polietilenglicol de manera tópica en la herida, acelera la cicatrización en ratas normales cerrando la herida a las 48 horas. Aunado a esto, las heridas muestran mayor resistencia al aplicarse una fuerza de tensión (Guerrero-Padilla., 1984) todo esto sin causar efectos secundarios (Pontecorvo et al., 1975).

El polietilenglicol (PEG) es un polímero de cadena alifática que tiene variados usos y aplicaciones debido a las características que le da el tener diferentes pesos moleculares, ejemplo de ello es su uso en la industria cosmetológica, farmacológica, elaboración de pinturas y congelantes. Tiene la capacidad de alterar la membrana celular por su efecto en las interacciones lípido-lípido, provocando fusión celular (Knutton et al., 1979). La intoxicación por la ingesta es prácticamente nula, aún después de uso prolongado es inocuo (Galfre et al., 1977). Llega a ser tóxico a concentraciones muy altas y su efecto es por deshidratación de la célula, ya que es hidrofílico.

Para estudiar el efecto del polietilenglicol en la cicatrización se utilizó la molécula con peso 6 000 g/mol, aplicado de manera tópica en heridas quirúrgicas antes de suturarlas; se aplicó una solución 1:2 de polietilenglicol en solución de Hanks y Dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% (Guerrero-Padilla., 1984).

ESTREPTOZOTOCINA.- El método que se ha utilizado para la inducción la diabetes es con una dosis de estreptozotocina de 60

mg/Kg. de peso de manera intraperitoneal. Se ha observado que las dosis varían en la literatura dependiendo de la especie, sexo y edad (Flores et al., 1995).

La estreptozotocina (N[Metilnitrosocarbamoil]-D-glucosamina) es una citotóxica relativamente selectiva para las células beta del páncreas en ciertos animales, en los que causa diabetes permanente (Morders et al., 1981). El primer paso es la adhesión de la molécula a la membrana celular de las células beta, se ha propuesto el mecanismo a través del anómero alfa de la glucosamina, también se ha propuesto que el componente glucosa de la molécula de estreptozotocina facilita la entrada a las células del páncreas, ya que al removerlo o sustituirlo de la molécula, se reduce la capacidad citotóxica de ésta. Ya dentro de la célula, la estreptozotocina reduce los niveles de adenina dinucleótido (NAD) inhibiendo su síntesis y estimulando su degradación (Mordeers et al., 1981). El primer efecto de daño al páncreas se puede ver en la disminución de síntesis de colágena y posteriormente se puede observar a nivel histológico, la desgranulación de las células beta y la destrucción de los islotes. Estudios realizados para corroborar el padecimiento diabético por estreptozotocina han sido: niveles de glucosa sanguínea, peso corporal, consumo de agua, alimento y mortalidad (Flores et al., 1995), tamaño de intestino, glucosa en orina, volumen de orina (Miller et al., 1979), síntesis de ADN y proteínas (Spanheimer 1992), absorción de aminoácidos en el intestino (Lal et al., 1974, Dheeraj et al., 1974) y como se puede observar en la Tabla VI con solo algunos de los parámetros indicados las ratas muestran los signos y síntomas típicos en la diabetes mellitus.

Tabla VI. Características fisiológicas de ratas diabéticas y normales a 30 días de la aplicación de la estreptozotocina.

PARÁMETRO	CONTROL	DIABÉTICAS
Peso corporal en g	335	212
Intestino delgado en g	5.0 (1.6% del peso corporal)	8.9 (4.7% del peso corporal)
Consumo de alimento g/d	22	34
Glucosa en sangre mg/dL	90	400
Glucosa en orina g/d	0	11
Volumen de orina ml/d	11	189
Consumo de agua ml/d	33	209
Absorción de leucina en intestino	100	37
Absorción de lisina en intestino	100	128
Síntesis de ADN en yeyuno cpm por cripta	14	23

Finalmente, la diabetes inducida por estreptozotocina ofrece un modelo experimental de diabetes que puede compararse con el padecimiento en humanos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La consecuencia de aplicar el PEG de manera tópica en la herida, es reducir el tiempo de cicatrización, esto se ha analizado en ratas normales desde un punto de vista macroscópico, histológico, inmunohistoquímico y de resistencia. Las complicaciones de reparación que se presentan en la diabetes han sido motivo de intensos estudios, y dadas las características del PEG, la hipótesis de este trabajo es que al aplicar el PEG en ratas diabéticas disminuirá el tiempo de cicatrización, por lo que se ha decidido hacer un estudio comparativo de heridas en ratas sin tratamiento y heridas tratadas con PEG, esperando que se manifieste nuevamente la aceleración del proceso cicatrizal. Las diferencias que se han observado en ratas normales tratadas con PEG han sido: disminución en el tamaño del cono de cicatrización, la presencia temprana de

fibronectina, epidermis de grosor normal y poco infiltrado celular; presumiblemente, el efecto al aplicar el PEG en heridas de ratas diabéticas, puede presentarse nuevamente.

Dada esta hipótesis, el objetivo general de este trabajo es valorar los efectos del PEG en animales diabéticos a diferentes tiempos de su aplicación en heridas de tipo quirúrgico.

Los objetivos particulares son:

- Inducir diabetes a las ratas, de manera que se mantenga la patología.
- Comparar el proceso reparativo por morfología en las heridas tratadas con y sin PEG.
- Comparar histológicamente las proporciones de tejido de granulación, de infiltrado celular, de colágenas tipo I y tipo III en las heridas testigo y experimental.
- Identificar con anticuerpos específicos proteínas que se depositan en la matriz extracelular; aquellas que son básicas para el proceso de cicatrización: fibronectina, colágena tipo I y colágena tipo III en heridas control y experimental.
- Comparar la resistencia de las heridas control y experimental por medio de la aplicación de una fuerza de tensión.

MATERIALES

Para el modelo biológico de este proyecto se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar, de 8 semanas de edad y un peso promedio de 270 g, obtenidas del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: anticuerpos de conejo específicos contra fibronectina de rata; anticuerpo de conejo específico contra colágena tipo I y colágena tipo III de rata, de la casa Chemicon; anticuerpo de cabra específico contra anticuerpo de conejo, fluoresceinado, de la marca Zymed. Las sales de uso común, así como solventes y colorantes, se utilizaron de la marca J.T. Baker. Reactivos como la hialuronidasa, albúmina de suero bovino, resina, estreptozotocina y polietilenglicol de peso molecular 6 000, de la marca Sigma Chemical. El DMSO de la marca Merck. Para medir los niveles de glucosa en sangre, se utilizaron las tiras reactivas Dextrostrix II de Bayer. El medio para congelación de tejidos fue Tissue Tek de la marca Jung. Los aparatos utilizados fueron: microtomo de American Optical Company, crióstato Reichert-Jung 1800, microscopio Ultraphot Zeiss y microscopio Nikon Optiphot Epifluorescence y el tensómetro fue donado por el Dr. Zumano s/marca (de la Fac. de Veterinaria de la UNAM). El tratamiento y manejo de las ratas se realizaron según las reglas establecidas por el Institutional Animal Care and Use Committee (National Academic Press, 1996).

MÉTODOS

1. Inducción de la Diabetes:

Para este propósito se tomaron las ratas, se pesaron y se les tomó muestra de sangre por la vena caudal para corroborar que se encontraran en condiciones normales (90 mg de glucosa en 100 ml de sangre). Se les inyectó 1 dosis de 60 mg por Kg. de peso de estreptozotocina a cada rata

intra-peritonealmente (Flores 1995). El vehículo fue un amortiguador de citratos.

Se tomaron muestras de sangre desde el segundo día de la inducción de la diabetes hasta el sacrificio de los animales en intervalos de 3 días y desde la 1ª toma de muestra las ratas alcanzaron niveles de glucosa en sangre alrededor de los 700 mg/dl según las tiras de Destroxtis.

También se midió el peso corporal desde el primer día de la inducción hasta el sacrificio de los animales. Las ratas se trabajaron en grupos de 5 animales c/u.

2. Heridas quirúrgicas.

Una vez establecido el padecimiento en las ratas, se anestesiaron con éter en una cámara cerrada, se les realizaron 2 incisiones de 5 cm aproximadamente en la región dorsal (previamente rasurada); la herida de la región cervical se utilizó como control y la herida de la región caudal como la experimental. Previo a la sutura, en la herida experimental se aplicó de manera tópica PEG y como vehículo una solución de Hanks vol./vol. y a esta solución se le agregó DMSO al 5 % y se esterilizó en autoclave.

3. Obtención de muestras.

Los animales se sacrificaron a diferentes días de realizada la herida, según la prueba a realizar. Se sacrificaron con una sobredosis de cloroformo o de CO₂ y se obtuvieron diferentes secciones de la herida, las cuales se fijaron en formalina al 10% en solución salina amortiguadora para su análisis histológico y otro grupo se congeló a -70°C embebidas en Tissue Tek para el análisis inmunohistológico.

4. Inclusión en parafina.

Los cortes previamente fijados en formalina se incluyeron en parafina para poder procesarse en un microtomo. Después de al menos 1 día en la formalina, los tejidos recibieron 3 lavados en agua destilada de 5, 10 y 5 minutos cada uno, después se sumergieron en alcoholes al 70%, 80%, 96%,

absoluto y alcohol-xileno (1:2) 1 hora en cada uno de ellos; inmediato a esto, se sumergieron en xileno de 1 a 2 minutos y luego 1 hora en parafina-xileno para poderse procesar en bloques de parafina.

Se hicieron cortes de 6 micras en un microtomo cuidando que la herida quedara expuesta en el corte del tejido. Los cortes se hidrataron, en alcohol al 50% y se colocaron en la superficie de agua a 50°C y con gelatina disuelta, lo que facilitó la recolección de los tejidos en portaobjetos.

5. Tinción de Masson.

Se desparafinaron las laminillas sumergiéndolas de 15 a 20 minutos en xileno, se enjuagaron en agua destilada y se procedió a la tinción. Se les agregó alumbre férrico acuoso al 5%, 30 minutos a 50°C, después se tiñeron con hematoxilina de Regaud 30 minutos a 50°C y se lavaron con agua destilada; se diferenciaron en ácido pícrico disuelto en alcohol al 95%, se lavaron en agua ligeramente por varios minutos. Después se coloreó el citoplasma durante cinco minutos a temperatura ambiente en una solución de fucsina ácida y se enjuagaron en agua destilada (Bradbury et al., 1990).

Se dejan durante 5 minutos en ácido fosfomolibdico acuoso al 1% y se tiñó la colágena en una solución saturada de azul de anilina al 2.5% en ácido acético por 5 minutos, nuevamente se enjuagaron y se sumergieron durante 20 minutos en ácido acético al 1% para remover el exceso de azul de anilina. Luego se sumergieron 20 minutos en ácido acético al 0.1% en alcohol absoluto y se deshidrataron en alcohol al 96%, alcohol absoluto, alcohol-xileno y xileno durante 3 minutos en cada uno de ellos. Se montaron las laminillas con resina-xileno. Se tomaron las fotografías de la tinción en el Ultraphot Zeiss.

6. Tinción de Herovici (Herovici et al., 1963).

Una vez desparafinadas las laminillas, se tiñeron en una solución al 0.5% de azul celestino y alumbre férrico al 5% en agua

destilada durante 5 minutos, se lavaron en agua destilada y se tiñeron en una solución al 5% de sulfato de aluminio y hematoxilina al 1% más una solución al 4% FeCl₃, se lavaron de 15 a 30 minutos con agua corriente y se tiñeron en una solución de amarillo-metanilo al 0.4% y 5 gotas de ácido acético; se lavan en una solución de 5 gotas de ácido acético en 60 ml durante dos minutos y posteriormente se sumergieron rápidamente en una solución de carbonato de litio (dos gotas de solución saturada en 60 ml de agua).

Se lavaron en agua destilada y se tiñeron por 2 minutos en una mezcla picropolicrómica:

Solución 1: azul de metanilo al 0.1%;

Solución 2: fucsina ácida 0.2% en ácido pícrico, solución saturada.

Se mezclaron las dos soluciones, se agregaron 10 ml de glicerol y 0.5ml de una solución saturada de carbonato de litio.

Se sumergieron las laminillas en ácido acético al 1% durante dos minutos y se deshidrataron durante 3 minutos en los mismos alcoholes que la tinción de Masson, y nuevamente se montaron en resina y se fotografiaron.

7. Criocortes

Al momento de sacrificar a los animales para obtener las muestras, los fragmentos de tejidos se congelaron a -70°C, embebidos en Tissue Tek y se mantuvieron allí hasta el momento de hacer los cortes. Los tejidos se procesaron en un crióstato a -20°C y los cortes fueron de 6 micras. Se recolectaron en portaobjetos previamente tratados con silano (sumergidos en silano al 2% en acetona, 2 minutos y enjuagados con agua destilada y secados a 37°C), estas láminas se utilizaron para los estudios de inmunofluorescencia y se guardaron a -4°C hasta su estudio.

8. Inmunofluorescencia

Una vez preparadas las laminillas se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente y se trataron con hialuronidasa al 12.5%

disuelta en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos a 37°C. Se lavaron en PBS, 3 lavados de 3 minutos cada uno y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 0.1 % en PBS durante media hora a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron los primeros anticuerpos de conejo específicos para las principales moléculas de MEC diluido en albúmina de suero bovino al 0.1 % en PBS, la dilución fue 1:50 para fibronectina y 1:20 para colágenas, se dejó incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las laminillas con PBS, 3 lavados de 5 minutos cada uno y se incubaron con el segundo anticuerpo de cabra, específico para anticuerpos de conejo y con la característica de estar fluoresceinado y a una dilución de 1:75, se incubaron una hora a temperatura ambiente y se lavaron en una solución de PBS con tween al 0.3 %, 2 veces por 15 y 5 minutos cada una. Se montaron en una solución de DABCO al 5 % en PBS-glicerina 1:9, y se observaron y se tomaron fotos en el microscopio Nikon Optiphot Epifluorescence.

9. Pruebas de resistencia

Para realizar estas pruebas se les hizo una incisión en el dorso a las ratas y se les aplicó previo a la sutura el PEG, a las ratas experimentales. Se sacrificaron las ratas con una sobredosis de cloroformo o CO₂ a diferentes tiempos de la aplicación del PEG, y se obtuvo la herida completa para montarla en el tensómetro, que es un aparato que aplica una fuerza de tensión a la herida de manera que el tejido se distiende. La presión a la cuál la herida se separa es registrada en un manómetro.

RESULTADOS

El propósito principal de este trabajo, fue analizar las heridas de tipo quirúrgico en la diabetes. Para ello, se utilizó un modelo animal de diabetes inducida, por medio del

fármaco estreptozotocina. Los parámetros para medir la evolución de las heridas fueron histológicos, inmunológicos y de resistencia.

Inducción de la diabetes.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, de aproximadamente 8 semanas de edad y de peso promedio 270 g, se les aplicó una dosis intraperitoneal de estreptozotocina en amortiguador de citratos. Se les tomaron muestras de sangre antes de la inducción y todas mostraron niveles normales de glucosa en sangre (90-100 mg/dL); también se les tomaron muestras de sangre desde el segundo día de la inducción hasta el momento de sacrificarlas y todas mostraron niveles de glucosa arriba de los 400 mg/dl todos los días de muestra. Las ratas se empezaron a trabajar al quinto día de la inducción, ya que consideramos que la diabetes estaba establecida.

Peso corporal de las ratas diabéticas.

Otro parámetro que nos indica que el padecimiento se está presentando en los animales, es la disminución en el peso corporal. Como se muestra en la figura 2, a partir de la inducción de la diabetes el peso disminuye con el tiempo, lo que sucede al contrario en las ratas normales como se pudo ver en la Tabla VI. También se observó que el aspecto de los animales fue como se ha registrado en la literatura, pelo amarillento, polifagia, poliuria y polidipsia, lo que reafirma el padecimiento diabético de las ratas por la inducción con estreptozotocina.

Análisis histológico.

La primera tinción que se utilizó para el análisis histológico fue la tricrómica de Masson, que tiñe los núcleos celulares en negro, el citoplasma celular en gamas de rojo, las fibras musculares en rojo brillante y las fibras de colágena en azul. Los días en que se tomaron muestras de tejido a partir de que se realizó la incisión, fueron: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 y 21 días; se utilizaron grupos de

cinco ratas cada uno, al grupo experimental se le aplicó la solución PEG/DMSO antes de suturar.

En la figura 4 se muestran los días 2 y 3, testigo y experimental. En el día 2 se puede observar una herida todavía abierta con abundante infiltrado inflamatorio, no se puede ver diferencia entre las heridas testigo y experimental. Al tercer día, las dos heridas muestran mayor resolución en la epidermis, pero la dermis aún se encuentra abierta.

En la figura 5, se muestran los días 4 y 5. Para el cuarto día el infiltrado celular en la herida testigo es mucho mayor que en la experimental, la cuál muestra desde este día una mejor resolución a nivel dérmico. La epidermis se ve un poco engrosada, como sucede en la cicatrización de ratas normales al cuarto día (Guerrero- Padilla 1984). Al quinto día, se puede observar que el cono de cicatrización es mucho menor en las heridas experimentales y que la orientación de las fibras de colágena es muy parecida a la normal.

En la figura 6, aparecen los días 6 y 7; en el día 6 se pueden observar resultados muy parecidos al día 5 y para el séptimo día la diferencia entre la herida testigo y experimental es aún mayor, el tejido de granulación es mucho menor en la herida experimental, el engrosamiento de la epidermis desapareció de ésta desde el día 5 y sin embargo en la herida testigo permanece desde el quinto día hasta el séptimo.

En la figura 7, se muestran los días 14 y 21 del proceso cicatrizal. En el día 14 a pesar de que todavía hay infiltrado en las dos heridas, la orientación de las fibras y células en la herida testigo es todavía paralela a la epidermis, lo que muestra que el proceso no ha llegado a una maduración y se encuentra en la segunda fase de la cicatrización que se ha mencionado en la introducción; por el contrario en la herida experimental, las células y fibras tienen un aspecto más normal. Para el día 21 es evidente que el proceso de remodelación se

está llevando a cabo, que consiste en la transición de matriz provisional a cicatriz de colágena, se caracteriza por la presencia de fibroblastos que sintetizan la colágena. Aquí es donde aumenta la resistencia de la herida, pero además se puede llegar a formar cicatrices queloides. En el caso de nuestra herida testigo, hay abundante infiltrado celular y abundante síntesis de colágena, caso contrario en la herida experimental que muestra una mejor resolución con menor esfuerzo. Cabe mencionar que a pesar de aparentar menor resistencia por menor cantidad de células y colágena, la herida experimental tiene mayor resistencia como se probará en los experimentos de tensión.

La segunda tinción que utilizamos fue la de Herovici (Herovici et al., 1963), que diferencia a las colágenas tipo I y tipo III, lo que nos permitió hacer un análisis de la evolución de la herida a nivel de matriz extracelular, ya que como se ha mencionado, estos tipos de colágena aparecen a diferentes tiempos de la cicatrización. Esta tinción tiñe de negro los núcleos celulares, el citoplasma de amarillo verdoso, la queratina, músculo y glóbulos rojos de amarillo brillante, la colágena joven tipo III de azul y la colágena madura tipo I de rojo. Los días posteriores a la herida que se analizaron fueron 2,5, 7, 10 y 14, en esta tinción se tomaron dos juegos de fotos a diferentes aumentos para poder analizar las fibras de colágena y su organización; los aumentos fueron a 120X y 500X.

La figura 8, muestra los días 2 y 5. Al día 2 podemos apreciar que los tonos de las fibras son naranjas, no podemos distinguir entre azul y rojo, lo que nos indica que no hay una síntesis específica de colágena, lo que concuerda con la formación de la matriz provisional para el flujo de células a la herida. A los 5 días, es similar lo que se observa, sin mayor diferencia.

En la figura 9, al día 7, se observa lo que vimos en las tricrómicas, hay mayor infiltrado celular, la coloración en azul ha aumentado en la zona de la herida y en la

lámina basal, justo abajo de la epidermis; esto nos dice que la colágena III, que es la primera en aparecer, ya se está sintetizando en la herida. Los tonos de azul se ven más intensos en la herida experimental. Al día 10, en aumento de 120X, se observa que la coloración azul es mayor en la herida experimental, pero además en el aumento de 500X, se observa que incluso los infiltrados celulares están desapareciendo. Nuevamente, las células de la herida testigo están todavía en posición paralela a la herida. Es importante hacer notar que en la herida experimental, en el cono de la herida, ya se puede observar que hay síntesis de colágena tipo I, que se tiñe de rojo, lo que implica que ha comenzado la maduración de la herida.

En la figura 10, se muestra el día 10, en el que podemos ver que ahora la coloración es más intensa en rojo, lo que indica que la síntesis de colágena tipo I es aún mayor. La herida experimental está casi completamente roja, lo que todavía no sucede en la herida testigo.

Inmunofluorescencia.

El siguiente análisis consistió en evaluar la presencia de proteínas clave para la cicatrización, fibronectina, colágena tipo I y colágena tipo III, lo que vendría a reforzar los resultados histológicos anteriormente presentados. Para este propósito se hicieron criocortes de 6 micras de las heridas testigo y experimental y se trataron con hialuronidasa para quitar todo el ruido posible. Se incubaron con anticuerpos anti colágena y fibronectina específicos y posteriormente se incubaron con un anticuerpo floresceinado de cabra contra anticuerpo de ratón, lo que nos permitió ver al microscopio, la presencia de las proteínas y su distribución en la zona de la herida.

En la figura 11 se muestran las heridas a dos días de la aplicación del PEG, y se muestran también tres diferentes proteínas de matriz extracelular: fibronectina, colágena tipo I y tipo III. Se puede observar que la producción de estas

proteínas a los dos días es todavía muy baja. La que mejor se puede observar es la fibronectina y sabemos que la fibronectina es de las primeras proteínas que se depositan en la herida.

En la figura 12 se muestra que a los 5 días la presencia de fibronectina es más abundante en la zona de la herida. Es más evidente la presencia de la colágena tipo III a lo largo de las heridas y junto a la membrana basal, en las dos heridas, testigo y experimental. También se puede notar que ya se comienza a depositar la colágena tipo I, pero en menor cantidad.

En la figura 13 aparecen las heridas a los 10 días de realizadas las heridas, claramente se puede observar la malla de fibronectina en las dos heridas, abarcando no solo la línea de la herida, sino también a los costados de ella. La presencia de colágena tipo III es todavía abundante en las heridas testigo y disminuye su presencia en las heridas experimentales. La colágena tipo I es mucho más abundante en las heridas experimentales, que como ya se había observado muestran mayor madurez.

En la figura 14 se muestran las heridas a los 21 días y es evidente que la presencia de fibronectina en la dermis de las dos heridas. La colágena tipo III disminuyó en la herida experimental y es evidente la presencia de la colágena tipo I en la misma herida, no así en la herida testigo.

Pruebas de resistencia.

Para este análisis se colocaron las muestras en un tensómetro, se aplicó una fuerza de tensión para que la piel se distendiera, la presión a la cuál las heridas se separaron se registró en un manómetro. Los días que se registraron fueron 3, 4, 5, 7, 12, 14 y 17. En la figura 15, se muestra la gráfica de las presiones a las cuales las heridas testigo y experimentales se abrieron. Como se puede observar, desde el primer día de registro, las heridas experimentales muestran mayor resistencia a la fuerza de tensión. A los días 12, 14 y 17, la presión fue mayor a los 400 mmHg.

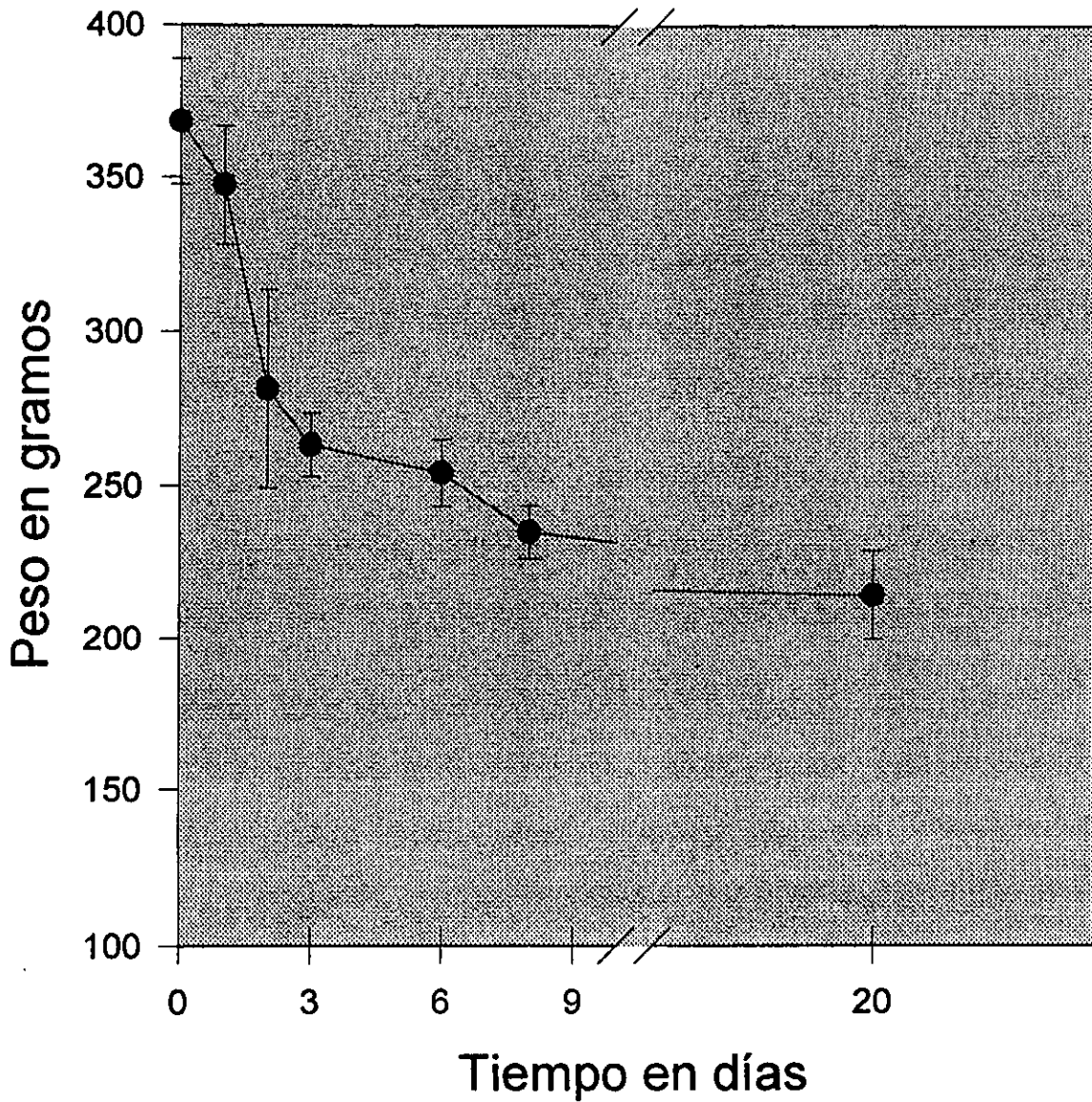


Figura 2. Gráfica de peso corporal en ratas diabéticas a partir de la inducción de la diabetes. Los datos se muestran en una gráfica de tiempo (días) contra peso (g). Cada punto de la gráfica representa el peso de 10 animales. Se observa que al término de los 20 días hay una disminución de cerca del 50% de peso corporal.

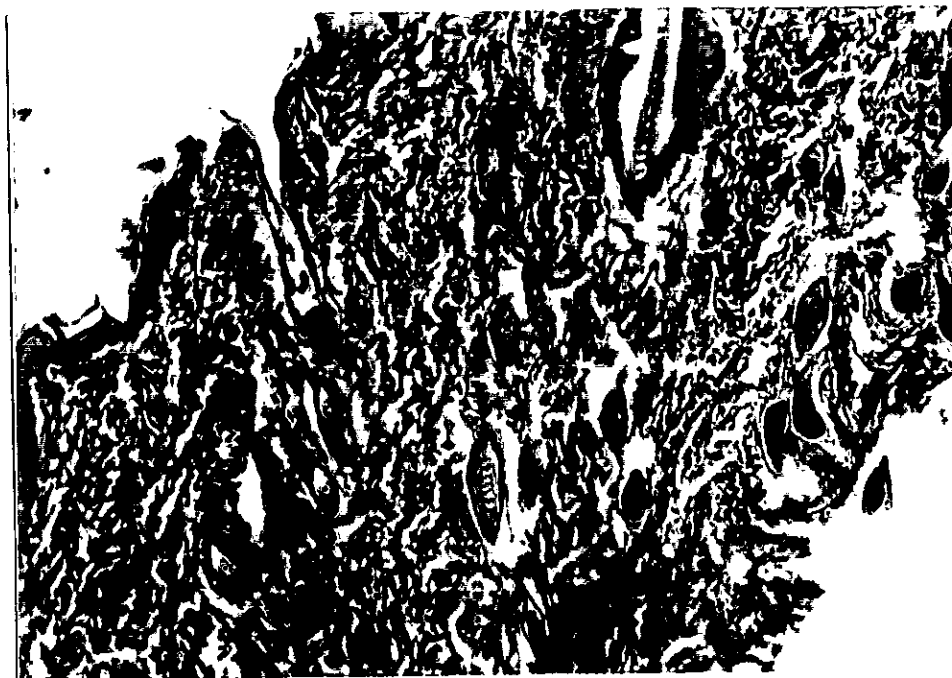


Figura 3. Fotografía de piel de rata normal. Tinción Tricrómica de Masson. Aumento 100X. Se observan la dermis estructurada con anexos cutáneos.

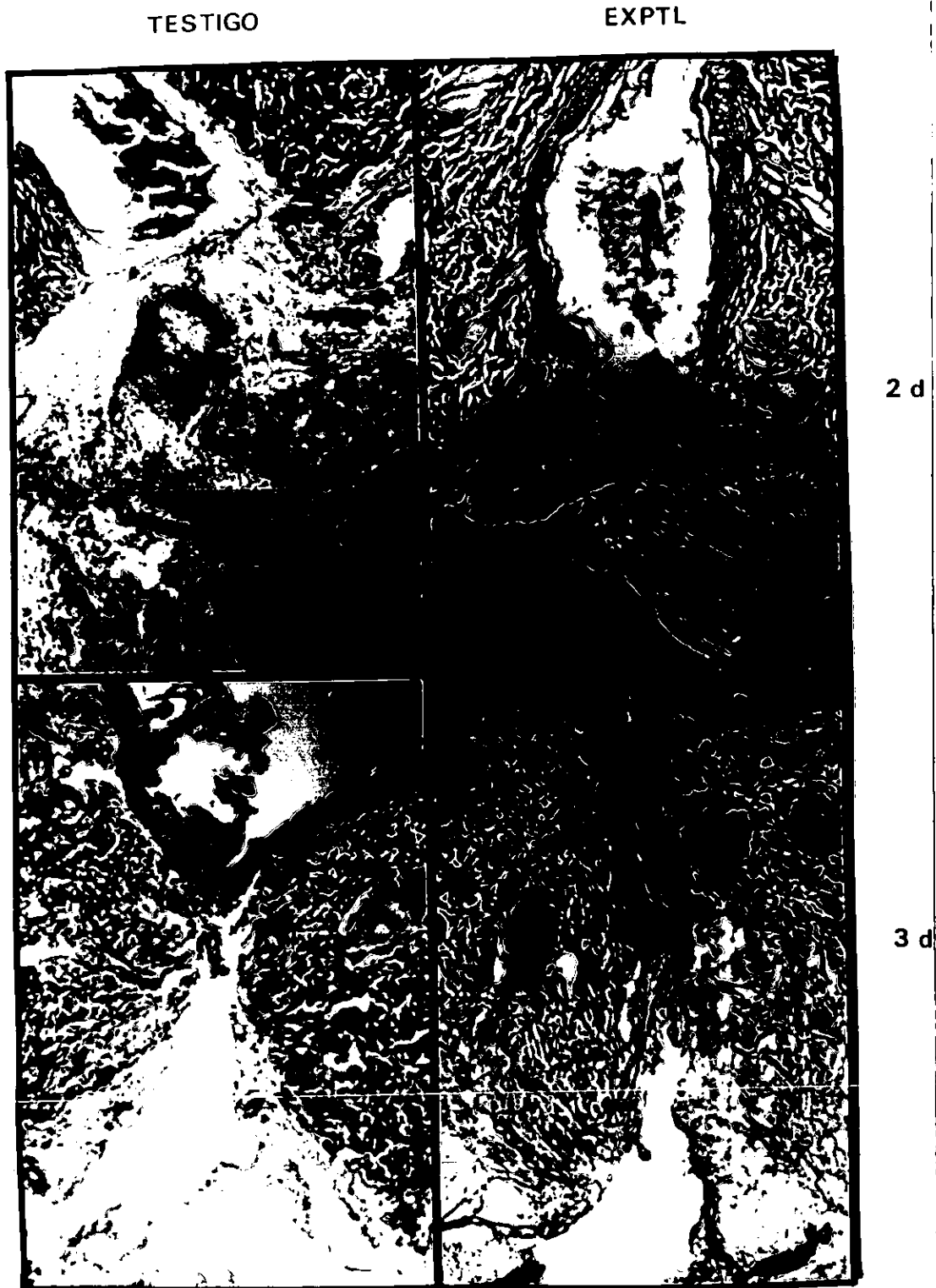


Figura 4. Fotografías de las heridas en piel de rata diabética, testigo y experimental a los días 2 y 3. Tinción Tricrómina de Masson. Aumento 126X. Se observan los núcleos en negro, citoplasma celular en gamas de rojo, fibras musculares en rojo brillante y fibras de colágena en azul y verde.

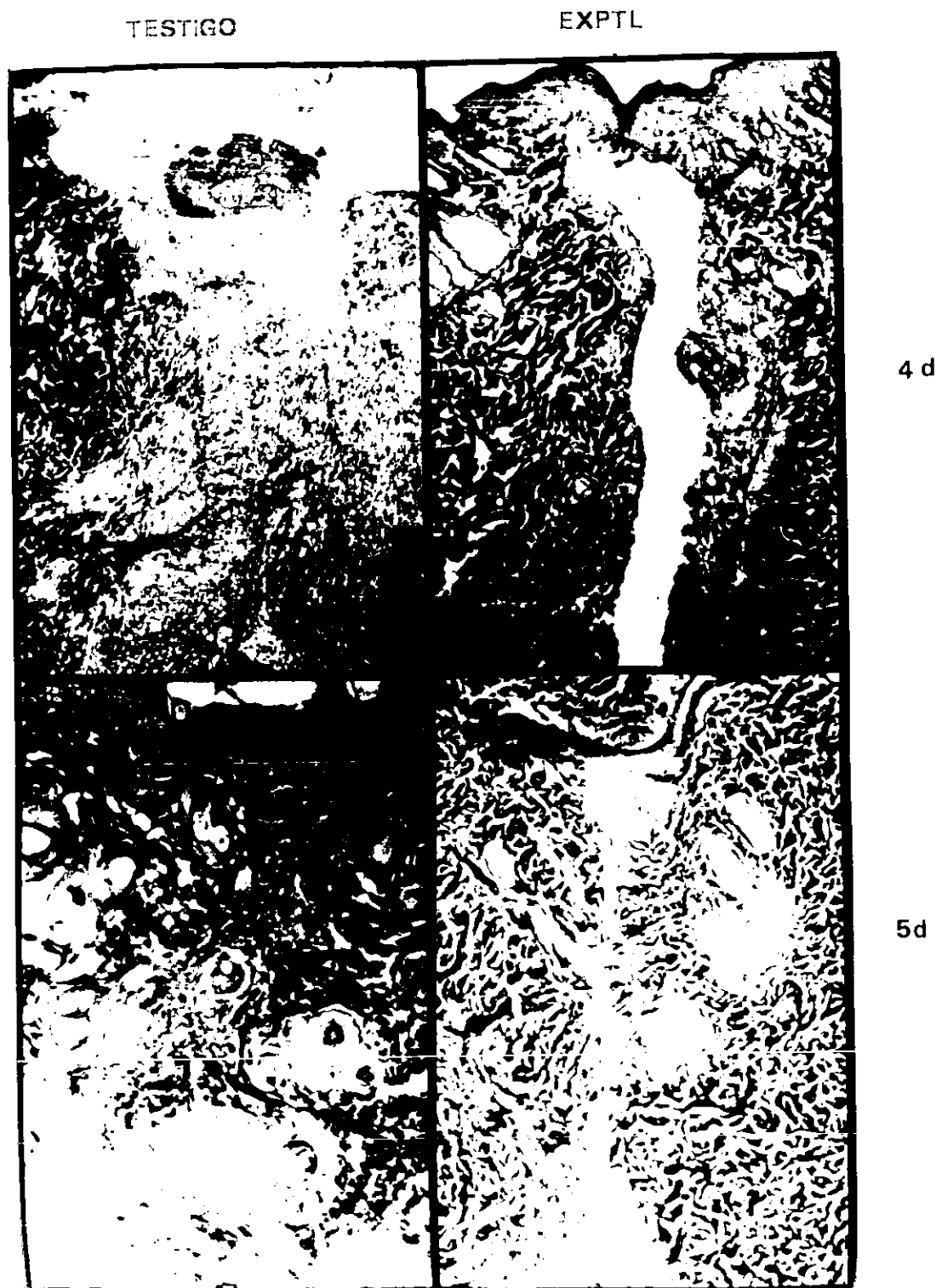
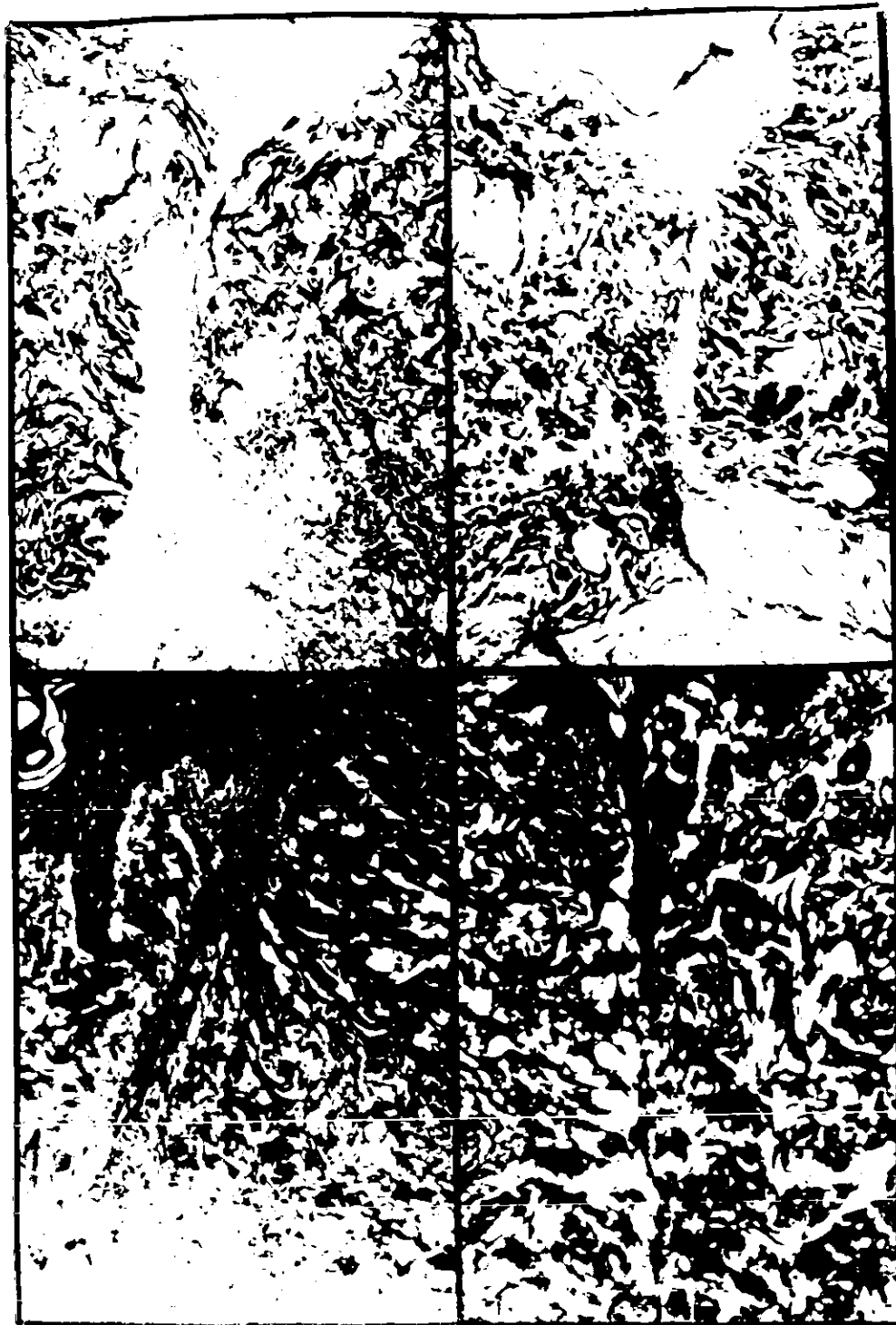


Figura 5. Fotografías de las heridas de piel de rata diabética, testigo y experimental a los días 4 y 5. Tinción Tricrómica de Masson. Aumento 126X.

TESTIGO

EXPTL



6 d

7 d

Figura 6. Heridas en piel de rata diabética, testigo y experimental a los días 6 y 7. Tinción Tricrómica de Masson. Aumento 126X.

TESTIGO

EXPTL



14 d

21 d

Figura 7. Heridas en piel de rata diabética, testigo y experimental a los días 14 y 21. Tinción Tricrómica de Masson. Aumento 126X.

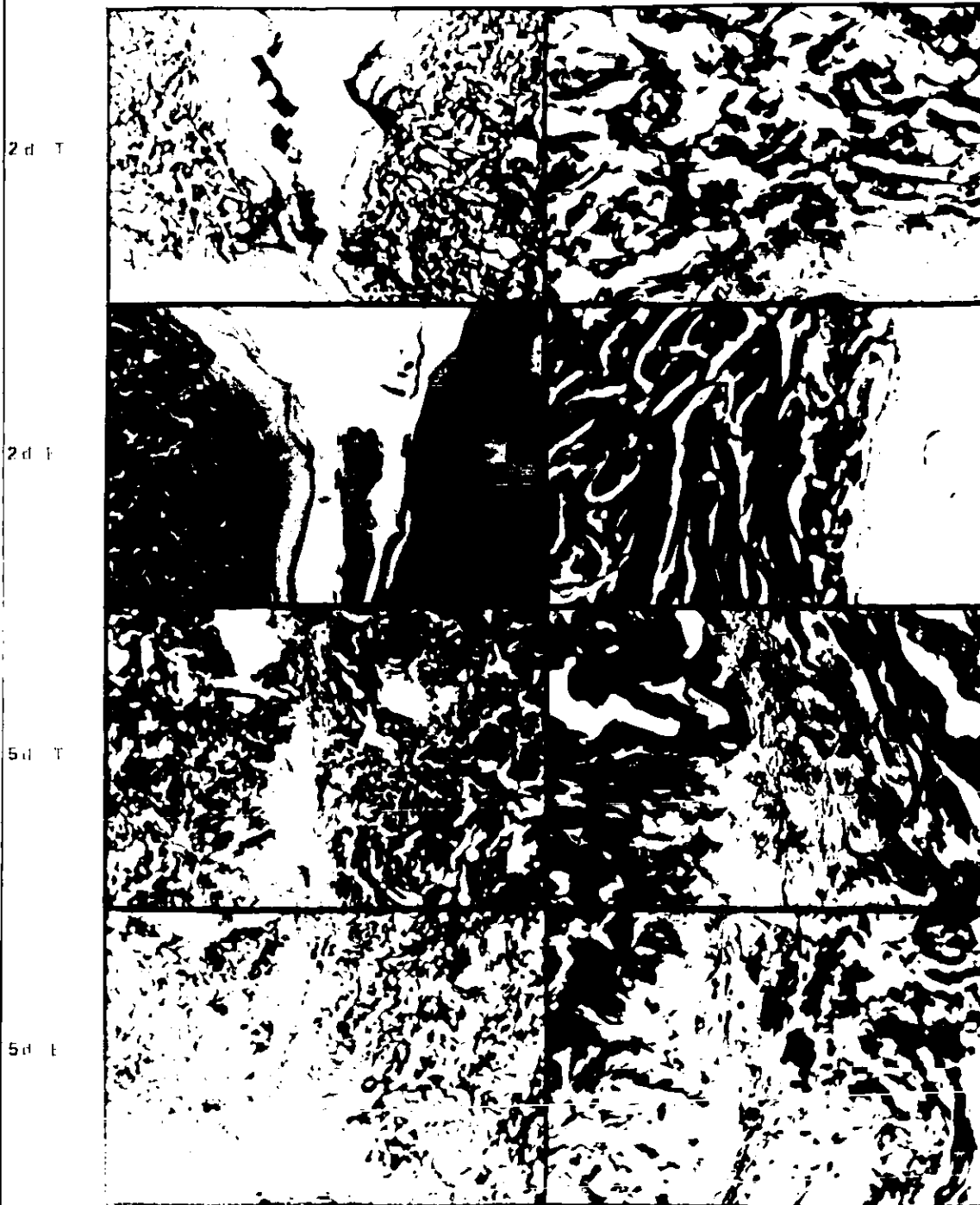


Figura 8. Heridas en piel de rata diabética, testigo y experimental a los días 2 y 5 días. Tinción de Herovici. Aumento 126X (columna izquierda) y 500X (columna derecha).

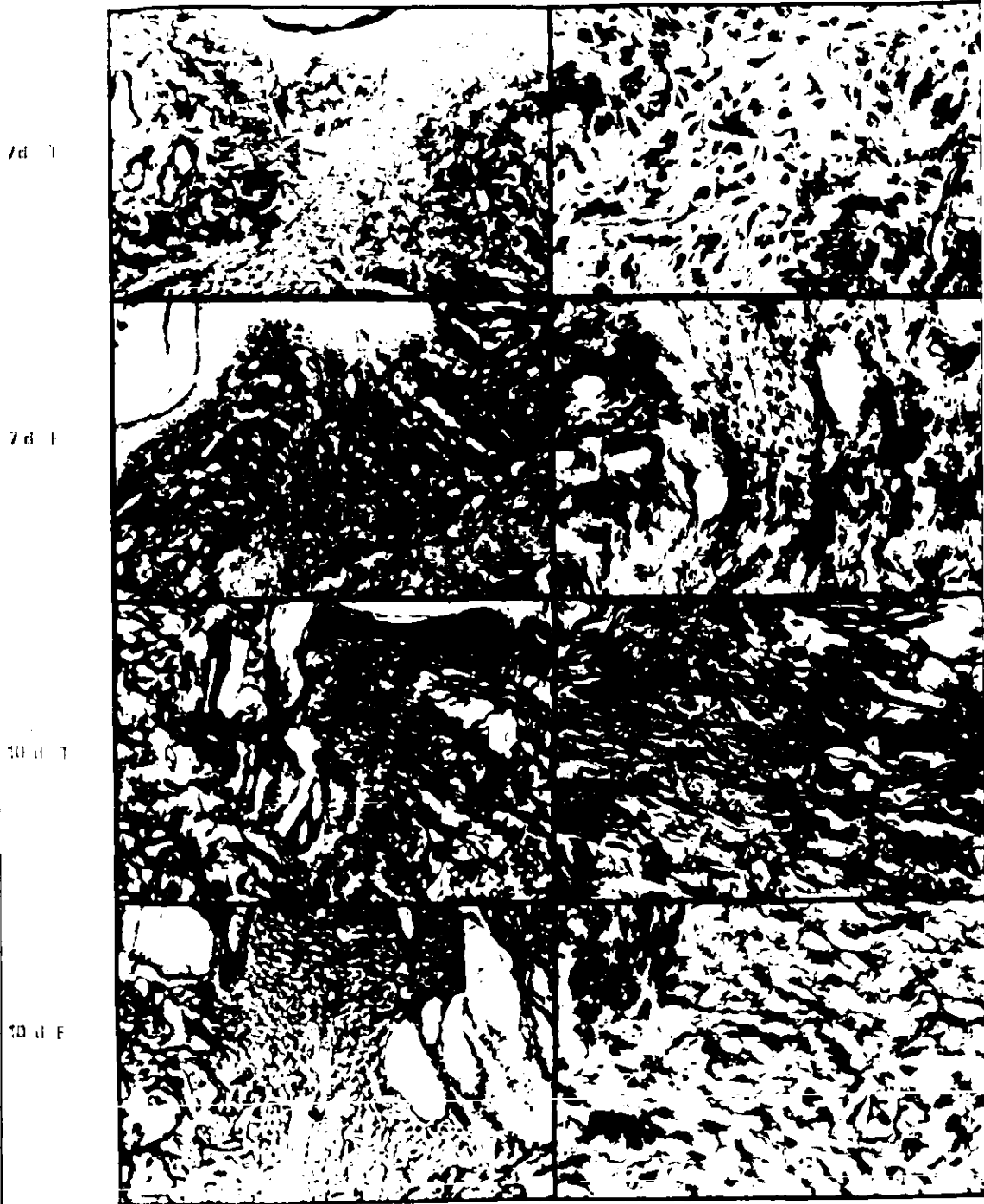


Figura 9. Fotografías de las heridas en piel de rata diabética, testigo y experimental a los días 7 y 10. Tinción de Herovici. Aumento 126X (columna izquierda) y 500X (columna derecha).

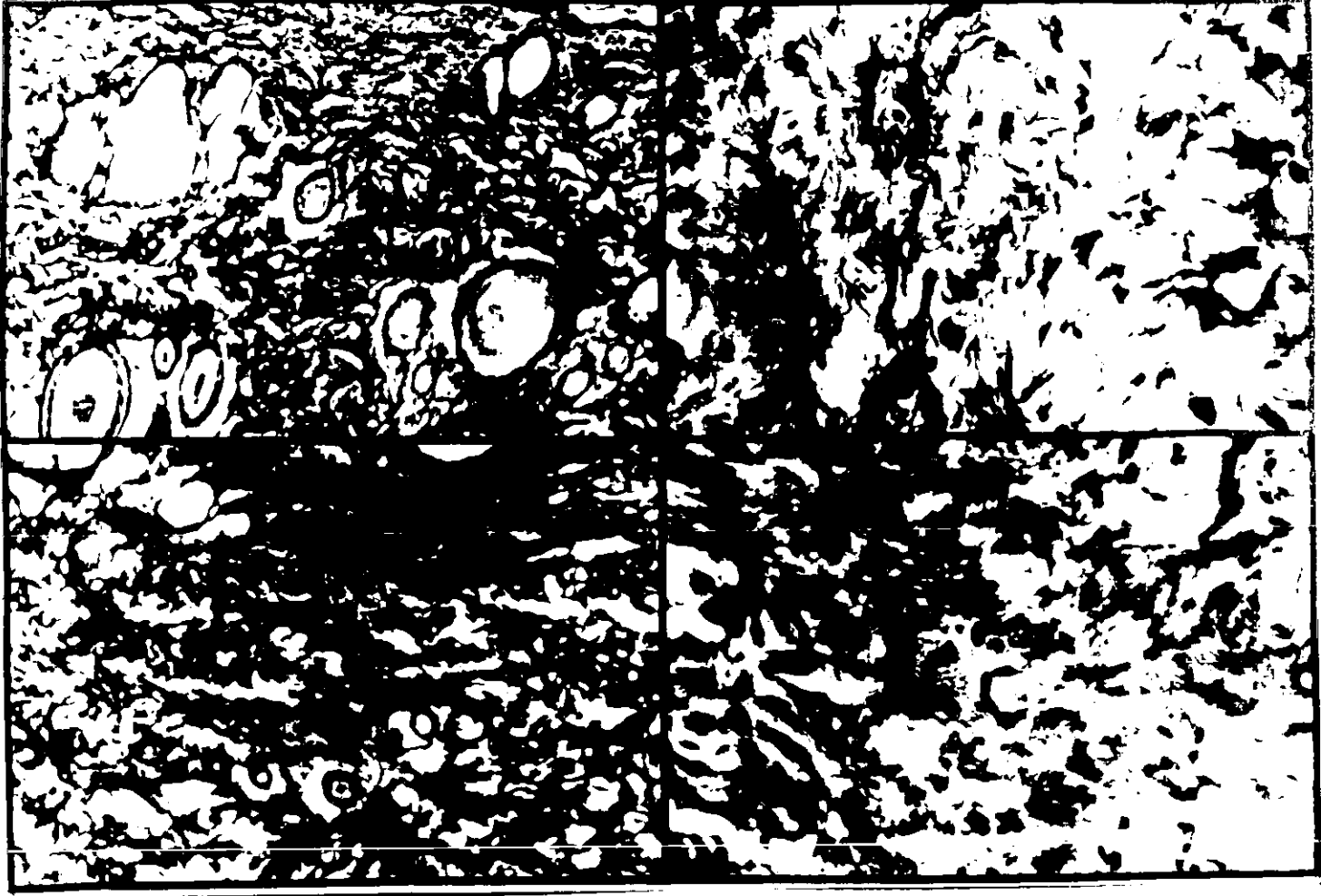


Figura 10. Heridas en piel de rata diabética, testigo y experimental al día 14. Tinción de Herovici. Aumento 126 (columna izquierda) y 500X (columna derecha).

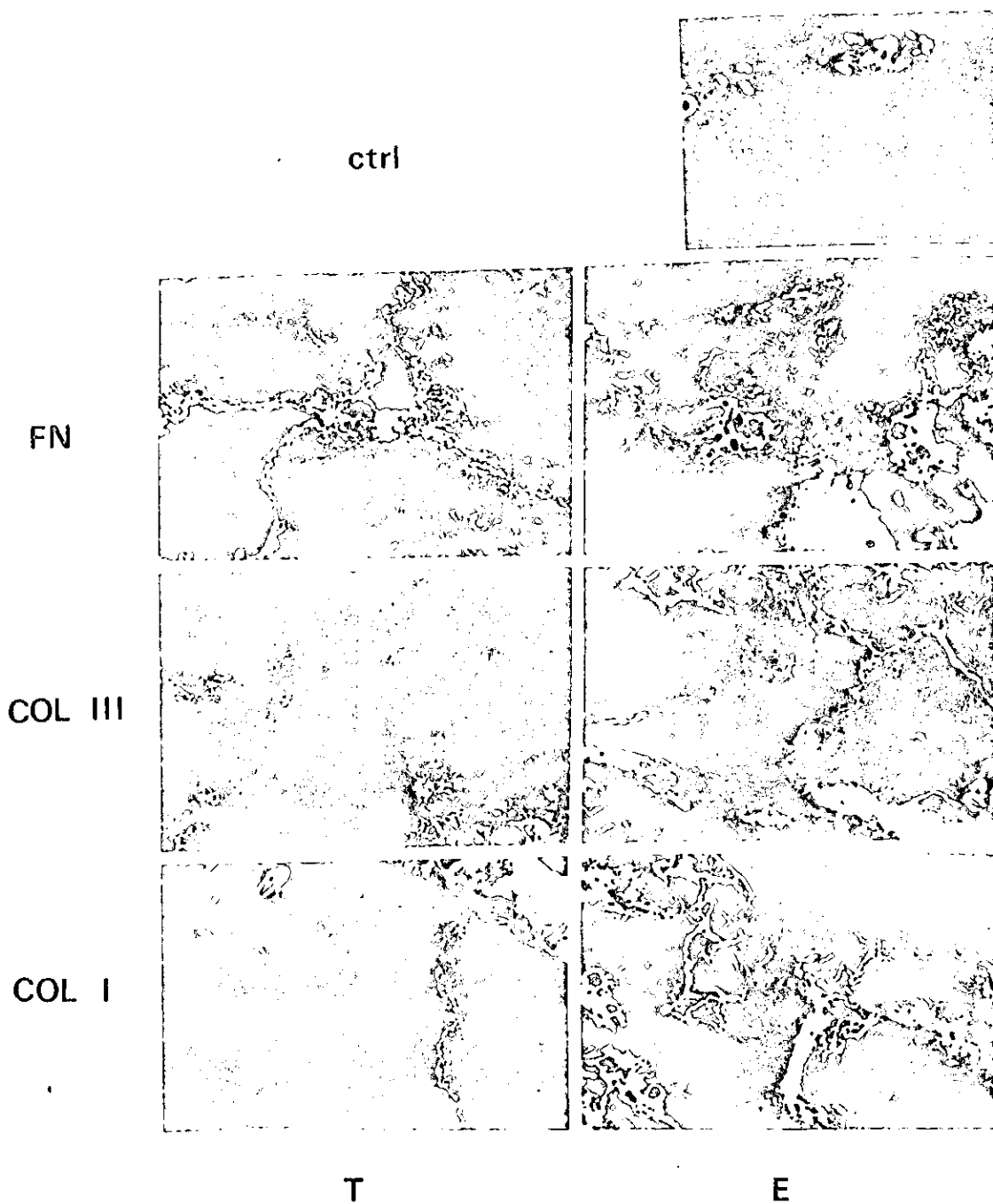


Figura 11. Fotografías de Inmunofluorescencia de las heridas en piel de rata diabética a los dos días de realizada la herida. Las proteínas que se marcaron fueron fibronectina (FN), colágena tipo I (Col I) y tipo III (Col III). Aumento 100X.

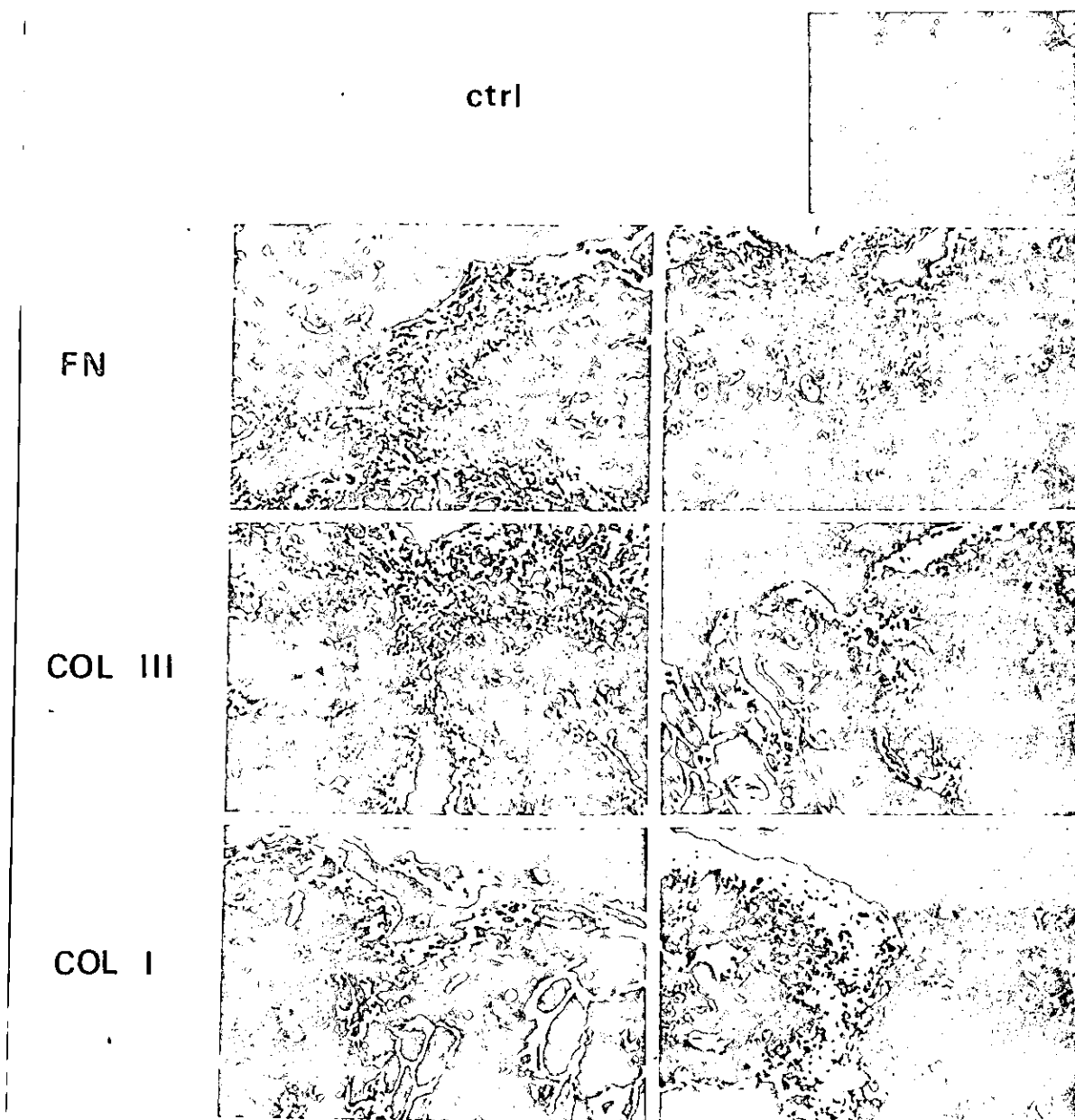


Figura 12. Fotografías de Inmunofluorescencia de las heridas en piel de rata diabética a 5 días de realizadas las heridas. Aumento 100X.

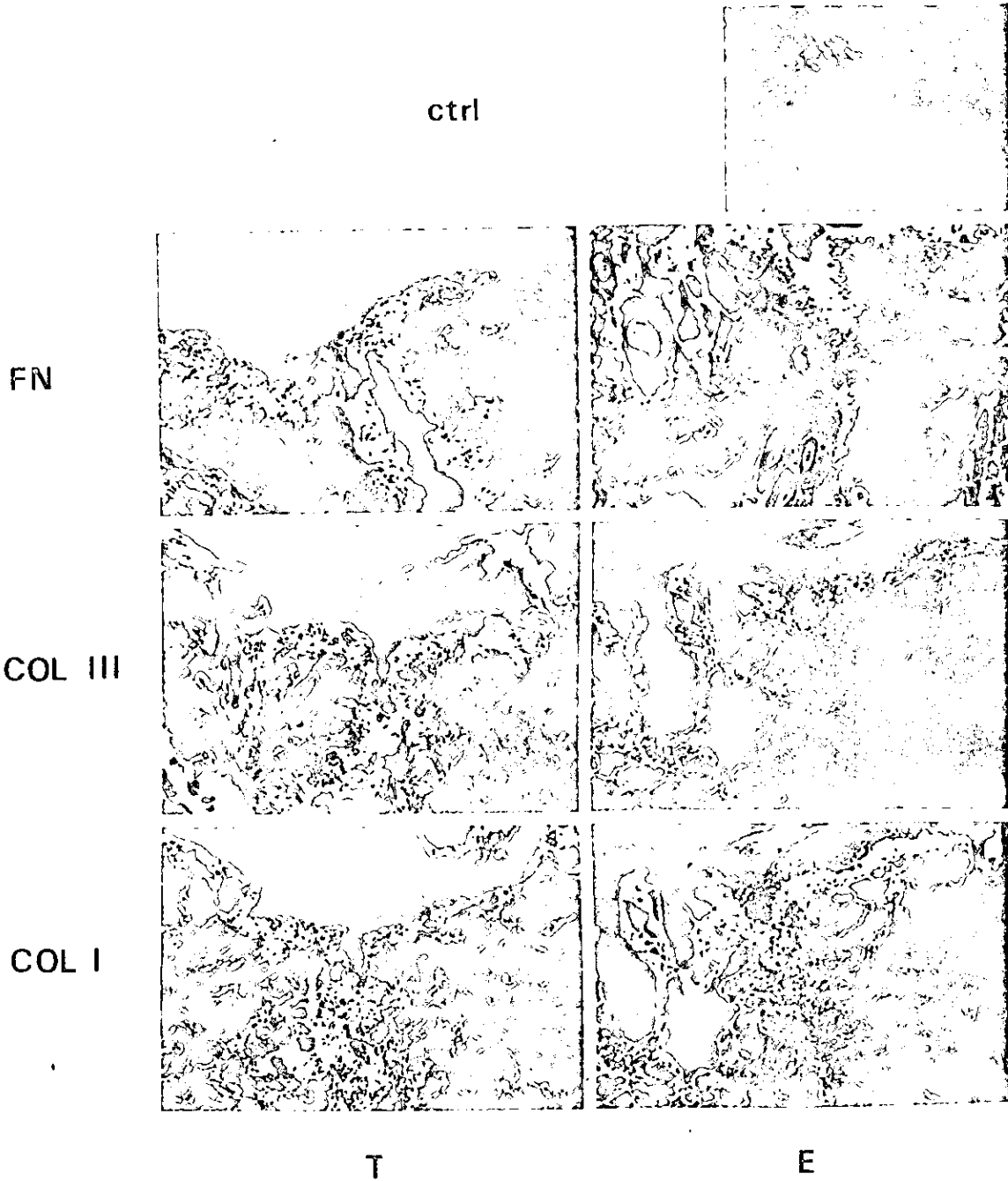


Figura 13. Fotografías de Inmunofluorescencia de las heridas en piel de rata diabética a 10 días de realizadas las heridas. Aumento 100X.

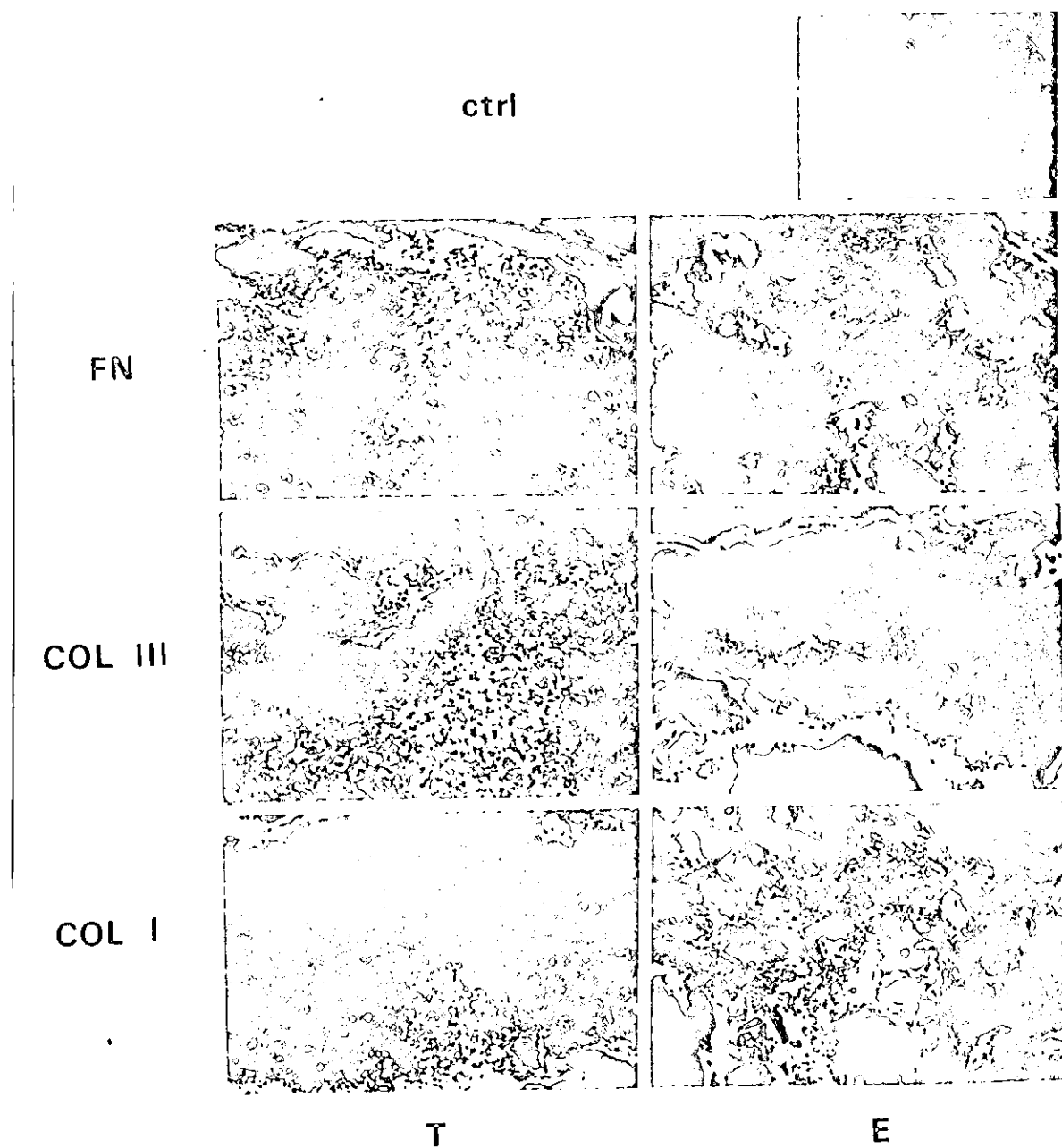


Figura 14. Fotografías de Inmunofluorescencia de las heridas en piel de rata diabética a 21 días de realizadas las heridas. Aumento 100X.

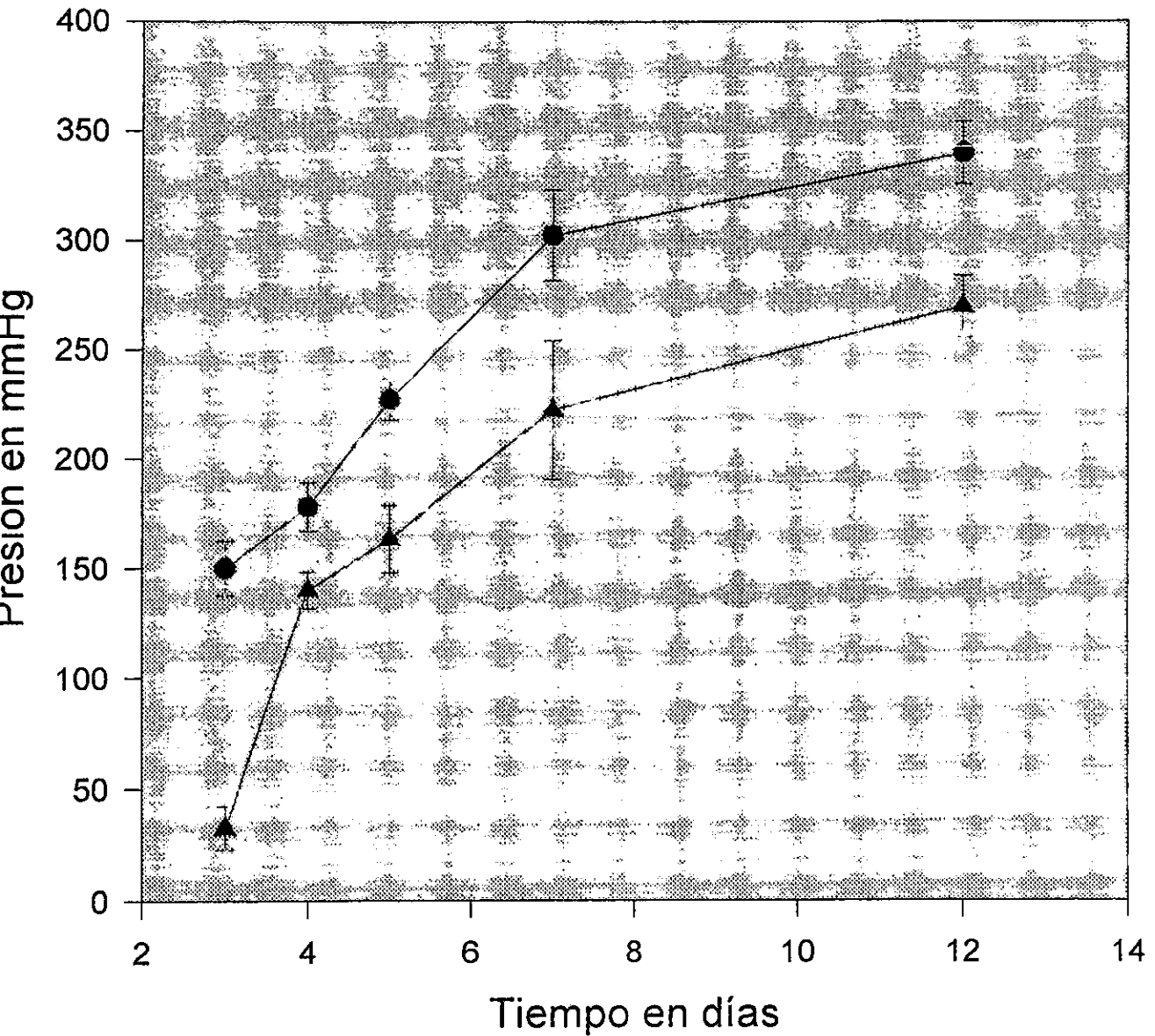


Figura 15. Gráfica de resistencia de las heridas en el dorso de las ratas diabéticas a diferentes días de realizadas las heridas y al aplicárseles una fuerza de tensión en mmHg. Los círculos corresponden a las heridas experimentales y los triángulos a las heridas testigo.

DISCUSIÓN

Es bien conocido que en la reparación de las heridas, intervienen un sinnúmero de factores complejos y dinámicos, los cuáles realizan los procesos de degradación y síntesis. Para su estudio, el proceso reparativo de una herida se ha dividido en tres fases: Inflamación, Tejido de Granulación y Remodelación (Clark et al., 1996), con lo anterior se ha podido tener un conocimiento mas detallado de los factores intrínsecos y extrínsecos que en su momento intervienen en la cicatrización; con ello también se ha buscado la forma de observar de qué forma afectan los fármacos cuando se aplican en las heridas inmediatamente o durante los procesos de cicatrización. Parte de estos estudios es la aplicación de la mezcla PEG-DMSO en ratas normales y se realizaron estudios histológicos e inmunofluorescencias. Se ha observado a las 24 horas de haber hecho la herida, las heridas tratadas con PEG no presentan tejido de granulación o se reduce de manera considerable, no se manifiesta una respuesta inflamatoria aparente, la epidermis se encuentra anatómicamente semejante a la piel normal y los anexos cutáneos están presentes en las regiones cercanas a la herida. A diferencia de la control, en la que a los cuatro días el tejido de granulación es conspicuo. Ya a los 14 días la herida experimental muestra un aspecto muy cercano al normal, no hay fibrosis y la estructura de las fibras de colágena es en pequeños bloques condensados y entrecruzados como se observa en la piel normal, mientras que en las heridas testigo las fibras de colágena son uniformes y se encuentran paralelas a la epidermis. Las pruebas de resistencia realizadas en ratas normales mostraron que las heridas tratadas con PEG son más resistentes al aplicar una fuerza de tensión; a los 7 días, las heridas experimentales se separan a los 340mm de Hg, mientras que las heridas testigo se separan a los 250mm

de Hg \pm DS. Se comprobó que la fuerza de tensión es mayor en las heridas experimentales que en las heridas testigo, lo que corrobora lo observado en las histologías; estos resultados fueron motivo para realizar pruebas de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos y obtener evidencia de el efecto del PEG a nivel de tejido, célula o subcelular. De tales pruebas se obtuvo que en tiempos de 12 a 72 horas, las respuestas de colágena I y III y de laminina, no son significativas, ya que no se observa marca ni en las heridas experimentales ni en las control, en cambio, la respuesta de fibronectina es muy evidente de manera que se observa una marcada diferencia entre experimentales y controles desde las primeras horas de la prueba (12 horas); a las 72 horas se observó además que en la zona de la herida se incrementó la presencia de fibronectina lo que influye en gran medida para la migración de células hacia la zona de la herida (Greiling et al., 1997).

De este estudio en ratas normales se concluyó que la estructuración de la herida tratada con PEG es mas rápida y consistente de manera que en las ratas a los cinco días la herida está prácticamente resuelta (Guerrero Padilla 1994).

En el caso de nuestro estudio en ratas diabéticas, el primer objetivo se cumplió al permanecer la hiperglucemia en las ratas después de la dosis de estreptozotocina. La hiperglucemia permaneció durante todo el experimento, los animales alcanzaron niveles de glucosa en sangre arriba de los 400 mg/dl, 300 mg más que el nivel normal (Mordeers et al., 1981). A pesar de que se considera a la estreptozotocina como un inductor de la diabetes, decidimos monitorear el peso corporal de las ratas, otro parámetro indicativo del padecimiento. Se observó que a los 20 días de la inducción de la diabetes las ratas tienen la mitad del peso inicial, siendo que las ratas se encuentran en etapa de crecimiento (8 semanas); esta pérdida de

peso es otro indicador de que las ratas están en un estado diabético, aunado a esto, se observó poliuria, polifagia y polidipsia en el cuidado cotidiano de los animales.

En cuanto a nuestros estudios en cicatrices de ratas diabéticas, las histologías muestran una mejor resolución tanto a nivel celular como a nivel de matriz extracelular. La epidermis se muestra de aspecto más cercano al normal, contrariamente a la que se observa en las heridas testigo, su epidermis es de mayor grosor; y como se observó en los estudios en ratas normales, las fibras de matriz extracelular, principalmente colágena, muestran una estructura de tipo normal, además el infiltrado celular es mucho menor. A los 21 días la herida experimental tiene menor fibrosis y mayor proporción de colágena bien estructurada como se observa en las tinciones de Herovici a mayor aumento. Estos resultados se corroboran con las inmunohistoquímicas, en donde se analizaron tres diferentes proteínas de matriz extracelular y que son indicativos de la evolución de la cicatrización. Se puede comprobar que la colágena tipo I aparece antes y en mayor proporción en las heridas experimentales, lo que implica maduración de la herida; así como también es evidente que los tres tipos de proteínas analizados se presentan con anticipación en las heridas con PEG. Como ya se ha mencionado, la presencia temprana de fibronectina favorece el flujo de células a la herida, así como el depósito de colágena, la opzonización y quimiotaxis durante el proceso cicatrizal (Grinnell et al., 1981).

En general se puede observar que a cualquier día de analizadas las heridas, las heridas experimentales muestran una mejor resolución.

Finalmente, las pruebas de tensión muestran que la resistencia de las heridas experimentales es mayor que las heridas testigo, lo que se explica con la orientación de las fibras de matriz extracelular y el tipo de colágena depositado en la herida. Estos resultados nos llevan a pensar que el PEG

acelera el proceso cicatrizal en la piel de las ratas diabéticas, inclusive comparable con la cicatrización en ratas normales.

La discusión en cuanto a la acción del PEG en la cicatrización es aún muy amplia ya que no existen otros estudios en donde se analice el efecto del PEG en la cicatrización, además, la patología que se presenta en la diabetes tiene muchas consecuencias en el proceso cicatrizal. Hemos visto que el PEG al momento de aplicarlo es vasodilatador, lo que provee a la herida un número considerable de células que normalmente en la diabetes tardarían más en llegar por las complicaciones de la microangiopatía; esto, no solo ayuda a acelerar el proceso de cicatrización, sino que también mantiene a la herida con menor número de agentes extraños (Clark et al., 1996). También se ha propuesto que el PEG actúa como cementante, en primer lugar a nivel de la epidermis, lo que facilitaría el proceso de mensajes que se desencadena a partir de la unión de las células que previamente sufrieron una ruptura en sus desmosomas como se explicó en la introducción (Hatz et al., 1994). Otra hipótesis que nos ayuda a entender el efecto del PEG, es que si actúa como cementante, el proceso reparativo ya no tendría que rellenar huecos, sino tendría que resolver la herida en un espacio más reducido, con menor número de células y menor número de proteínas, lo que facilitaría también una reestructuración de las fibras de matriz extracelular con aspecto muy cercano al normal.

Estamos, de alguna manera, forzando a la herida a que cierre al momento de suturar y nos valemos de un medio físico (suturas) y un medio químico (PEG) que no permanece mucho tiempo en la herida, ya que el mismo proceso cicatrizal se encarga de limpiar el resto de PEG.

En conjunto, esto explicaría porqué el proceso cicatrizal es más rápido aplicando el PEG, esto es, porqué aparecen proteínas de matriz extracelular en menor tiempo en las heridas experimentales,

porqué la epidermis muestra un aspecto más normal y porqué las heridas con PEG son más resistentes al aplicárseles una fuerza de tensión.

PERSPECTIVAS

Los resultados que se muestran en este trabajo sugieren que la aplicación tópica del PEG en las heridas de tipo quirúrgico en piel de ratas diabéticas, acelera el proceso cicatrizal influyendo en el depósito de las proteínas que participan en el proceso reparativo, la resolución de la herida y la resistencia. Un estudio importante, sería aplicar el PEG tritado en animales vivos para conocer su destino en la piel y su acción como cementante. Es importante conocer el mecanismo de acción del polietilenglicol, por lo que este estudio da la pauta para una investigación más profunda a nivel molecular y facilitar la aplicación del PEG en personas que padecen la diabetes. Las principales moléculas que se estudiarían serían factores de crecimiento como el PDGF, TGF- β y FGF, ya que son estos los que participan fuertemente en el depósito de matriz extracelular y son mitógenos para tipos celulares ampliamente activos en la reparación. También es de importancia el estudio de las integrinas que se presentan a lo largo de la cicatrización, para estudiar la adherencia entre la matriz extracelular y los diferentes tipos celulares.

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. *Molecular Biology of the Cell*. 3ª. Edición. Garland Publishing Inc, Nueva York y Londres 1994.

Arenas R. La piel: Sus Principales Características y Funciones. *ICYT* 1990. 12: 18-24.

Bailey A. J., Sims T. J., Avery N. C., Halligan E P. Non-enzymic Glycation of Fibrous Collagen: Reaction Products of Glucose and Ribose. *Biochem. J.* 1995. 305:385-390.

Baker L. L., Chambers R., DeMuth S. K., Villar F. Effects of Electrical Stimulation on Wound Healing in Patients with Diabetic Ulcers. *Diabetes Care* 1997. 20:405-412.

Bennett N. T., Schultz G. S. Growth Factors and Wound Healing: Biochemical Properties of Growth Factors and Their Receptors. *The American Journal of Surgery* 1993. 165:728-737.

Betteridge D. J. Diabetes, Lipoprotein metabolism and Atherosclerosis. *British Medical Bulletin* 1989. 45: 285-307.

Bissel M J., Barcellos-Hoff M. H. The Influence of Extracellular Matrix on Gene Expression: Is Structure the Message?. *J. Cell Sci.* 1987. 8: 327-343.

Borel J. P., Marquart F. X. La Cicatrización. *Mundo Científico* 1996.119:1188-1195.

Bottazzo F. G., Bosi E., Bonifacio E., Mirakian R., Todd I., Pujol-Borrell R. Pathogenesis of Type I (Insulin-Dependent) Diabetes: Possible Mechanisms of Autoimmune damage. *British Medical Bulletin* 1989. 45: 37-58.

Bradbury P., Gordon K. C. Connective Tissues and Stains, cap 8 en *Theory and Practice of Histological Techniques*. Bancroft J.D. Stevens A. Eds. 3ª edición. Churchill Livingstones. Estados Unidos de América 1990.

Burgos M., Martínez J. C. *La Rata de Laboratorio*. Universidad Nacional Autónoma de México 1984.

- Calvin R. B., Fibronectin in wound healing, cap 8 en *Fibronectin*. Mosher D. F., ed. Acad. Press. Inc. Londres 1989.
- Clark R. F. A. Wound Repair: Overview and General Considerations, cap 1 en *The molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Clark R. A. F ed. 2ª edición. Plenum Press, Nueva York 1996.
- Cohen I. K., Diegelmann R. F., Crossland M. C. Wound Care and Wound Healing, cap. 8 en *Principles of Surgery*. Sexta edición. Schwartz S. I., Shires G. T., Spencer F. C., eds. McGraw-Hill 1994.
- Cohen M. P., Clements R. S., Cohen J. A., Shearman C. W., Glycated Albumin Promotes a Generalised Vasculopathy in the db/db Mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996. 218:72-75.
- Davidson J. M. Proteinases in Wound Repair, cap. 1 en *Proteolysis in Wound Repair*. Abatangelo G., Donati L., Vanscheidt W. eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania 1996.
- Derewenda U., Derewenda Z., Dodson G.G., Hubbard R. E., Korber F. Molecular Structure of Insulin: The Insulin Monomer and its Assembly. *British Medical Bulletin* 1989. 45:4-18.
- Dheeraj L., Harold P. Intestinal Adaptation in Diabetes: Amino Acid Absorption. *American Journal of Physiology* 1974. 227:827-831.
- Drury P. L., Watkins P. J., Viberti G. C., Walker J. D. Diabetic Nephropathy. *British Medical Bulletin* 1989. 45:127-148.
- Eckersley J.R. T., Dudley H. A. F., Wounds and Wound Healing. *British Medical Bulletin* 1989. 45:423-436.
- Eckert R. L. The Structure and Function of Skin, cap. 1 en *Pharmacology of the Skin*. Mukhtiar H., ed. CRC. Estados Unidos 1992.
- Eckes 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. 2ª edición. Plenum Press, Nueva York 1996.
- Fernández-Mejía C. Biología Molecular de la Diabetes mellitus de la Edad Adulta. *Endocrinología y Nutrición* 1996. 4:55-62.
- Flores-Sánchez M. L. Análisis Comparativo de dos Métodos Farmacológicos para la Inducción de Diabetes Mellitus en Ratas. Tesis para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México* 1995.
- Frank S., Hubner G., Breier G., Longaker M. T., Greenhalgh D. G., Werner S. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Cultured Keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1997. 121: 12607-12613.
- Galfre G. Antibodies to Major Histocompatibility Antigens Produced by Hybrid Cell Lines. *Nature* 1977. 266:550-552.
- 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 ed. 2ª edición. Plenum Press, Nueva York 1996.
- Garciadiego-Cázares D., Díaz de León L. Aislamiento y Caracterización de Biomatrices Obtenidas de Hígados de Ratas Normales y Cirróticas, y su Efecto Como Sustrato en Cultivos Primarios de Hepatocitos. Tesis para obtener el grado de Biólogo. *Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México*. 1994.
- 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. *J. Clin. Invest.* 1987. 79:1254-1258.
- Greiling D., Clark R. A. F. Fibronectin Provides a Conduit for Fibroblast Transmigration from Collagenous Stroma into Fibrin Clot Provisional Matrix. *Journal of Cell Science* 1997.110:861-870.
- Grinnell F., Billingham R. E., Burges L. Distribution of Fibronectin During Wound Healing in Vivo. *The Journal of Investigative Dermatology* 1981. 76:181-189.
- Grotendorst G. R., Martin G. R., Pencev D., Sodek J., Harvey A. K. Stimulation of Granulation Tissue Formation by Platelet-derived Growth Factor in Normal and Diabetic Rats. *J. Clin. Invest.* 1985. 76: 2323-2329.
- Guerrero-Padilla E., González-Ramírez J., Tovalín-Ahumada A., González-Allende E. Cicatrización Acelerada Producida por Polietilenglicol. *Arch. Invest. Med.* 1984. 15:280-286.
- Haslett C., Henson P. Resolution of Inflammation, cap 4 en *The molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Clark R. A. F ed. 2ª edición. Plenum Press, Nueva York 1996.
- Hatz R. A., Niedner R., Vanscheidt W., Westerhof W. *Wound Healing and Wound Management*. Springer-Verlag-Berlin Heidelberg. Alemania 1996.
- Hennesey P. J., Black C. T., Audressey R. J. Epidermal Growth Factor and Insulin Act Synergistically During Diabetic Healing. *Arch. Surg.* 1990. 125:926-929.
- Herovici C. Polychrome Stain for Differentiation Precollagen from Collagen. *Stain Technology* 1963. 38: 204-205.
- Herrera- Juárez A. Influencia de la Duración de la Diabetes sobre las Alteraciones Patológicas en Páncreas y Riñón de Ratas Inducidas con Estreptozotocina. Tesis para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México* 1995.
- Howell S. L., Bird G. St J. Biosynthesis and Secretion of Insulin. *British Medical Bulletin* 1989. 45:19-36.
- Janeway C. A. How the Immune System Recognizes Invaders. *Scientific American* 1993. 41-47.
- Johnston C. Diabetic Skin and Soft Tissue Infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1994. 7: 214-218.
- Kamal K., Powell R. J., Sumpio B. E. The pathobiology of Diabetes Mellitus: Implications for Surgeons. *Journal of the American College of Surgeons* 1996. 83: 271-289.
- Kennedy L., Lyons T. J. Non-enzymatic glycosylation. *British Medical Bulletin* 1989. 45:174-191.
- Knutton S. Studies of Membrane Fusion. III. Fusion of Erythrocytes with Polyethylene Glycol. *J. Cell. Sci.* 1979. 36:61.72.
- Kohner E. M. Diabetic Retinopathy. *British Medical Bulletin* 1989. 45:148-170.
- Lal D., Schedl H. P. Intestinal Adaptation in Diabetes: Amino Acid Absorption. *American Journal of Physiology* 1974. 227:827-831.
- Lehninger., Nelson D. L., Cox M. M. eds. *Principios de Bioquímica*. Segunda Edición. Worth Publishers 1993. P.p. 479-503.
- Lever W. F. Histology of the Skin, cap 3 en *Histopathology of the Skin*. Séptima edición, J. B. Lippincott Company. Estados Unidos 1990.

- Lydyard D., Grossi C. Cells Involved in Immune Response, cap 2 en *Immunology*. Roitt I., Brostoff J., Male D. eds. 3ª edición. Mosby, Inglaterra 1993.
- Madri J. A., Sankan S., Romanic A. M. Angiogenesis cap 11 en *The molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Clark R. A. F ed. 2ª edición. Plenum Press, Nueva York 1996.
- Meddahi A., Caruelle J. P., Golg L., Rosso Y., Barritault D. New concepts in Tissue Repair: Skin as an Example. *Diabetes and Metabolism* 1996. 22: 274-278.
- Mellin T. N., Cashen D. E., Ronan J., Murphy B. S., DiSalvo J., Thomas K. A. Acidic Fibroblast Growth Factor Accelerates Dermal Wound Healing in Diabetic Mice. *The Journal of Investigative Dermatology* 1995. 104: 850-855.
- Meyer J. S. Diabetes and Wound Healing. *Critical Care Nursing Clinics of North America* 1996. 8:195-201.
- Miller D. L. What to Do With a Diabetic Rat. *Lab Animal* 1979. Septiembre 32-40.
- Morders J. P., Rossini A. A. Animal Models of Diabetes. *The American Journal of Medicine* 1981. 70:353-360.
- Morris P. J., Gray D. W., Sutton R. Pancreatic Islet Transplantation. *British Medical Bulletin* 1989. 45: 224-242.
- Mukerjee M. Trends in Animal Research. *Scientific American*, February 1997. 70-77.
- O'Keefe E. J., Woodley D. Payne R. E., Russel N. Spreading and Enhanced Motility of Human Keratinocytes on Fibronectin. *J. Invest. Dermatol.* 1985. 85:125-130.
- Paul R. G., Bailey A. J. Glycation of Collagen: the Basis of its Central Role in the Late Complications of Ageing and Diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1996. 28:1297-1310.
- Pérez Tamayo Ruy. *Introducción a la Patología*. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. México 1987. P. p. 509-521.
- 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.
- Pontecorvo G. Production of Indefinitely Multiplying Mammalian Somatic Cell Hybrides by Polyethylenglicol (PEG) Treatment. *Somatic Cell Genet.* 1975. 1:397-400.
- 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.
- Reiser K. M. Nonenzymatic Glycation of Collagen in Ageing and Diabetes. *Society for Experimental Biology and Medicine* 1990. 29:17-29.
- Riches D. W. H. Macrophage Involvement in Wound Repair, Remodelling and Fibrosis, cap. 3 en *The molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Clark R. A. F ed.. 2ª edición. Plenum Press, Nueva York 1996.
- Rowan A. N. The Benefits and Ethics of Animal Research. *Scientific American*, February 1997.63-64.
- Schäffer M. R., Tantry U., Efron P. A., Ahrendt G. M., Thornton F. J., Barbul A. Diabetes-impaired Healing and Reduced Wound Nitric Oxide Synthesis: A Possible Pathophysiologic correlation. *Surgery* 1997. 121:513-519.
- Schultz G., Rotatori D. S., Clark W. EGF and TGF- β in Wound Healing and Repair. *Journal of Cellular Biochemistry* 1991.45:346-352.

- Spanheimer R. G. Correlation Between Decreased Collagen Production in Diabetic Animal and in Cells Exposed to Diabetic Serum: Response to Insulin. *Matrix* 1992. 12:101-107.
- Stenn K. S. The Skin en *Histology, Cell and Tissue Biology*. Weiss L. De. Elsevier Biomedical. Nueva York 1983.
- Taubol R., Rifkin D. B. Recombinant Basic Fibroblast Growth Factor Stimulates Wound Healing in Wound Healing Impaired db/db Mice. *J. Exp. Med.* 1990. 172:245-251.
- Tooke J. E. Microcirculation and Diabetes. *British Medical Bulletin* 1989. 45:423-436.
- Verhofstad M. H. J., Hendriks T. Complete Prevention of Impaired Anastomotic Healing in Diabetic Rats Requires Preoperative Blood Glucose Control. *British Journal of Surgery* 1996. 83:1717-1721.
- Vlodavsky I., Folkman J., Sullivan R., Fridman R., Ishai-Michaeli R., Sasse J., Klagsbrun M. Endothelial Cell Derived Basic Fibroblast Growth Factor: Synthesis and Deposition Into Subendothelial Extracellular Matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987. 84: 2282-2290.
- Vyalov S., Langille B. L., Gotlieb A. I. Decreased Blood Flow Rate Disrupts Endothelial Repair in vivo. *American Journal of Pathology* 1996. 149:2107-2118.
- Walker J. D., Viberti G. C. Pathophysiology of Microvascular Disease: An Overview. cap 53 en *Textbook of Diabetes*. Pickup J., Williams G. eds. Blackwell Scientific Publications. Inglaterra 1991.
- Ward J. D. Diabetic Neuropathy. *British Medical Bulletin* 1989. 45:111-126.
- Wingerd B. D. *Rat Dissection Manual*. The Johns Hopkins University Press. Estados Unidos 1988.
- Woodly D. T. Reepithelialization, cap. 10 en *The molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Clark R. A. F. ed. 2ª edición. Plenum Press, Nueva York 1996.