

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



EVALUACION DEL USO TERAPEUTICO DEL FACTOR
DE NECROSIS TUMORAL, FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDERMICO E INSULINA SOBRE EL PROCESO DE
CICATRIZACION EN LESIONES CAUSADAS POR LA
REACCION DE SHWARTZMAN EN LA PIEL DE
CONEJOS DIABETICOS

T E S I S

QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

PRESENTA:

M.V.Z. RODOLFO NIÑO FONG

MONTERREY, N. L.

NOVIEMBRE DE 1998

TM

RC660

N5

c.1



1080087045

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ESTIMACIÓN DEL NBO TERAPÉUTICO DEL FACTOR
DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO, FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDERMICO E INSULINA SOBRE EL PROCESO DE
CICATRIZACIÓN EN LESIONES CAUSADAS POR LA
REACCIÓN DE SHWARTZMAN EN LA PIEL DE
CONEJOS DIABÉTICOS

T E S I S

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGÍA

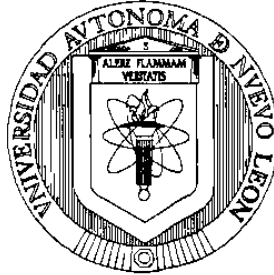
PRESENTA:

M.V.Z. RODOLFO ENO FONG

MONTERREY, N. L.

NOVIEMBRE DE 1998

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EVALUACION DEL USO TERAPEUTICO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL,
FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO E INSULINA SOBRE EL PROCESO DE
CICATRIZACION EN LESIONES CAUSADAS POR LA REACCION DE SHWARTZMAN
EN LA PIEL DE CONEJOS DIABETICOS**

T E S I S
QUE EN OPCION AL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA

PRESENTA
M.V.Z. RODOLFO NIÑO FONG

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE 1998



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

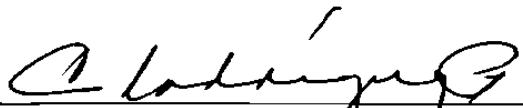
TITULO

Evaluación del uso terapéutico del factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento epidérmico e insulina sobre el proceso de cicatrización en lesiones causadas por la reacción de Shwartzman en la piel de conejos diabéticos.

TESIS QUE EN OPCION A TITULO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA
PRESENTA:

M.V.Z. RODOLFO NIÑO FONG

COMISION DE EXAMEN:




Dra. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

PRESIDENTE



Dr. en C. JUAN MANUEL SOLIS SOTO

SECRETARIO



Dr. en C. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ
VOCAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

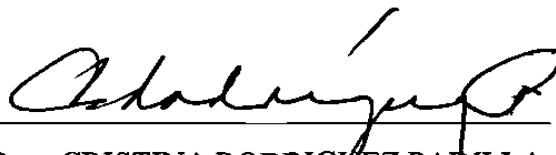
TITULO

Evaluación del uso terapéutico del factor de necrosis tumoral, factor de crecimiento epidérmico e insulina sobre el proceso de cicatrización en lesiones causadas por la reacción de Shwartzman en la piel de conejos diabéticos.

TESIS QUE EN OPCION A TITULO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA
PRESENTA:

M.V.Z. RODOLFO NIÑO FONG

COMISION DE APROBACION DE TESIS:



Dra.. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA

Dr. en C. JUAN MANUEL ALCOCER GONZALEZ

Dra. JULIA VERDE STAR

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la vida y poder vivir y gozar de las maravillas de este mundo y de su naturaleza.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por haberme aceptado como estudiante de Maestría en el Laboratorio de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. y por su valiosa cooperación para el desarrollo final de esta Tesis, ya que con sus valiosas observaciones desde que este trabajo era un simple anteproyecto, se fue perfeccionando hasta llegar al punto de ser aceptado y financiado por CONACYT/SIREYES.

Al Dr. Rafael Ramírez Romero por su valiosa asesoría y colaboración en la realización de este trabajo y por contribuir en gran manera en mi formación como Médico Veterinario que inicia en el campo de la investigación científica.

Al Dr. Juan Manuel Solís Soto por su desmedida cooperación y asesoría en una parte muy importante de la realización práctica de este trabajo y por su disponibilidad de tiempo para atenderme siempre, a pesar de sus múltiples ocupaciones.

Al Dr. Julio Sepúlveda por haberme facilitado las instalaciones y equipo del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

A todos los Maestros de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas que me impartieron clases en la Maestría, por haber compartido conmigo sus conocimientos y su amistad.

A todo el personal Docente y No Docente del Laboratorio de Inmunología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas por su amistad y valiosos comentarios y observaciones para la realización de este trabajo en especial al Dr. Pablo Zapata Benavides.

A todo el personal del Laboratorio Central de Diagnóstico Clínico Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L. por su valiosa colaboración en realización de una parte importante de este trabajo.

A la Administración de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L. por haber mantenido en buenas condiciones el bioterio y haber proporcionado la alimentación a los animales mientras duró este estudio.

A mis compañeros de Maestría: Daniel, Arturo, Yolanda, Paco, Juany y Rebeca por brindarme su amistad y poder compartir con ustedes dos años de muy buenas experiencias y estudio. Les deseo el mejor de los éxitos en su vida científica y personal.

A los alumnos que actualmente cursan el V semestre de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista: Alicia Marroquín, Margarita Alvarez, Ricardo Paz, Samuel Pacheco, Adrián González y Juan Angel Luna les agradezco su desinteresada ayuda apoyada solamente en el deseo de aprender más y les deseo que terminen su Carrera con todo el éxito posible.

A la Imprenta Servicios Gráficos Integrales por su donativo de papel y apoyo material para la impresión de esta Tesis.

DEDICATORIAS

A mis Padres Antonio Niño Gil y Emma Fong de Niño, que me dieron la vida y probablemente la única herencia de parte de ellos que ya estoy gozando, que fue la de haberme dado educación profesional y le agradezco a Dios que aún estoy disfrutando su presencia en este mundo y puedan compartir conmigo mis logros y a mi Familia.

A mi esposa M.V.Z. Blanca Patricia Esparza González que comparte su vida conmigo y es para mi un apoyo incondicional en todas las actividades que realizo y que también me ayudo en la parte final de esta Tesis que fue la más importante y difícil.

A mis hijos Rodolfo Niño Esparza y Patricia Carolina Niño Esparza, que durante los dos años de estudio y los años que se tomo la realización de esta tesis sufrieron de un “encerramiento” involuntario.

A todos mis Hermanos y a la Familia Esparza González.

**TESIS DEDICADA A LA MEMORIA DE MI GRAN AMIGO Y COMPAÑERO DE
GENERACION Y DE TRABAJO**

M.V.Z. E.B.P.C. AGUSTIN REBOLLOSO GALLARDO

(Q.E.P.D.)

1962 -1992

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
INDICE	iii
Lista de figuras.....	iv
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. HIPOTESIS	4
4. OBJETIVOS	5
5. ANTECEDENTES	6
5.1 Proliferación celular y formación de tejido conectivo en la cicatrización de las heridas.....	7
5.2 Cicatrización de las heridas en la diabetes.....	11
5.3 Aspectos inmunosupresores relacionados con la diabetes.....	12
5.4 Factores de crecimiento celular en la cicatrización de las heridas.....	13
5.5 Factor de necrosis Tumoral.....	16
5.6 Factor de Crecimiento Epidérmico	18
5.7 Insulina	20
6. MATERIALES Y METODOS	23
6.1 Animales de laboratorio.....	23
6.2 Inducción de la diabetes.....	23
6.3 Inducción de la reacción de Shwartzman.....	24
6.4 Tratamientos	25
6.5 Evaluación de la cicatrización por histopatología	25
6.6 Método indirecto de inmunoperoxidasa	26
6.7 Análisis estadístico	28
7. RESULTADOS Y DISCUSION	29
8. CONCLUSIONES	49
9. BIBLIOGRAFIA	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Número promedio de células a los tres días posteriores al tratamiento.....	30
Figura 2.	Número promedio de células a los siete días posteriores al tratamiento	30
Figura 3.	Macrófagos y fibroblastos teñidos con inmunoperoxidasa indirecta.....	31
Figura 4.	Area promedio de las lesiones en la piel	32
Figura 5.	Promedio del porcentaje de cicatrización a los tres días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 50µg de Lipopolisacárido (LPS).....	33
Figura 6.	Promedio del porcentaje de cicatrización a los tres días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 100µg de LPS.....	34
Figura 7.	Promedio del porcentaje de cicatrización a los tres días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 200µg de LPS.....	34
Figura 8.	Promedio del porcentaje de cicatrización a los siete días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 50µg de LPS.....	35
Figura 9.	Promedio del porcentaje de cicatrización a los siete días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 100µg de LPS.....	36
Figura 10.	Promedio del porcentaje de cicatrización a los siete días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 200µg de LPS.....	36
Figura 11.	Grado de cicatrización a los tres días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 50µg de LPS	37
Figura 12.	Grado de cicatrización a los tres días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 100µg de LPS	38
Figura 13.	Grado de cicatrización a los tres días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 200µg de LPS	39
Figura 14.	Grado de cicatrización a los siete días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 50µg de LPS	40
Figura 15.	Grado de cicatrización a los siete días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 100µg de LPS	41
Figura 16.	Grado de cicatrización a los siete días posteriores al tratamiento en lesiones producidas con una dosis de 200µg de LPS	42

Figura 17. Muestras de lesiones de la piel teñidas con Hematoxilina y Eosina (H y E) de piel sana, no diabético y diabético control.....	45
Figura 18. Muestras de lesiones de la piel teñidas con H y E tratadas con FNT, Insulina más FNT e Insulina más FCE más FNT	46
Figura 19. Muestras de lesiones de la piel teñidas con H y E tratadas con FCE, FCE más FNT e Insulina más FCE	47
Figura 20. Muestra de lesión de la piel teñida con H y E tratada Insulina.....	48

1. RESUMEN

El proceso de cicatrización consta de una serie de eventos que se desarrollan de manera secuencial, en donde participan células y sustancias químicas que actúan como moduladores, pero que, en algunas enfermedades como la Diabetes este proceso sufre de algunas alteraciones que impiden la rápida restauración celular, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue la evaluación terapéutica del factor de necrosis tumoral (FNT), factor de crecimiento epidérmico (FCE) e insulina (I) sobre el proceso de cicatrización en lesiones producidas por la reacción de Shwartzman en la piel de conejos diabéticos. Se utilizaron conejos de raza Nueva Zelanda, a los que se les indujo la diabetes con aloxana y se les produjo las lesiones en la piel utilizando lipopolisacárido (LPS) de *Klebsiella pneumoniae*, el área de las lesiones fue medida a los 0, 3 y 7 días. Al día 0 se les aplicó el tratamiento en forma local (intradérmica) con una dosis de Insulina 1µg, FNT 0.01µg y de FCE 1µg, los tratamientos se aplicaron en forma individual y en sus diferentes combinaciones. Las muestras de piel de las lesiones se procesaron con las técnicas de Hematoxilina y Eosina (H y E) y de inmunoperoxidasa indirecta para la cuantificación de la cicatrización y la presencia de fibroblastos y macrófagos, respectivamente. Los conejos registraron un nivel de glucosa sanguínea de 358 mg/dl. A los 3 días las lesiones tratadas con I+FCE mostraron el mayor porcentaje de cicatrización ($p < 0.01$) y a los 7 días los conejos tratados con FNT, I+FCE e I+FCE+FNT mostraron un 100% de cicatrización ($p < 0.01$). A los 3 días las lesiones tratadas con FCE mostraron una mayor cantidad de células en todas las dosis de LPS ($p < 0.001$). En el día 7 las lesiones que mostraron una mayor cantidad de células fueron las tratadas con FCE, FNT+FCE y el grupo de animales no diabetizados que recibieron placebo ($p > 0.05$). En lo que respecta a la calidad de cicatrización de las lesiones, se pudo observar que las lesiones tratadas con FNT mostraron una mejor y rápida reparación a los 7 días, seguido también por las lesiones tratadas con I+FCE, así como, las tratadas con I+FCE+FNT ($p > 0.05$). En conclusión podemos establecer que la mayoría de las combinaciones de los tratamientos utilizados se redujo el tiempo de cicatrización, si se compara con el tiempo normal de esta serie de eventos que ocurren en forma secuencial durante el proceso de cicatrización. Además, aunque en las lesiones tratadas con FNT se pudo observar que no producían una abundante migración celular en el sitio de la lesión, este número de células fue suficiente para mostrar a nivel de histopatología, que la calidad de reparación era excelente y que a los 7 días mostrara un 100% de cicatrización aún y cuando, las lesiones tratadas con I+FCE e I+FCE+FNT también pudieron producir el mismo porcentaje de cicatrización. Es importante señalar que el FCE inhibe la acción del FNT cuando se aplicaron en forma conjunta y que el tratamiento a base de I+FCE e I+FNT producen una mayor cicatrización que la insulina cuando se aplica en forma individual. Además, al combinarse los tres tratamientos el efecto inhibitorio del FCE sobre el FNT queda suprimido por la presencia de la Insulina. De este modo se puede sugerir la posible utilización de FNT o la combinación de I+FCE o I+FCE+FNT que pudieran acelerar el tiempo de cicatrización en pacientes humanos que sufren de diabetes y que presenten alteraciones en el proceso de cicatrización.

2. INTRODUCCION

Los mecanismos de cicatrización de las heridas involucran componentes celulares y extracelulares y se pueden dividir en tres fases: Hemostasis e inflamación, formación de tejido de granulación y la formación de la matriz con el remodelo de la herida (Hunt, T., 1983). Se han desarrollado modelos animales para estudiar los mecanismos de reparación de las heridas en estados normales, estados deteriorados secundarios a la diabetes, exceso de glucocorticoides, quimioterapia y daño por radiación, con la utilización de factores de crecimiento celular exógeno (Grotendorst, G., et al, 1985, Wankowicz, Z., et al, 1988, Brown, L.G., et al, 1989, Lynch, S.E., et al, 1989, Brown, L., et al, 1991 y Hennessey, P.J., et al, 1990). Estos factores de crecimiento son péptidos que estimulan el crecimiento y la proliferación celular. Se les ha denominado: a) Según la célula blanco (factor de crecimiento epidérmico o FCE), b) Según su origen (factor de crecimiento derivado de plaquetas o FCDP) y c) Según su propiedad biológica (factor de crecimiento transformante o FCT). Estos péptidos poseen función paracrina y autocrina, afectando a las células vecinas y permitiendo su propia regulación (Roitt, I. 1993, Darnell, J., 1990 y Karp, G., 1992). Además estos factores parecen trabajar sinérgicamente en varias facetas y/o aspectos de la cicatrización de las heridas, en pacientes que presentan un grado de riesgo en el proceso normal de cicatrización (Rothe, M., et al, 1992, Greenhalgh, D.G., et al, 1990, Lynch, S.E., et al, 1989 y Hennessey, P., 1990).

La diabetes es una enfermedad que afecta a los humanos que esta asociada con: a) un incremento en el catabolismo, b) una susceptibilidad más grande a las infecciones en las heridas y c) una infiltración celular retardada durante las etapas inflamatorias en la

reparación de las heridas (Rayfield, E.J., 1982 y Hunt, T., 1983). Al menos 30% de estos pacientes sufren de algún tipo de problemas cutáneos durante el curso de su enfermedad crónica. Los hallazgos de lesiones cutáneas en la diabetes mellitus (DM) se pueden clasificar en cuatro categorías: 1) enfermedades de la piel con alta o baja asociación con DM, 2) infecciones cutáneas, 3) manifestaciones cutáneas de complicaciones diabéticas y 4) reacciones en la piel al tratamiento diabético (Pérez, M.I. y Khon, S.R., 1994).

Para el estudio del proceso de cicatrización se han desarrollado varios modelos experimentales en animales de laboratorio, uno de ellos es la producción de la reacción local de Shwartzman, fenómeno inflamatorio agudo, inducido experimentalmente, por lo general en la piel del conejo. Para provocarla se emplean usualmente lipopolisacáridos (LPS) bacterianos. El procedimiento consiste en inocular una dosis preparatoria de dichos compuestos en la piel. De 18 a 24 horas más tarde se aplica otro inóculo similar, pero administrado por vía intravenosa a manera de desafío. En consecuencia, 4 horas después se observa una intensa hemorragia y necrosis en el sitio del primer inóculo (Movat, H.Z., et al, 1986). De esta manera es posible establecer un modelo que refleje las complicaciones vasculares en el proceso de restauración celular que se presenta frecuentemente en los individuos diabéticos (Cerdeña, A. C., 1994).

Los resultados prometedores de investigaciones al respecto y el advenimiento de la tecnología recombinante, sugieren que los factores de crecimiento serán importantes en el tratamiento de heridas en la práctica clínica médica (Greenhalgh, D.G., et al, 1990, Brown, L.G., et al, 1989, Lynch, S.E., et al, 1989, Brown, L.G., et al, 1991 y Hennessey, P.S., et al, 1990).

3. HIPOTESIS

La aplicación en forma individual de FNT alfa, FCE e Insulina y las combinaciones de dichas sustancias acelerarán el proceso de cicatrización en las lesiones de la piel causadas por la reacción local de Shwartzman en conejos diabéticos.

4. OBJETIVOS

- 1.- Medir el tiempo de cicatrización de las lesiones producidas en la piel por la reacción de Shwartzman, al ser tratadas con una combinación de FNT alfa, FCE e insulina y la aplicación separada de cada una de ellas.
- 2.- Observar los posibles cambios histopatológicos, causados por la acción de dichos factores.
- 3.- Determinar las posibles variaciones en el número de macrófagos y/o fibroblastos que se encuentren actuando en la cicatrización.

5. ANTECEDENTES

La Diabetes mellitus (DM) es considerada la enfermedad metabólica de mayor importancia en el humano. En México, según estadísticas del Boletín de Morbilidad y Mortalidad en el año de 1994, la DM ocupa el cuarto lugar dentro de las veinte principales causas de mortalidad general. El origen de éste síndrome radica en la deficiencia absoluta de la secreción de insulina, en una disminución de la actividad biológica de la misma, o bien, la presentación de ambas condiciones. Esta hormona de naturaleza proteica es producida por las células beta del páncreas como respuesta a los elevados niveles de glucosa sanguínea. La insulina circulante se une a sus receptores específicos localizados sobre las membranas celulares y es internada facilitando el proceso metabólico dentro de la célula. La insulina promueve el almacenamiento de glucosa en el hígado y músculo en forma de glucógeno y en el tejido adiposo en forma de triglicéridos. Además favorece la absorción intestinal de aminoácidos con la consecuente síntesis de proteínas en los ribosomas (Jubiz, W.,1981; Nevárez, G., 1991).

En base a ciertos estudios recientes, Durry,M.I.,en 1990 ha sugerido la clasificación de la DM en dos tipos principales, tomando en cuenta la dependencia de insulina exógena. El tipo I o diabetes mellitus insulino - dependientes (DMID) y el tipo II, Diabetes mellitus no insulino-dependientes (DMNID).

En la DM de tipo I, conocida también como diabetes juvenil, no hay secreción de insulina o esta muy disminuida. Esto provoca la acumulación excesiva de glucosa sanguínea, ocasionando una hiperosmolaridad e hipercetonemia. Los individuos afectados con este tipo de diabetes se caracterizan por su complexión delgada y frecuentemente presentan

complicaciones vasculares. En cuanto a la DM tipo II, también conocida como diabetes de madurez, la insuficiencia en la secreción de insulina es menos grave, aunque también se la ha atribuido a la insensibilidad tisular hacia la insulina. En este padecimiento los pacientes no dependen de la insulina exógena para conservar la vida; y se le considera como la forma no cetótica de la diabetes. La constitución física de estos pacientes tiende a la obesidad y las complicaciones vasculares son muy raras (Gayton, A.C., 1987).

Además se ha propuesto un tercer tipo para la DM humana, la cual incluye pacientes con una interferencia en la utilización de carbohidratos inducida por la medicación. Generalmente estos medicamentos son: Diuréticos derivados de tiazida, anticonceptivos y glucocorticoides. No existe evidencia de que éste efecto diabetogénico sea debido a una destrucción o a una degradación acelerada de la insulina. Además estas formas de diabetes son transitorias y desaparecen cuando se retira el medicamento (Nevárez, G.A.M. 1991).

5.1 PROLIFERACION CELULAR Y FORMACION DE TEJIDO CONECTIVO EN LA CICATRIZACION DE LAS HERIDAS

El proceso de cicatrización, ya sea primario o secundario, se conoce desde hace tiempo y consiste en una secuencia cronológica de eventos caracterizada por infiltrados celulares que aparecen en las inmediaciones de la herida. Esta secuencia fue observada desde hace muchos años por Metchinkoff y cuantificada en la cicatrización primaria por Ross y Beneditt. Cuando la piel sufre algún daño ocurre lo siguiente: La hemorragia conduce a la formación de un coágulo con una matriz de fibrina, la cual se seca y contrae, y puede actuar hasta cierto punto como pegamento para mantener el coágulo en la superficie del tejido. En las

heridas abiertas no puede proteger al tejido subyacente de la deshidratación resultante de la evaporación de agua a través del coágulo en la fase inicial de la formación de la costra. El coágulo y la costra brindan una protección mecánica inmediata, aunque relativamente escasa, contra la invasión de material extraño, como polvo o bacterias. Se lleva a cabo una respuesta inflamatoria cuya extensión y gravedad dependen del tipo de herida. En el caso de quemaduras la fase celular de la reacción inflamatoria puede retardarse o casi estar ausente (Hunt, T.K., 1983). Después de un periodo de 4 a 6 horas las células epiteliales de los bordes de la herida empiezan a acumular gránulos de glucógeno, y 4 a 6 horas después aparecen figuras mitóticas en las capas basales del epitelio, y las células comienzan a migrar a partir de estos estratos, ya sea bajo los bordes del coágulo o a través del mismo, dependiendo de cuanta deshidratación ha ocurrido. La migración del epitelio se lleva a cabo mediante un proceso de "salto de rana" en la cual las células móviles no pierden contacto con las células epiteliales previamente fijas. Después de que una célula se ha ubicado en su nueva posición, se forma una reacción de membrana basal entre el epitelio y el tejido conectivo. Durante el proceso de migración, las células epiteliales pueden avanzar a través de la colágena de la dermis, probablemente por la acción de colagenasas, ya sea secretadas por ellas mismas o activadas en los tejidos por los que atraviesan (Hunt, T.K., 1983).

Durante la primera fase de la lesión, y continuando hasta su cierre, se presenta una contracción progresiva de los fibroblastos en el área profunda de la herida, lo que conduce a la contracción inicial de la lesión bajo la influencia de secreciones inflamatorias de las miofibrillas (Hunt, T.K., 1983).

Después de un periodo de 24 a 36 horas se hacen evidentes los primeros signos de actividad proliferativa del tejido conectivo; éstos consisten en la división de fibroblastos y células

endoteliales. Antes de esta proliferación, las células se han estado acumulando en el tejido conectivo debido a la reacción inflamatoria que se presenta alrededor de una herida, y para las 24 a 36 horas el predominio inicial de células polimorfonucleares ha sido superado por la acumulación de macrófagos. Los macrófagos se desplazan hacia el área del tejido dañado y hacia el interior del coágulo, al cual fagocitan. Las nuevas células del tejido conectivo siguen a los macrófagos y migran hacia el espacio que se ha formado. El arreglo usual del tejido conectivo en regeneración consiste en que los macrófagos forman un “ frente de avance “, el cual es seguido en corto tiempo por brotes endoteliales, los cuales crecen en arcadas para fusionarse y entonces hacerse permeables. Estas arcadas endoteliales se encuentran rodeadas por células mesenquimatosas, las cuales son visiblemente indiferenciadas, pero mediante tinción con un anticuerpo anticolágena fluorescente se puede demostrar que producen una protocolágena. Estos tres tipos celulares: macrófago, célula endotelial y fibroblasto constituyen la mayor parte del tejido de granulación, el cual tiene un papel esencial en la cicatrización de todos los órganos excepto en los de origen endotelial. El tejido de granulación es altamente vascular, delicado y puede dañarse fácilmente; es extremadamente resistente a la infección y en última instancia se transformará en tejido cicatrizal. En las heridas en las que persiste la irritación, el tejido de granulación también puede contener cantidades considerables de polimorfonucleares reemplazados constantemente, y además, si hay un componente inmunológico en la irritación, también pueden encontrarse células plasmáticas, linfocitos y eosinófilos en grandes cantidades. El tejido de granulación crece para llenar todos los espacios disponibles, pero por lo general no crece por encima del nivel normal de la línea epitelial. Aún no se cuenta con una explicación acerca de por qué el

crecimiento del tejido conectivo se detiene en este punto en particular, pero rara vez se encuentra si existe una cubierta epitelial completa. A medida que el tejido de granulación llena la cavidad de la herida, las partes más activas se organizan de tal forma que los fibroblastos que se van quedando atrás, sintetizan más colágena alrededor de ellos mismos y la colágena fibrilar se polimeriza a partir de la protocólágena extracelular. Estas fibrillas a continuación establecen enlaces cruzados entre ellas en mayor o menor grado, dependiendo de su situación. A medida que transcurre el tiempo se deposita cada vez más colágena y proteoglicanos en relación con las células que están presentes. Finalmente el aporte sanguíneo tiende a abatirse, aunque estén presentes “ fantasmas “ de vasos pequeños entre las fibras maduras. No debe olvidarse que el coágulo sanguíneo no constituye un andamio sobre el cual se lleva a cabo la cicatrización. La presencia de un coágulo sólido es un factor inhibitorio de la cicatrización y retrasa la formación del tejido de granulación, pero pequeñas cantidades de sangre que contienen plaquetas junto con los macrófagos parecen ser estimuladores (Hunt, T.K., 1983).

5.2 CICATRIZACION DE LAS HERIDAS EN LA DIABETES

Las complicaciones de la cicatrización de las heridas llegan a ser un problema de importancia para muchos diabéticos. La tasa de infección de las heridas en todos los tipos de incisiones quirúrgicas limpias de pacientes diabéticos se aproxima al 10%. En el caso especial de los trasplantes de riñón se presenta un incremento de 2.6 veces en las infecciones perirrenales.

Básicamente existen dos teorías para explicar el efecto de la cicatrización en los diabéticos. De acuerdo con la primera, la cicatrización defectuosa es un efecto secundario de la vasculopatía de vasos pequeños. La segunda establece que la cicatrización deficiente es causada por problemas metabólicos relacionados con la hiperglicemia, la deficiencia de insulina, resistencia a la misma, o ambas. La respuesta real al problema tal vez sea una combinación de ambas teorías. Por lo tanto, esto es causa de una hipoxia como de “ mala nutrición “ de los tejidos que deben ser perfundidos por los vasos afectados. Por último, se ha propuesto el concepto de que la enfermedad de vasos pequeños ejemplificada por el engrosamiento de la membrana basal capilar es la característica más sobresaliente de la diabetes (Hunt, T.K., 1983).

En resumen, las dificultades en la cicatrización de los diabéticos reflejan una variedad de factores etiologicos: 1) Isquemia causada por enfermedad oclusiva de vasos grandes y pequeños; 2) Respuesta inflamatoria deprimida causada tanto por la hiperglicemia como por el metabolismo intermediario anormal, lo cual puede afectar ulteriormente la cicatrización, así como la frecuencia de infecciones; 3) Posibles efectos de un engrosamiento de la membrana basal capilar; 4) Probables efectos directos de una deficiencia de insulina en

fibroblastos y 5) Posibles defectos genéticos en células diabéticas (Hunt, T.K., 1983). Además de los defectos antes mencionados, se ha demostrado que la hiperglicemia por encima de 200mg/100ml inhibe a la fagocitosis y la ingestión de bacterias por leucocitos. Este simple hallazgo parece tener un significado clínico real. Por otra parte se han observado que los fibroblastos de pacientes diabéticos sobreviven mucho menos que los fibroblastos de pacientes no diabéticos al ser sometidos a varios pases de transferencia. También se ha publicado que los fibroblastos diabéticos sintetizan una cantidad y tipo de colágena anormal. Lo que sugiere que puede haber una alteración genética en la síntesis de colágena en los fibroblastos de pacientes con diabetes mellitus (Hunt. T.K., 1983).

5.3 ASPECTOS INMUNOSUPRESORES RELACIONADOS CON LA DIABETES

Abrass, C.K. en 1988, estableció que en los individuos afectados con DM, se observa una marcada deficiencia tanto en la respuesta quimiotáctica como en la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares. Es por esto que los diabéticos tal vez sean más susceptibles de padecer infecciones.

En otros estudios llevados a cabo por Rayfield, E.J. y col. en 1982, han demostrado que los macrófagos de animales con DM inducida de manera experimental, muestran una deficiencia en la degradación de los complejos inmunes fagocitados. A pesar de un aumento notable en los receptores para la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas y una alteración en la quimiotaxis. Por otro lado, los leucocitos diabéticos muestran un grado disminuido en la glicólisis. Es de interés mencionar que la glicólisis aporta la energía para la internalización de

partículas. La glucosa-6-fosfato y la fructosa-6-fosfato se acumulan en la DM , sugiriendo una actividad disminuida en la fosfofructocinasa y el aumento del glucógeno acompañado de una reducción en su síntesis.

Con respecto a la producción de anticuerpos, Johnson, J.E. en 1970, encontró niveles normales o incrementados de inmunoglobulinas los cuales pueden ser simplemente indicativos de la frecuencia de infecciones en estos pacientes. Datos anteriores sugieren una disminución en la repuesta de anticuerpos a la toxina de *Staphylococcus* o a la vacuna de Tifoidea , que podría ser debido a otros factores, por ejemplo, bajo estado nutricional (Bates,G., et al, 1941).

MacCuish, A.C. y col en 1974, investigaron la respuesta de linfocitos a fitohemaglutinina (PHA) en 40 pacientes DMID con la diabetes bien controlada, 14 pacientes DMID con la enfermedad mal controlada y 40 personas como control. La respuesta fue normal en pacientes con diabetes bien controlada, así como en el grupo control, mientras que una reducción significativa fue observada en los pacientes diabéticos con la enfermedad pobremente controlada. El número medio y el porcentaje de los linfocitos T y B fue similar en todos los grupos de estudio.

5.4 FACTORES DE CRECIMIENTO CELULAR EN LA CICATRIZACION DE LAS HERIDAS

Mientras que las personas sanas y normales raramente tienen problemas con la cicatrización, muchas complicaciones médicas y quirúrgicas pueden ser atribuidas a

deficiencias en la reparación de las heridas. Las heridas abiertas han perdido la barrera que protege a los tejidos de la invasión bacteriana y permite el escape de fluidos vitales. Sin la cicatrización, las infecciones están presentes con mayor frecuencia. La mayoría de las complicaciones de las heridas, tales como el rompimiento de la anastomosis o pérdida de la piel por trasplante, están asociadas con algunos daños del huésped como mala nutrición, diabetes, tratamiento con esteroides, quimioterapia o radiación. Recientemente se han hecho intentos para mejorar la cicatrización usando factores de crecimiento. Muchos de los experimentos in vitro sugieren que los factores de crecimiento pueden actuar como quimioatrayentes y mitógenos para las células involucradas en la reparación de las heridas. Los factores de crecimiento estimulan la angiogénesis, la producción y degradación de la matriz extracelular y la liberación de citocinas. La disponibilidad de grandes cantidades de factores de crecimiento purificados ha hecho posible realizar nuevos estudios en animales e iniciar el estudio en humanos, con la aplicación de tales factores directamente en el sitio de la herida para aumentar el grado de reparación.

Greenlagh, D.G., y col. en 1990, utilizaron ratones diabéticos genéticamente para examinar los efectos de los factores de crecimiento celular recombinantes, aplicados tópicamente en las heridas producidas en la piel del lomo de estos animales. Los ratones diabéticos utilizados como control, a los que se les aplicó solo placebo mostraron un retardo significativo en la llegada de células inflamatorias a la herida, en la formación de tejido de granulación y en la cicatrización u oclusión de la herida. Mientras que los animales diabéticos que recibieron factor de crecimiento derivado de plaquetas recombinante (FCDP r), el factor de crecimiento de fibroblastos recombinante (FCFr) o combinaciones de

ambos, tenían más fibroblastos y capilares a los 10 y 21 días, además de mostrar una oclusión casi total de la herida a los 21 días, en comparación de las heridas de los animales tratados solo con placebo.

Por otra parte Grotendorst, G.R., en 1985, utilizó cámaras de acrílico colocadas sobre las heridas en la piel de ratas diabéticas, a las cuales adicionaba el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP). Posteriormente retiraba estas cámaras y analizaba su contenido, donde encontró que las cámaras llenadas con FCDP en ratas diabéticas contenían mayor número de células de tejido conectivo, un marcado incremento en la síntesis de DNA y una deposición mayor de colágena durante las primeras dos semanas posteriores a la implantación de la cámara. Mientras que las cámaras llenadas con el vehículo, mostraron un grado muy disminuido en la reparación de las heridas, que se restablecía a lo normal cuando se adicionaba FCDP a la cámara. Posteriormente Lynch, S.E. y col. en 1989, estudiaron la actividad sinérgica de seis factores de crecimiento celular que actúan como mediadores de la cicatrización, sobre la piel de cerdo sometidos a heridas estandarizadas. Los factores utilizados fueron: Factor de crecimiento epidérmico (FCE), Factor de crecimiento transformante alfa y beta (FCT alfa y FCT beta), Factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), Factor de crecimiento similar a insulina-1 (FCI-1) y Factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP). Los resultados de la acción de estos factores sobre la cicatrización de las heridas fueron evaluados bajo la medición de la formación de tejido conectivo, la cantidad de colágena y la madurez e incremento de la angiogénesis, en donde se encontró que el sinérgismo entre FCDP e FCI-1 fue óptimo en un rango de 2:1 por peso. De los otros seis factores individuales y nueve combinaciones probadas, las

combinaciones de FCDP y FCI ó FCDP y FCT alfa, fueron las más potentes estimuladoras de la cicatrización en ausencia de inflamación.

5.5 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (FNT)

El factor de necrosis tumoral (FNT alfa) es una citocina de 17 kD secretada por los macrófagos en respuesta a una variedad de agentes inflamatorios, particularmente endotoxinas bacterianas, interleucina 2 e interferon gamma, con las cuales también puede actuar sinérgicamente (Roitt, I., 1993).

Después de la activación de las células presentadoras de antígeno, las células T producen un gran número de citocinas las cuales atraen y activan macrófagos (Wanckowickz, Z. y col. 1988). Estas citocinas incluyen Interferon gamma, interleucina 3, FNT e interleucina 6. En reacciones granulomatosas la acumulación de macrófagos son la principal fuente de FNT y los granulomas se desarrollan por autoamplificación. El FNT producido posee varios efectos rápidos de protección: 1) Aumenta la capacidad microbicida de macrófagos y neutrófilos, 2) El FNT, junto con componentes bacterianos no identificados, causa la liberación de interferon gamma por células NK, esto aumenta la capacidad microbicida de los macrófagos y 3) El FNT causa cambios en las células endoteliales y fagocitos, lo cual resulta en una mayor adhesión de estos a las paredes de los vasos sanguíneos, al incrementar la entrada de las células a los sitios de inflamación (Wanckowickz, Z. et al 1988; Roitt, I. 1993). En cuanto al papel del macrófago en la cicatrización de las heridas al ser activado por el FNT puede intervenir produciendo otros factores tales como: Colagenasa, hialuronidasa, factores

estimulantes de fibroblastos y factores de crecimiento, así como FNT. Este FNT producido o el que se administra por vía exógena pueden actuar sobre otros tipos de células que están involucradas en la cicatrización de las heridas, tales como, las células endoteliales donde promueven la adhesión celular, la deposición de fibrinógeno y de producir cambios en la permeabilidad. Otro tipo de célula que es estimulada por el FNT son los fibroblastos, los cuales aumentan la síntesis de colágena y de matriz extracelular que son los componentes principales que ocupan el lugar del tejido que ha sido dañado en las heridas (Roitt, I., 1993).

Los resultados de varios experimentos desarrollados por Silber y col. en 1994 demuestran que los infiltrados inflamatorios están asociados temporalmente y espacialmente con patrones únicos de moléculas de adhesión endotelial y la expresión de citocinas. Con el análisis Northern Blot realizado por I. Wankowickz, en 1988 y M. C. Cid, en 1994 se demostró un incremento transitorio en la expresión inducida por FNT para E - Selectina, Molécula de adhesión intercelular 1 (MAIC-1) y Molécula de adhesión a célula vascular 1 (MACV-1) en células endoteliales, que son importantes en promover las interacciones celulares leucocito - endotelio observadas en algunas enfermedades inflamatorias.

Por otra parte, Roth y col. en 1994, observaron, que los macrófagos de las ratas diabéticas presentan una producción anormal de FNT alfa. Sin embargo, cuando se administra FNT más Interleucina 1 se estimula la liberación de insulina con pocos efectos tóxicos, tomando en consideración las observaciones de Nickolof y Naidu en 1994, así como de Tsai y col. en el mismo año, de que, en condiciones normales el FNT epidermal se incrementa después de la destrucción de la barrera epidermal crónica o aguda, se establece, que el FNT alfa puede señalar y/o coordinar algunas etapas de la respuesta cutánea a la destrucción de la barrera .

5.6 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (FCE)

Las proteínas conocidas como factores de crecimiento, ejercen efectos importantes tanto en la diferenciación como en el crecimiento celular. Por ejemplo el factor de crecimiento neural, el cual se produce en las células de origen nervioso y el FCE, promueven que estas células se extiendan, como un proceso de la formación del axón. Este último factor fue descubierto debido a su capacidad de incrementar la velocidad del desarrollo epidérmico cuando se inyectó a roedores al final del desarrollo fetal. Ahora sabemos que muchas células además de las células de la piel poseen receptores de superficie y también son estimuladas por éste. Estos agentes son llamados “mitogénicos” es decir estimulantes de la mitosis. Al parecer, la mayor parte, si no es que todos los agentes mitogénicos, interactúan con la superficie celular externa. La respuesta mitogénica mejor estudiada es la de los fibroblastos cultivados en la presencia de FCE. Se ha encontrado que los fibroblastos contienen receptores específicos distribuidos al azar. La interacción de los factores de proliferación con los receptores produce una agregación de los complejos FCE -receptor en la membrana y su subsecuente incorporación por endocitosis. Los resultados sugieren que los estímulos mitogénicos primarios son transmitidos cuando el FCE se une al receptor, aunque puede liberarse una segunda señal después de la internalización. Si el FCE se inyecta en una célula blanco, no se observa ninguna respuesta. Lo cual indica que el factor de proliferación solo es capaz de ejercer su efecto vía la interacción con el receptor en la superficie celular (Darnell, J., 1990; Karp, G., 1992).

Sí se examina una célula durante los primeros minutos después de su tratamiento con FCE, se pueden detectar diversos cambios en sus funciones fisiológicas; por ejemplo un incremento en la incorporación de los nutrientes y del flujo de iones, así como modificaciones en el estado de ciertos componentes de la membrana, en la concentración de los nucleótidos cíclicos, en el estado del citoesqueleto, etc. (Darnell, J., 1990; Karp, G., 1992).

Una respuesta temprana del FCE es que, al parecer, resulta de particular importancia estimular la cinasa membranal que cataliza la fosforilación de los residuos de tirosina en proteínas que son su sustrato, incluyendo el mismo receptor FCE. La información obtenida sugiere que la activación de esta cinasa es un efecto directo de el FCE unido al receptor, sin implicar ningún nucleótido cíclico intermediario, como ocurre con la respuesta a la epinefrina y glucagón (Darnell, J., 1990; Karp, G., 1992).

El FCE es un polipéptido de 53 aminoácidos que estimula la síntesis de RNAm, DNA y de proteínas en muchos tipos celulares. Además, ha sido demostrado que estimula la división de queratinocitos in vitro y la regeneración epidermal in vivo, en base a esto Brown, G.L. en 1989, utilizó un tratamiento a base de FCE sobre sitios donde fue tomada la piel de pacientes que fueron sometidos a autoinjertos, para valorar si dicho factor podría acelerar el grado de regeneración epidérmico en humanos. Los resultados revelaron que el FCE disminuyó el tiempo de cicatrización entre un 25 y 50% en aproximadamente un día y 75 a 100% de cicatrización en 1.5 días.

Dos estudios clínicos de FCE realizados por Brown, L.G. 1991, también citado por Rothe y Falanga en 1992, han mostrado resultados positivos a la aplicación doble diaria de FCE en sulfadiazina de plata , el primero de ellos en pacientes donadores de piel, los sitios tratados

con FCE mostraron un grado acelerado de repitelialización que fue reducido en 1.5 días. En un segundo experimento 9 pacientes con heridas crónicas secundarias a diabetes, artritis reumatoide, quemaduras e incisiones, fueron tratadas con sulfadiazina de plata sola dos veces diariamente por un periodo de tres semanas a 6 meses sin evidencias de cicatrización. La crema de sulfadiazina de plata con FCE, aplicada dos veces diariamente por un periodo comprendido entre 12 y 92 días, dió una completa cicatrización en 8 pacientes sin recurrencia por un periodo de uno a 4 años .

Por otro lado, Hennessey, P.J. y col. en 1990 estudiaron las interacciones de insulina más FCE en la aplicación tópica en ratas diabéticas. El FCE y la insulina incrementaron un 202% la síntesis de colágena sobre los controles al día 15, mientras que las ratas diabéticas que recibieron FCE o insulina sola tenían significativamente menos colágena que los controles .

5.7 INSULINA

La insulina actúa sobre muchas células en el cuerpo y produce efectos inmediatos y de larga duración. Su acción inmediata es incrementar el grado de ingestión de glucosa de la sangre hacia las células musculares y adipocitos y así el número de transportadores de glucosa en la membrana plasmática. Los efectos de la insulina sobre el consumo de glucosa y el catabolismo ocurren en minutos y no requiere nueva síntesis de proteínas. La exposición continua a insulina produce efectos de larga duración, causando un incremento en las actividades de las enzimas hepáticas que sintetizan glucógeno y de las enzimas en células adiposas que sintetizan triacilglicérolas. A los 15 minutos de la adición de la insulina a los

adipocitos, el transporte de glucosa se incrementa de 10 a 20 veces, debido a un incremento en el número de transportadores en la superficie de la membrana. (Darnell, J., 1990; Karp, G., 1992).

La insulina también es un factor de crecimiento para muchas células, tales como los fibroblastos, al estimular la síntesis de DNA, para esto es necesario que las células sean expuestas continuamente a 10^{-8} M de insulina. Mientras que concentraciones mucho más bajas de 10^{-9} a 10^{-10} M son suficientes para inducir reacciones muy rápidas, tales como la ingestión de glucosa (Darnell, J., 1990; Karp, G., 1992).

Estudios recientes sugieren que la interacción de un receptor con su ligando externo presente de manera natural, produce también una asociación entre el receptor y el citoesqueleto, lo cual puede causar que los receptores se reúnan en zonas especiales dentro de la membrana, de donde pueden ser llevados hacia el interior de la célula, así, la formación de racimos de receptores parece ser parte de una secuencia de fenómenos mediante los cuales la insulina produce un marcado efecto en sus células blanco. De hecho, los fenómenos de formación de racimos son de primordial importancia en la respuesta celular a la insulina, puesto que la formación de estos racimos por medios artificiales, como agregar anticuerpos antireceptores, inicia la respuesta de las células blanco aún en la ausencia de la hormona (Darnell, J., 1990; Karp, G., 1992).

Se han llevado a cabo algunos estudios en animales diabéticos que se han hecho deficientes mediante el uso de la droga estreptozotocina. Donde se ha confirmado la disminución de la fuerza tensora y la producción de colágena en las heridas de estos animales. La insulina

administrada a ratas diabéticas puede restablecer los parámetros de cicatrización (Hunt, T.K.,1983)

En otros experimentos realizados por Weringer, J.E. y col. 1982 y Hunt, T.K. 1983 han estudiado la cinética de la insulina marcada que se coloca en el líquido extracelular de la herida. Se tomaron muestras de éste líquido a intervalos de una hora y se hizo una estimación de la cantidad de insulina que permanecía intacta. Se encontró que la velocidad de destrucción de la insulina era mayor en una herida de 7 días (en la cual la vida media de la insulina intacta era de 80 minutos) que en una de 14 días (150 minutos), lo cual tiende a una degradación de insulina mayor en las primeras fases inflamatorias de la cicatrización en una forma muy significativa. Las fases tempranas de la cicatrización son deficientes en los diabéticos mal controlados. Es tentador suponer que el principal efecto de la diabetes en la cicatrización es el resultado de un defecto en la respuesta inflamatoria, lo cual está de acuerdo con los defectos conocidos en la respuesta inflamatoria de los diabéticos. También es similar a los efectos mínimos de insulina sobre la síntesis de colágena por fibroblastos confluentes en cultivos de tejidos y con las observaciones de que la terapéutica insulínica administrada al momento de producirse la herida es útil, aun cuando la insulina se decontinúe durante las últimas fases de cicatrización, que es cuando la colágena se sintetiza.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 ANIMALES

Se utilizaron 45 conejos de raza Nueva Zelanda, de una edad promedio de 2.5 meses y un peso aproximado a los 2.5 kg. Los animales se mantuvieron en una área cerrada con clima artificial y alimentación comercial ad libitum, complementada con verdura fresca y agua. Los animales se dividieron en 8 grupos, con 5 conejos cada uno.

6.2 INDUCCION DE LA DIABETES

Se indujo la DM tipo I utilizando como agente diabetogénico Aloxana monohidratada (2,4,5,6,tetraoxipirimidina 5,6, dioxiuracilo SIGMA no. de cat. A-8128) en dosis de 150 mg por animal contenida en 1ml de agua inyectable administrada en la vena marginal de la oreja izquierda. La Aloxana es una sustancia que actúa selectivamente sobre las células β del páncreas, causando la degeneración y desintegración de dichas células después de 12 horas de administración (Weringer, J.E., et al, 1982; Cerda, A.C.E., 1994).

Siete días después a la inoculación se determinaron los niveles de glucosa sanguínea con el método de O-Toluidina, designándose como animales diabéticos a aquellos que obtuvieron una lectura mayor a 150mg/dl de glucosa (valores normales 60 a 140mg/dl) (Davidson, I. y Henry, J.B., 1979).

6.3 INDUCCION DE LA REACCION DE SHWARTZMAN

Shwartzman observó que si inyectaba organismos gram negativos en la piel de un conejo, y 24 horas después daba una segunda dosis en forma intravenosa, se desarrollaba necrosis hemorrágica en el sitio de la piel “preparada”. Esto es conocido como la reacción de Shwartzman. También observó que dos inyecciones intravenosas separadas 24 horas causaban una reacción sistémica, involucrando colapso circulatorio y necrosis bilateral de la corteza renal. Estas reacciones también pueden estar acompañadas por necrosis en el páncreas, pituitaria, adrenales e intestino y además una marcada coagulación intravascular difusa y trombosis. Muchos otros organismos son conocidos que “preparan” la piel en la misma manera incluyendo *Streptococcus*, *Mycobacteria*, *Haemophilus* spp, *Corynebacteria* y *Vaccinia* virus. La endotoxina lipopolisacárido (LPS) es el componente activo de la inyección intravenosa iniciadora. Sin embargo, ahora parece probable que el FNT y la interleucina 1 inducen estas reacciones (Mori, W., 1981; Beck, G., et al, 1986; Movat, H.Z., et al, 1987 y Roitt, I., 1993).

Se empleó Lipopolisacárido (LPS) de *Klebsiella pneumoniae* (SIGMA No. de cat. L-4268). Se llevaron a cabo 6 inoculaciones preparatorias sobre el lomo depilado de cada conejo, 3 del lado derecho y 3 del lado izquierdo. Las diluciones correspondieron a una dosis de 50, 100 y 200 µg de LPS en el lado izquierdo, y en el lado derecho, las mismas cantidades pero en sentido contrario, cada una diluida en 0.1ml de agua inyectable. Posteriormente a las 24 horas todos los animales fueron desafiados al administrarles 100 µg de LPS por vía

intravenosa (Cerde, A.C.E., 1994). Se procedió a trazar el área de las lesiones producidas sobre un acetato a los 3 y 7 días posteriores al tratamiento, cada uno de los acetatos fue introducido al programa Image SigmaScan para Windows para determinar el área de cicatrización en centímetros cuadrados por medio de planimetría.

6.4 TRATAMIENTOS

Se aplico una dosis de FNT de 0.01 μg , para FCE correspondió una dosis de 1.0 μg y para insulina 1.0 μg diluidos en 0.1 ml de PBS. La vía de aplicación fue intradérmica en el sitio de la herida. Los tratamientos fueron: FNT, FNT más FCE, FNT más Insulina, FNT más FCE e Insulina, FCE, FCE más Insulina, Insulina y solución salina fisiológica para los dos grupos testigo diabético y no diabético. Cada tratamiento corresponde a un grupo de 5 conejos y se aplicaron solamente una vez 24 horas después del desafío con LPS.

6.5 EVALUACION DE LA CICATRIZACION POR HISTOPATOLOGIA

A los 3 y 7 días después de la aplicación de los tratamientos se procedió a tomar las muestras de la herida (piel) conservadas en formol al 5% bufferado y fueron teñidas con hematoxilina y eosina para observar el tipo de población celular que predomina y el grado de cicatrización. Las muestras fueron tomadas del lado izquierdo del lomo de los animales a los 3 días y las del lado derecho a los 7 días, montadas en parafina y cortadas en un Microtomo (American Optical 820) con un grosor de 4micras (Greenhalgh,D.G.,et al,1990).

La escala de los grados para la evaluación de los cortes histológicos fueron:

GRADO	CRITERIO
1-3	Ninguna o mínima acumulación celular. Sin tejido de granulación ni epitelial
4-6	Tejido de granulación inmaduro y delgado dominado por células inflamatorias pero pocos fibroblastos, capilares o deposición de colágena. Mínima migración epitelial.
7-9	Tejido de granulación moderadamente grueso, con un rango dominado por células inflamatorias o más fibroblastos y deposición de colágena. Extensiva neovascularización, una migración de epitelio de mínimo a moderado.
10-12	Tejido de granulación vascular grueso dominado por fibroblastos y deposición extensiva de colágena. Epitelio cubriendo parcial o completamente la herida.

6.6 METODO INDIRECTO DE INMUNOPEROXIDASA

Para la cuantificación de macrófagos y fibroblastos localizados en el sitio de la herida, se llevó a cabo la técnica de inmunoperoxidasa indirecta. En el método indirecto los cortes de tejido son incubados sencillamente con dos anticuerpos diferentes. El primer anticuerpo no esta marcado y esta dirigido contra el antígeno bajo investigación. El segundo anticuerpo esta dirigido contra la inmunoglobulina de la especie en la cual el primer anticuerpo fue producido y esta conjugado con peroxidasa. Las principales ventajas de este método sobre el método directo son: un incremento en la sensibilidad, una reducción en la cantidad requerida del anticuerpo primario y la disponibilidad de anticuerpos conjugados purificados contra inmunoglobulinas de varias especies de un gran número de fuentes comerciales.

Las muestras fueron obtenidas de las lesiones de la piel de los conejos a los 3 y 7 días posteriores al tratamiento y montadas sobre una platina de aluminio de 1.5 cm de diámetro, posteriormente las muestras fueron cubiertas con OCT Compound cortadas en un criostato a un grosor de 4 micras y montadas en un portaobjetos. Primeramente las muestras fueron sometidas a la inactivación de la peroxidasa endógena, sumergiendo los portaobjetos con la muestra en una solución de 99 ml de Metanol más 1 ml de H₂O₂ al 0.30%. Posteriormente las muestras fueron enjuagadas con solución buffer de fosfatos (PBS, K₂HPO₄ 7.52 g, NaH₂PO₄ 1.32 g, NaCl 7.2 g en 1000 ml de agua destilada y con un pH final de 7.2 - 7.8) y se incubaron con el primer anticuerpo monoclonal Anti-Human fibroblast surface protein IgM mouse (Sigma No de Cat. F-4771) a una dilución de 1:500 (el diluyente para los anticuerpos fue: PBS 99 ml, Albúmina sérica bovina 1.0 g y Triton X100 1.0 ml) en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 minutos. Este primer anticuerpo se unió a macrófagos y fibroblastos. Se eliminó el exceso del primer anticuerpo por medio de lavados con PBS y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo Anti-Mouse IgM marcado con peroxidasa (Sigma No. de Cat. A-8786) a una dilución de 1:5000 bajo las mismas condiciones que el primer anticuerpo, eliminándose el exceso del segundo anticuerpo mediante varios lavados de PBS, por último las muestras fueron incubadas por 30 minutos más en cámara húmeda a temperatura ambiente con una solución de Diaminobenzidina (Diaminobenzidina 5 mg, TRIS HCl 0.05 M pH 7.6 10 ml y H₂O₂ al 30% 0.1 ml). Al final las muestras fueron cubiertas con resina y cubiertas con un portaobjetos para su conservación. Las células positivas (teñidas) se contaron en un Microscopio marca Zeiss MC80, seleccionando 5 campos al azar en una área de 800 μ^2 .

6.7 ANALISIS ESTADISTICO

Se llevo a cabo un análisis de varianza para la comparación de los siguientes parámetros entre los diferentes tratamientos (Steel, R.J.D. y Torrie, J.H., 1980).

- Valores obtenidos en la observación histopatológica.
- Medidas del diámetro de la cicatrización.
- Conteo de células: Macrófagos y Fibroblastos.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

El estado de la diabetes inducida en los conejos se logró con una sola aplicación de alloxana a una dosis de 150 mg por animal. Los niveles promedio de glucosa sanguínea fueron de 358 mg / dl de sangre , lo cual se consideró suficiente para la confirmación del estado diabético tres semanas después de la aplicación de alloxana. Es importante mencionar que algunos conejos murieron 24 horas después de la aplicación debido a la toxicidad de ésta sustancia, también, algunos mostraron torticolis y opistótonos (Ramos, R.,H.G. 1994). El tiempo en que se alcanzó este estado de glucemia fue en un promedio de 21 días. Con respecto a el número de células que se contabilizaron tres días después del tratamiento (Fig. 1), podemos mencionar que los animales tratados con FCE mostraron una mayor migración celular hacia el sitio de las lesiones producidas comparadas con ($p < 0.001$) el número de células en las lesiones de los animales no diabéticos que recibieron solo placebo como tratamiento ($p > 0.05$). Los animales que recibieron el resto de los tratamientos mostraron una población celular casi similar ($p > 0.05$). La población celular (Fig. 2) de los animales tratados con FCE y los no diabéticos que recibieron solo el placebo mostraron a los 7 días el mayor número de células en las lesiones producidas con las tres cantidades de LPS, es importante mencionar que las lesiones de los animales tratados con insulina en forma local mostraron el menor número de células, pero se puede establecer que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de células presentes en las lesiones producidas con las tres dosis de LPS en todos los tratamientos ($p > 0.05$).

NÚMERO PROMEDIO DE CÉLULAS A LOS TRES DÍAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO

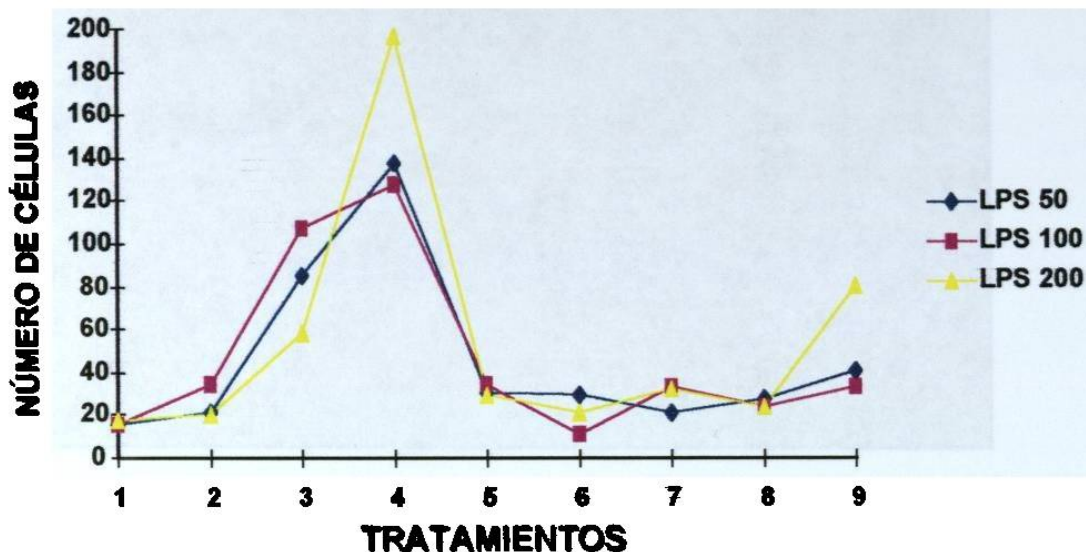


Fig.1. Número de células en una área de $800\mu^2$ teñidas con inmunoperoxidasa de los cortes histológicos de la lesión. Tratamientos 1) Diabético control, 2) Factor de necrosis tumoral, 3) No diabético, 4) Factor de crecimiento epidérmico, 5) Factor de crecimiento epidérmico más factor de necrosis tumoral, 6) Insulina, 7) Insulina más factor de crecimiento epidérmico, 8) Insulina más factor de necrosis tumoral y 9) Insulina más factor de crecimiento epidérmico más factor de necrosis tumoral.

NÚMERO PROMEDIO DE CÉLULAS A LOS SIETE DÍAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO

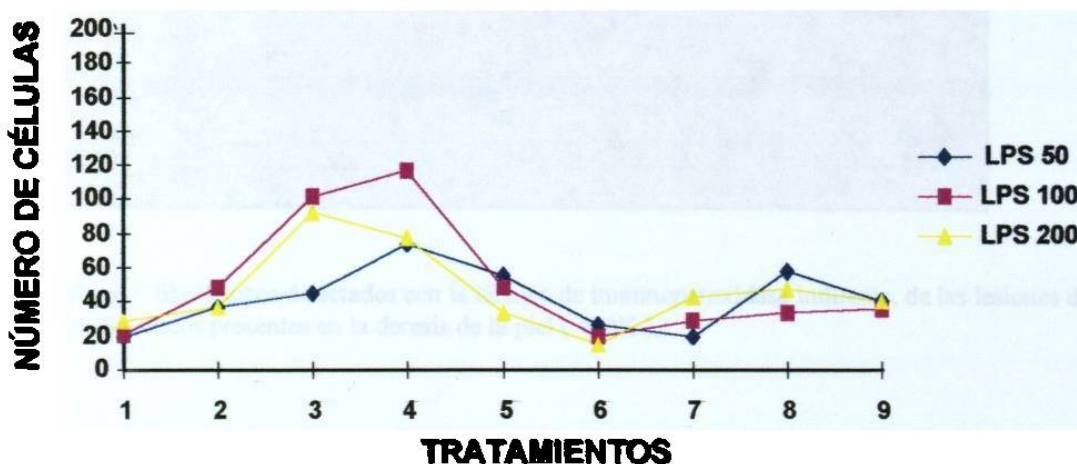


Fig.2. Número de células en una área de $800\mu^2$ teñidas con inmunoperoxidasa de los cortes histológicos de la lesión. Tratamientos 1) Diabético control, 2) Factor de necrosis tumoral, 3) No diabético, 4) Factor de crecimiento epidérmico, 5) Factor de crecimiento epidérmico más factor de necrosis tumoral, 6) Insulina, 7) Insulina más factor de crecimiento epidérmico, 8) Insulina más factor de necrosis tumoral y 9) Insulina más factor de crecimiento epidérmico más factor de necrosis tumoral.

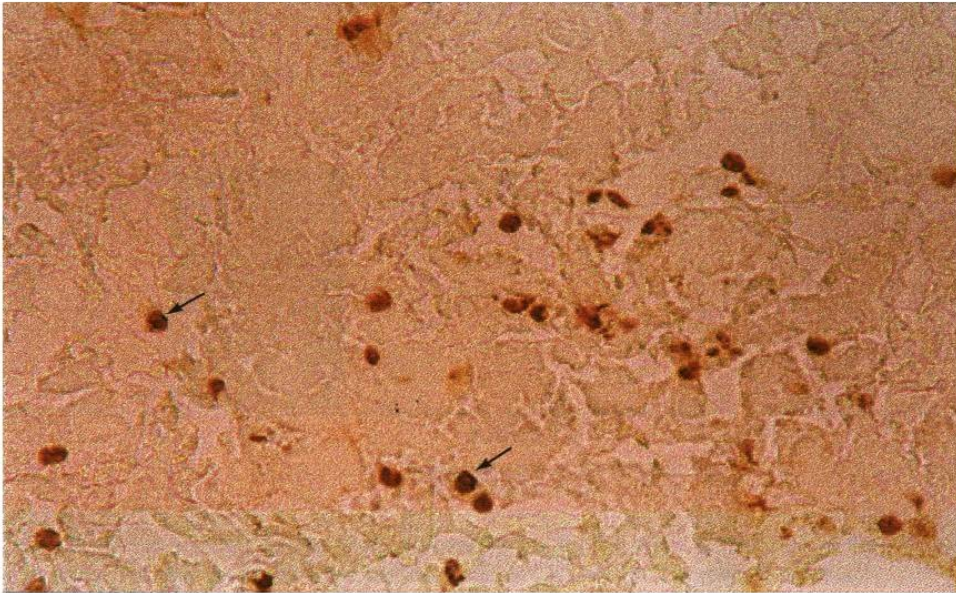
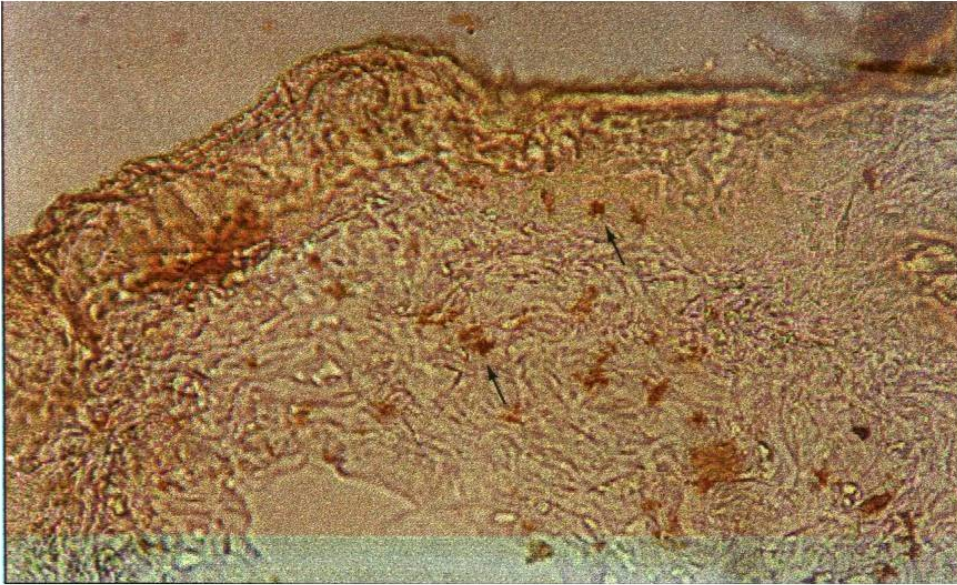


Fig. 3. Macrófagos y fibroblastos detectados con la técnica de inmunoperoxidasa indirecta, de las lesiones de la piel de conejos diabéticos presentes en la dermis de la piel (400X).

Con respecto al porcentaje de cicatrización, se tomo como un 0% de cicatrización al día 0, es decir, a las 24 horas posteriores al desafío con 100 μ g de LPS por vía intravenosa y los resultados mostraron que no hubo diferencia estadística significativa entre el tamaño de las lesiones producidas con 50 μ g y 100 μ g de LPS ($p>0.05$), pero si se encontraron diferencias entre las lesiones producidas con una dosis de 50 μ g y 200 μ g de LPS (Fig. 4)

AREA PROMEDIO DE LAS LESIONES EN LA PIEL

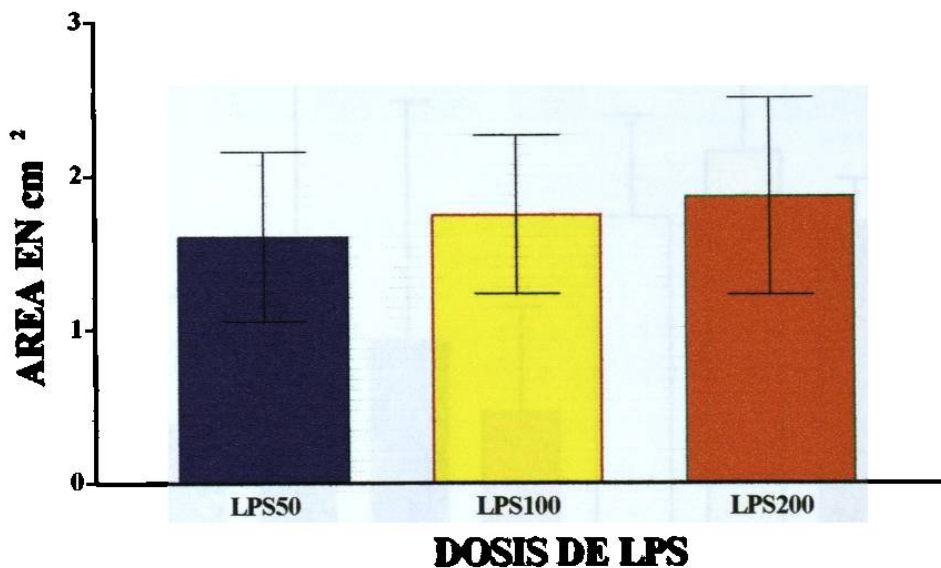


Fig.4. Area promedio de las lesiones en centímetros cuadrados a las 24 horas posteriores al desafío, estas mediciones corresponden a todas las lesiones producidas con las tres dosis de LPS, de los 9 grupos de conejos.

El mayor porcentaje de cicatrización a los tres días posteriores al tratamiento en las lesiones causadas con una dosis de 50 μ g de LPS fueron aquellas tratadas con la combinación de Insulina más FCE que mostró una diferencia estadística de ($p<0.01$) al compararlo con lo grupos de animales que recibieron como tratamiento FCE más FNT, Insulina más FNT más FCE y FNT (Fig. 5). En las lesiones causadas por una dosis de 100 μ g de LPS, aquellas que fueron tratadas con

Insulina más FCE mostraron una mayor área de cicatrización al compararlo con las lesiones tratadas solo con FCE ($p < 0.05$) (Fig. 6). Por último en las lesiones producidas con una dosis de $200 \mu\text{g}$ de LPS el mayor porcentaje de cicatrización correspondió a aquellas lesiones tratadas con Insulina más FCE donde se encontró una diferencia estadística ($p < 0.01$) al compararlos con los grupos de los No Diabéticos y los tratados con I más FNT más FCE. (Fig. 7).

PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACIÓN A LOS 3 DÍAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO EN LESIONES PRODUCIDAS CON UNA DOSIS DE $50 \mu\text{g}$ DE LPS.

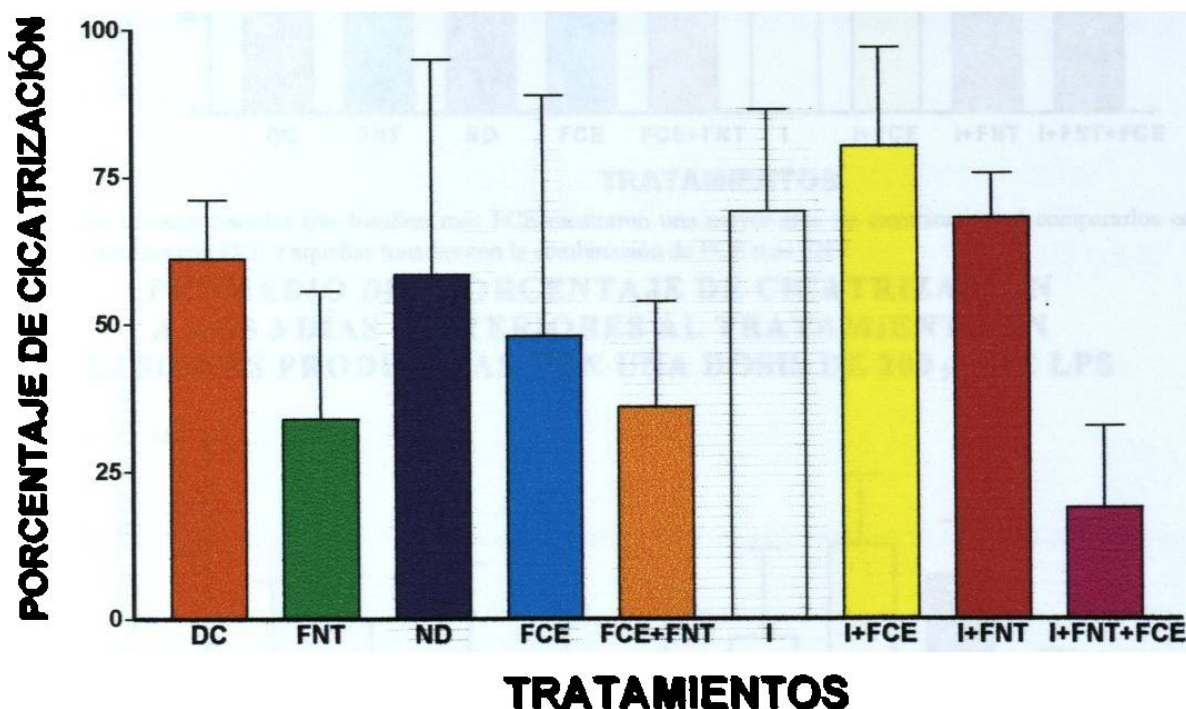


Fig. 5. Porcentaje de cicatrización a los tres días posteriores a la aplicación de los tratamientos, se puede observar que en este tiempo las lesiones tratadas con I+FCE mostraron el mayor porcentaje de cicatrización y en aquellas lesiones que fueron tratadas con la combinación de I+FNT+FCE ocurrió todo lo contrario, es decir, el menor porcentaje de cicatrización. (DC) Diabético Control, (FNT) Factor de Necrosis Tumoral, (ND) No Diabético, (FCE) Factor de Crecimiento Epidérmico, (I) Insulina.

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACIÓN
A LOS 3 DÍAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO EN
LESIONES PRODUCIDAS CON UNA DOSIS DE 100 μ g DE LPS.**

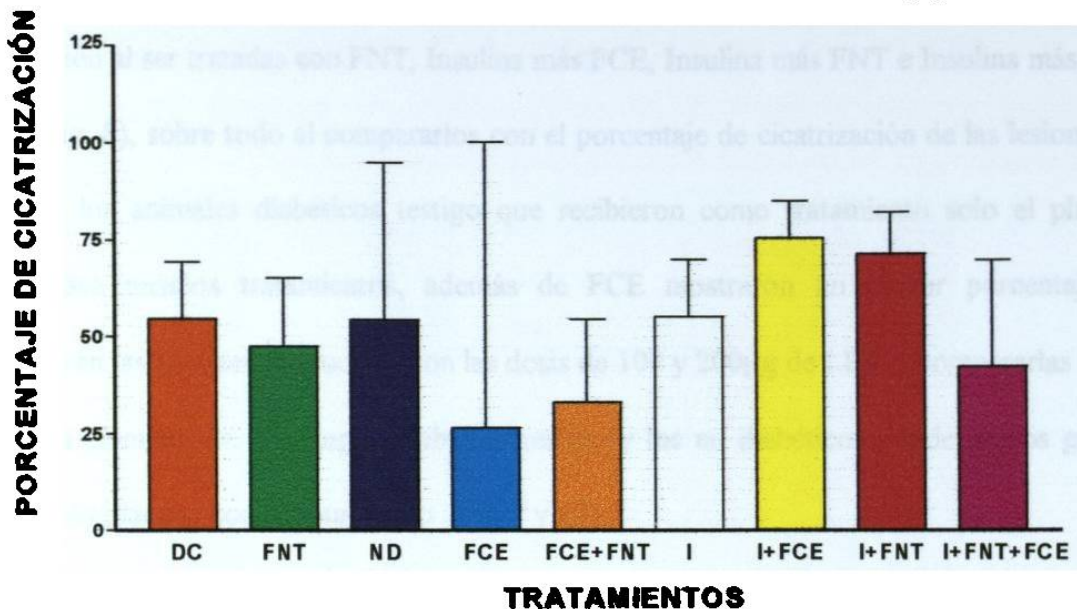


Fig.6. Las lesiones tratadas con Insulina más FCE mostraron una mayor área de cicatrización al compararlos con las lesiones tratadas con FCE y aquellas tratadas con la combinación de FCE más FNT.

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACIÓN
A LOS 3 DÍAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO EN
LESIONES PRODUCIDAS CON UNA DOSIS DE 200 μ g DE LPS**

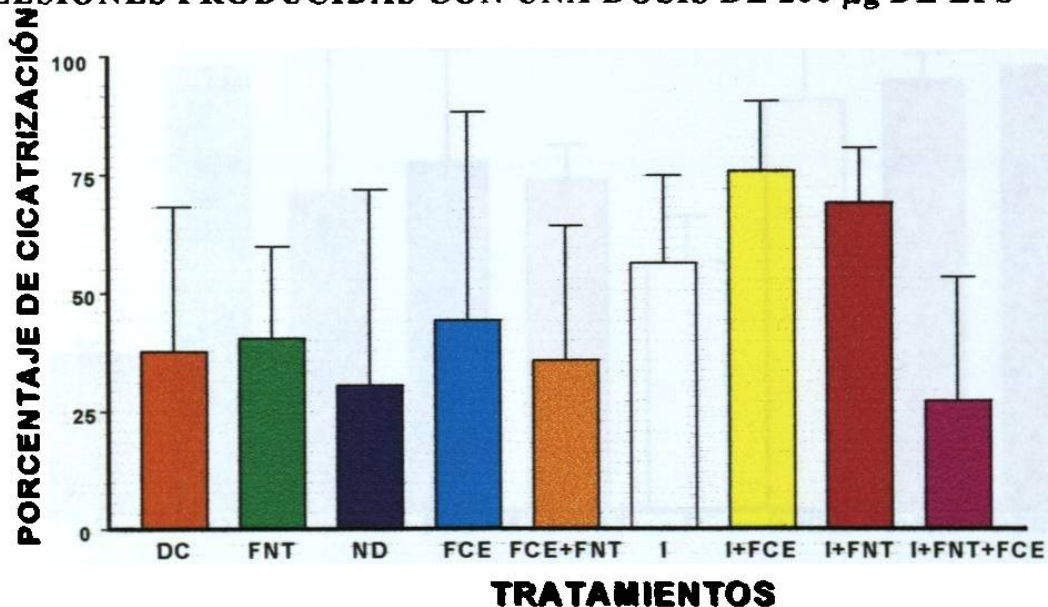


Fig.7. En las lesiones tratadas con Insulina más FCE, así como, en las tratadas con I más FNT, se observó el mayor porcentaje de cicatrización al compararlo con las lesiones que recibieron la combinación de los tres tratamientos.

Con respecto al porcentaje de cicatrización a los siete días posteriores al tratamiento podemos establecer que, en las lesiones producidas con una dosis de 50 μg mostraron un mayor porcentaje de cicatrización al ser tratadas con FNT, Insulina más FCE, Insulina más FNT e Insulina más FNT más FCE (Fig. 8), sobre todo al compararlos con el porcentaje de cicatrización de las lesiones de el grupo de los animales diabéticos testigo que recibieron como tratamiento solo el placebo ($p < 0.01$). Esto mismos tratamientos, además de FCE mostraron un mayor porcentaje de cicatrización en las lesiones producidas con las dosis de 100 y 200 μg de LPS al compararlas sobre todo con los animales de los grupos diabético testigo y los no diabéticos donde ambos grupos recibieron solo placebo como tratamiento (Fig.9 y 10).

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACIÓN
A LOS 7 DÍAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO EN
LESIONES PRODUCIDAS CON UNA DOSIS DE 50 μg DE LPS**

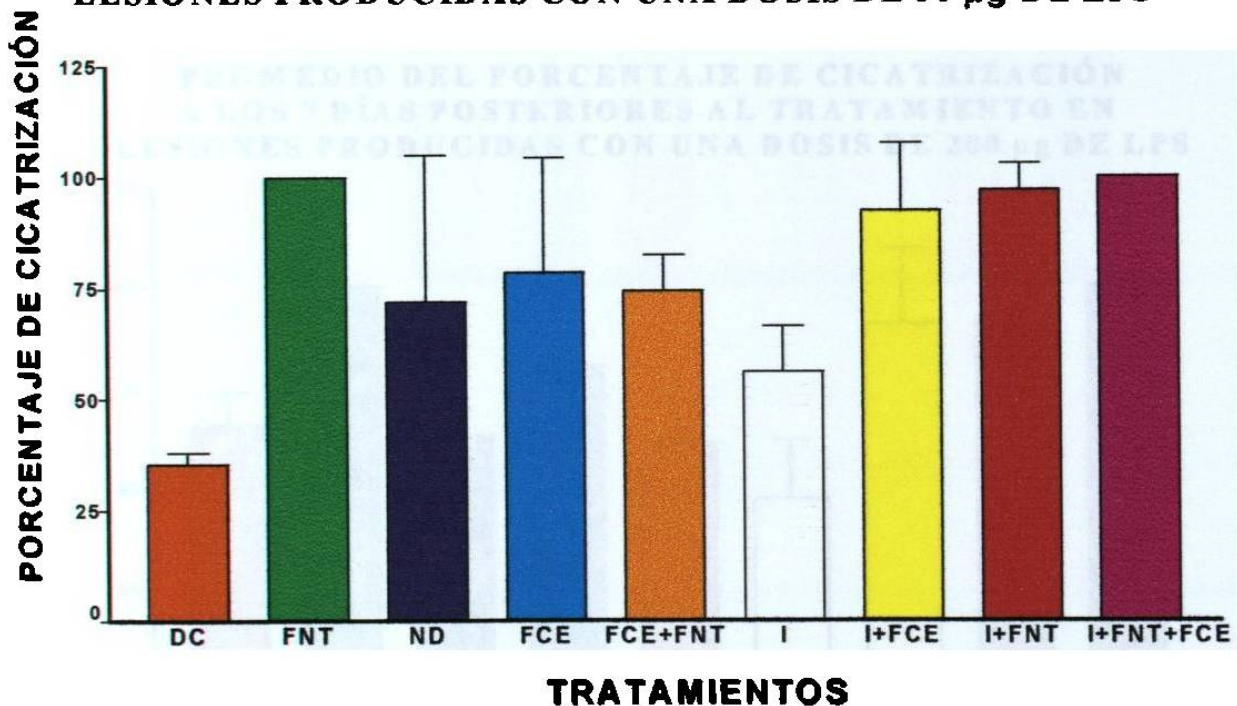


Fig.8. Las lesiones tratadas con FNT, Insulina más FCE, Insulina más FNT e Insulina más FNT más FCE mostraron casi un 100% de cicatrización, mientras que los animales diabéticos mostraron el porcentaje más bajo.

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACIÓN
A LOS 7 DÍAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO EN
LESIONES PRODUCIDAS CON UNA DOSIS DE 100 μ g DE LPS.**

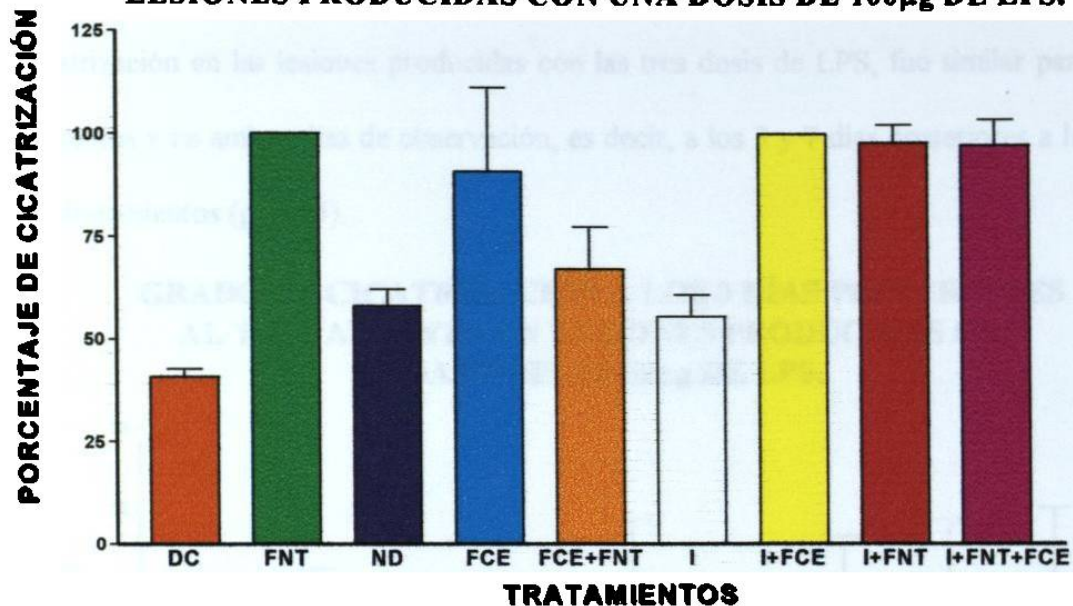


Fig.9. Casi todas las combinaciones de los tratamientos produjeron un 100% de cicatrización junto con el FNT, a excepción de las lesiones tratadas con FCE más FNT.

**PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACIÓN
A LOS 7 DÍAS POSTERIORES AL TRATAMIENTO EN
LESIONES PRODUCIDAS CON UNA DOSIS DE 200 μ g DE LPS**

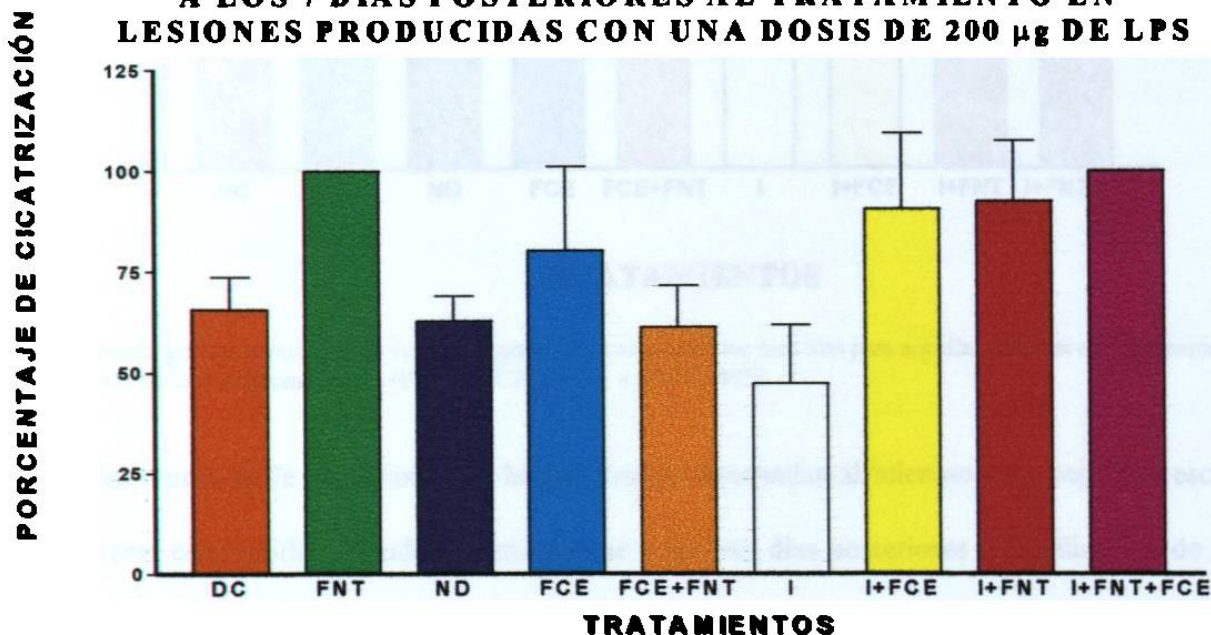


Fig.10. Las lesiones de los animales que pertenecieron a los DC y ND que recibieron solo placebo, mostraron el menor porcentaje de cicatrización, al compararlos con las lesiones tratadas con FNT, Insulina más FCE, Insulina más FNT e Insulina mas FNT mas FCE.

En la evaluación histopatológica para la determinación del grado de cicatrización tomando como base a las muestras de la piel teñidas con hematoxilina y eosina, se pudo determinar que el grado de cicatrización en las lesiones producidas con las tres dosis de LPS, fue similar para todos los tratamientos y en ambos días de observación, es decir, a los 3 y 7 días posteriores a la aplicación de los tratamientos ($p>0.05$).

**GRADO DE CICATRIZACIÓN A LOS 3 DÍAS POSTERIORES
AL TRATAMIENTO EN LESIONES PRODUCIDAS CON
UNA DOSIS DE 50 μ g DE LPS.**

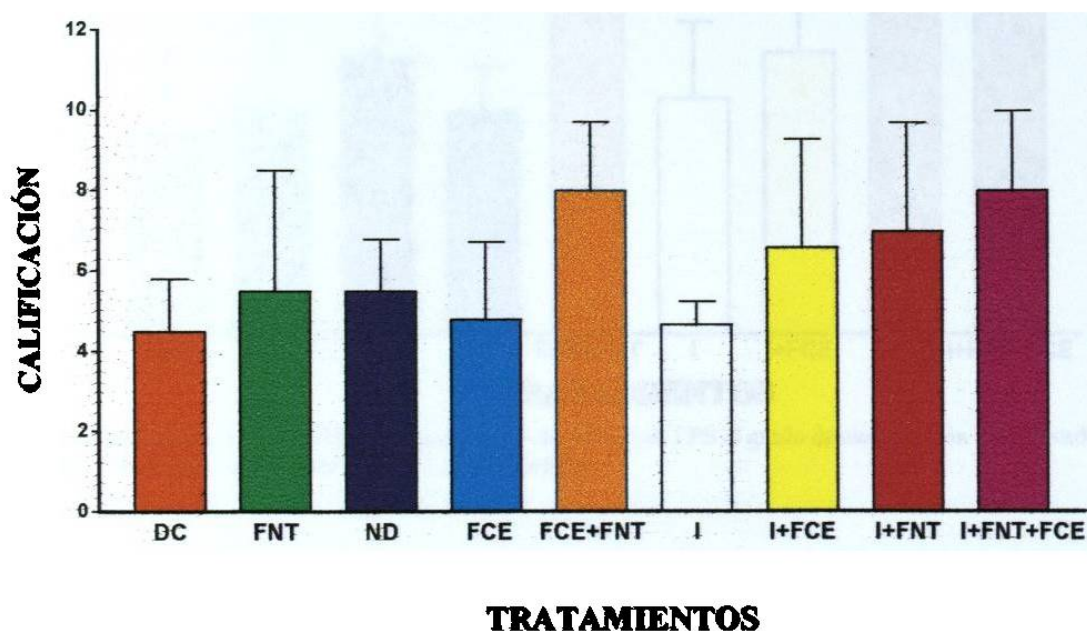


Fig. 11. En esta gráfica se puede observar que el grado de cicatrización fue más alto para aquellas lesiones que recibieron la combinación de los tratamientos FCE+FNT, I+FCE, I+FNT e I+FNT+FCE.

Todas las muestras de las lesiones de la piel fueron observadas al microscopio, bajo una escala previamente establecida, se pudo determinar que a los tres días posteriores a la aplicación de los tratamientos, en las lesiones producidas con una dosis de 50 μ g de LPS, el grado de cicatrización

más elevado fue para aquellas lesiones que recibieron cada uno de los tratamientos en forma combinada (Fig.11).

**GRADO DE CICATRIZACIÓN A LOS 3 DÍAS POSTERIORES
AL TRATAMIENTO EN LESIONES PRODUCIDAS CON
UNA DOSIS DE 100 μ g DE LPS.**

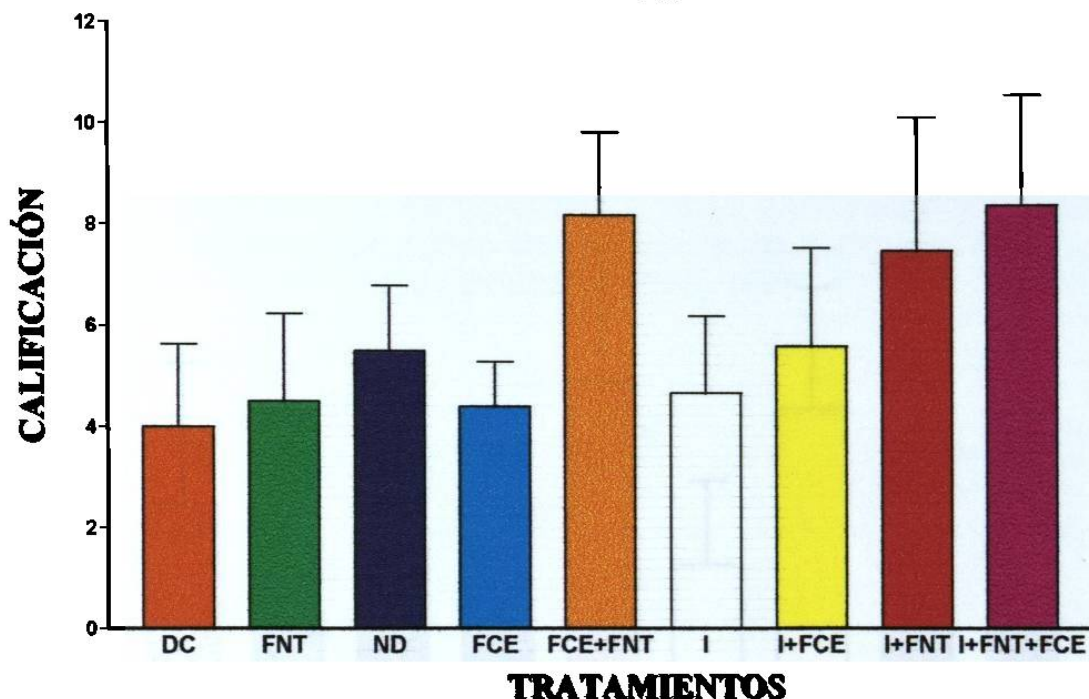


Fig. 12. En lesiones más graves producidas con una dosis de 100 μ g de LPS el grado de cicatrización más elevado fue para las lesiones tratadas con FCE+FNT, I+FNT e I+FNT+FCE.

En las lesiones producidas con 100 μ g de LPS se registro el mismo comportamiento que en las lesiones producidas con 50 μ g de LPS, donde se pudo observar que el grado de cicatrización en los no diabéticos estaba por encima del grupo diabético control y todavía arriba de las lesiones tratadas con los tratamientos aplicados en forma individual (Fig. 12). Con respecto al grado de cicatrización de las lesiones producidas con una dosis de 200 μ g de LPS, nuevamente las lesiones tratadas con las combinaciones de los tratamientos mostraron una mejor calidad de cicatrización,

pero en menor grado al compararlas con las lesiones producidas con 50 y 100 μ g de LPS, esto fue debido a que las lesiones fueron producidas con una cantidad mucho mayor de LPS, por lo tanto, el avance en el proceso de cicatrización se vio un poco más retardado (Fig.13). El grado de cicatrización también fue observado

**GRADO DE CICATRIZACIÓN A LOS 3 DÍAS POSTERIORES
AL TRATAMIENTO EN LESIONES PRODUCIDAS CON
UNA DOSIS DE 200 μ g DE LPS.**

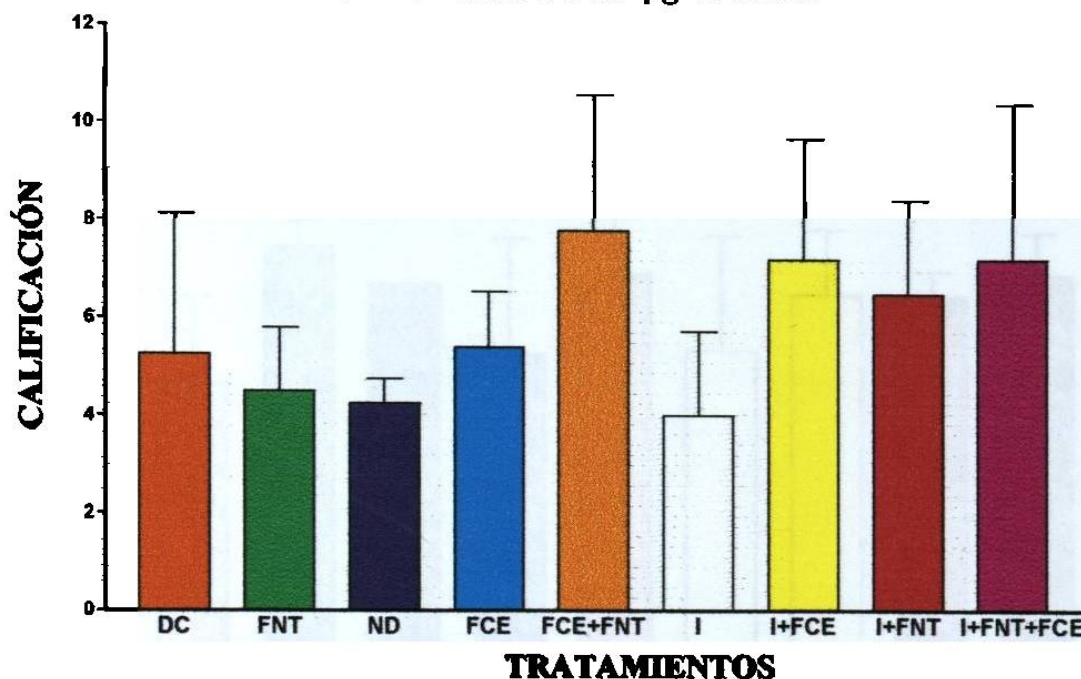


Fig.13. La combinación de los tratamientos en las lesiones producidas con 200 μ g de LPS mostraron una mejor calidad en la cicatrización al compararlos con los grupos No diabéticos (ND) , los diabéticos Control (DC) y aquellos que recibieron los tratamientos en forma individual.

a los 7 días posteriores al tratamiento, donde lógicamente, el grado de cicatrización fue más alto en todas las lesiones tratadas, ya sea, con los tratamientos en forma individual o en sus formas combinadas. En el caso de las lesiones producidas con 50 μ g de LPS, se pudo observar que las lesiones tratadas con FNT mostraron el mayor grado de cicatrización, al igual que las lesiones

tratadas con las combinaciones de los tratamientos, donde se comprobó además que las lesiones no tratadas de el grupo diabético control en su proceso de reparación no se vio mejor (Fig. 14).

En la figura 15, se puede observar un grado de cicatrización muy similar a las lesiones producidas con una dosis de 50µg de LPS, donde nuevamente las lesiones tratadas con TNF mostraron un mayor grado de cicatrización, en estas lesiones es importante observar como las lesiones tratadas con insulina

**GRADO DE CICATRIZACIÓN A LOS 7 DÍAS POSTERIORES
AL TRATAMIENTO EN LESIONES PRODUCIDAS CON
UNA DOSIS DE 50 µg DE LPS.**

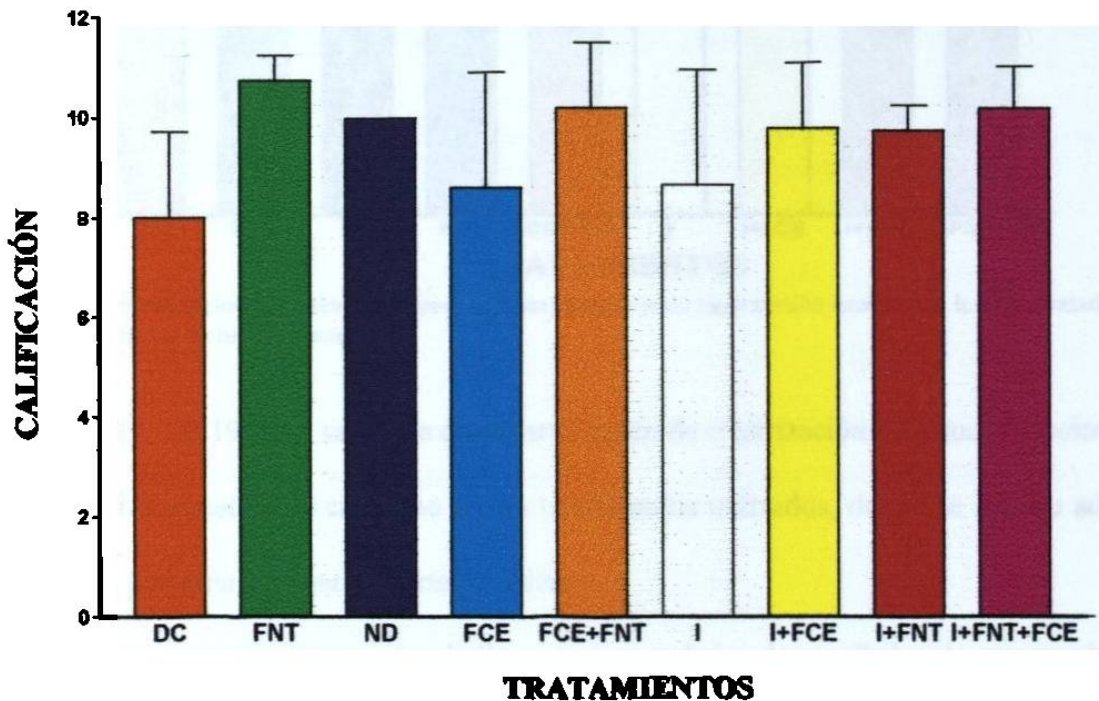


Fig.14. En las lesiones menos graves, producidas con la dosis más baja de LPS, las lesiones tratadas con FNT mostraron el grado de cicatrización más alto, conforme avanza el tiempo de observación, además las lesiones tratadas con las combinaciones de los tratamientos se comportaron de manera similar junto con el grupo de los no diabéticos.

mostraron un grado de cicatrización muy similar al grupo de los diabéticos control. Por último, en el daño de la piel producido con 200µg de LPS, que fueron las más graves, las lesiones tratadas

con FCE fueron las que mostraron un menor grado de reparación, y además es notorio la repetición de la acción del TNF sobre las lesiones al mejorar la cicatrización (Fig. 16).



Fig. 15. Todos los tratamientos aplicados mostraron un buen porcentaje de cicatrización excepto las lesiones tratadas con insulina y el grupo de los diabéticos control.

En las Figuras 17, 18, 19 y 20, se puede observar el grado de cicatrización de algunas muestras de la piel que fueron sometidos a cada uno de los tratamientos utilizados, donde se incluye además una muestra de piel sana a manera de comparación.

Los resultados de este experimento son similares a otros trabajos desarrollados de manera similar, por ejemplo, Cooper, M.L. y col. en 1991 usaron el FCE en lesiones de la piel que fueron sometidas a injertos donde el efecto de este factor sobre la epitelización fue substancial ya que, el tiempo de oclusión de estas heridas fue acortado significativamente.

**GRADO DE CICATRIZACIÓN A LOS 7 DÍAS POSTERIORES
AL TRATAMIENTO EN LESIONES PRODUCIDAS CON
UNA DOSIS DE 200 μ g DE LPS.**

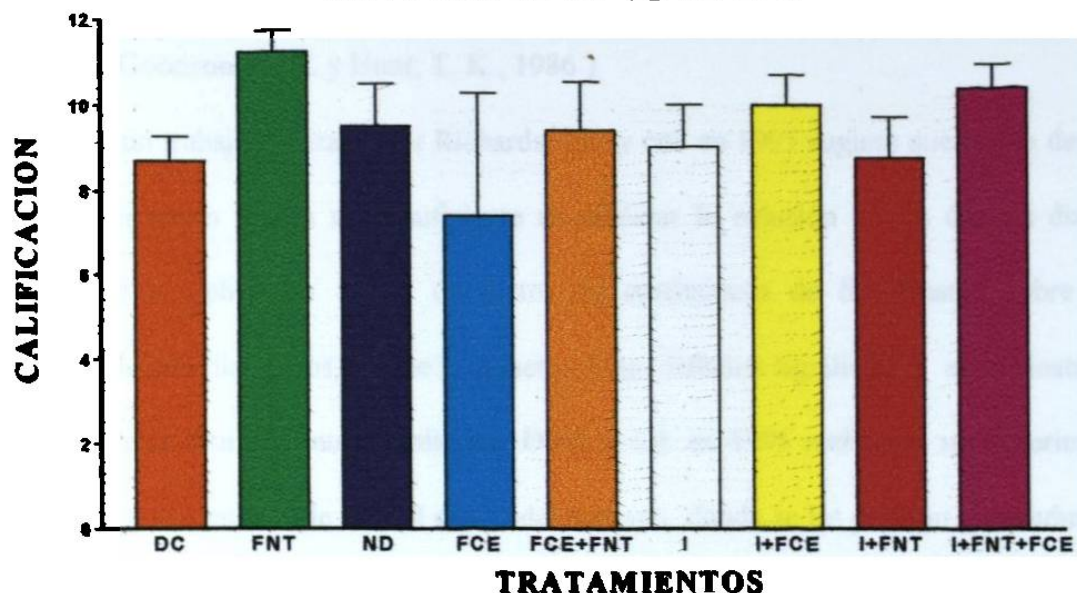


Fig 16 En las lesiones más graves producidas con la dosis más alta de LPS, las lesiones tratadas con FNT mostraron el mayor grado de cicatrización, al igual que las lesiones tratadas con las combinaciones de los tratamientos.

En otro experimento realizado por Mooney, D.P. y col. en 1990, donde utilizaron ratones sometidos a incisiones quirúrgicas en la piel del dorso, donde se utilizó el FNT, se pudo determinar que el tiempo de liberación del FNT en la herida es dependiente del vehículo utilizado, y en ese modelo, la administración local de FNT en la herida produjo un incremento en la fuerza de distensión de la herida, cuando se aplicó en forma combinada con colágena. El FNT afectó en forma positiva y significativa la cicatrización, cuando se aplicó localmente pero no cuando se administró en forma sistémica y se establece una hipótesis que sugiere que el FNT en la concentración adecuada, tiempo y vehículo, modula la cicatrización y que esta presente y activo en el proceso de reparación. Por otro lado, cuando se utilizó Insulina y la restricción de la dieta en ratones obesos, como lo hacen en humanos diabéticos adultos, ninguno de los dos procedimientos

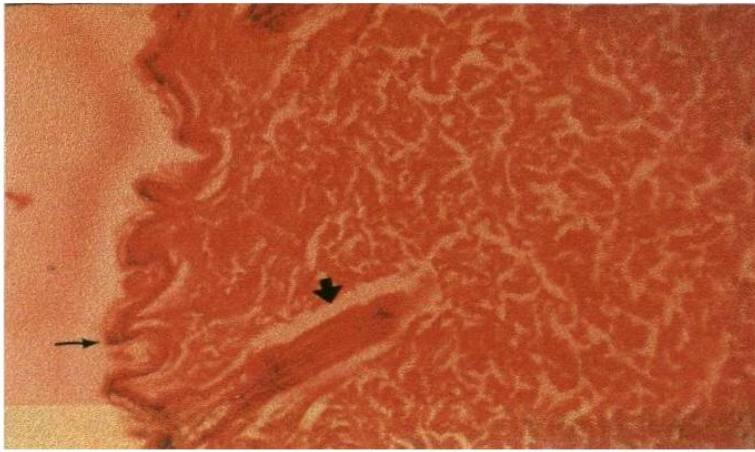
mejoran la cicatrización. Esto contrasta con otros modelos de diabetes (creados con alloxana o estreptozotocina) donde cualquier dosis de insulina programada corrige el defecto de la cicatrización (Goodson, W.H. y Hunt, T. K., 1986).

Por último en un trabajo realizado por Richards, J.L. y col. en 1995 sugiere que el uso de un solo factor de crecimiento podría ser insuficiente en acelerar la oclusión de las úlceras diabéticas, cuando utilizó la aplicación tópica de factor de crecimiento de fibroblastos sobre úlceras neuropáticas de pies diabéticos, ya que la diabetes causa defectos significantes en la cicatrización.

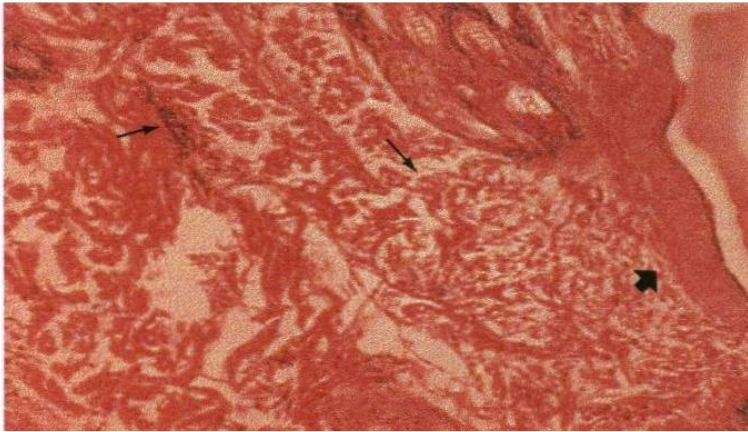
En relación a este último punto, Danilenko, D.M. y col. en 1995 realizaron un experimento en cerdos debido a la similitud de su piel con la del humano, donde se les produjo quemaduras en la piel del dorso y les aplicó la combinación del Factor BB de crecimiento derivado de plaquetas más el factor de crecimiento de queratinocitos, ambos indujeron cambios favorables significativos en la cicatrización.

La diabetes particularmente la hiperglucemia crónica puede inhibir la respuesta humoral y celular apropiada hacia la infección bacteriana, pero la principal condición patológica que facilita la infección del pie diabético es la pérdida de la barrera cutánea protectora, asociada con una úlcera crónica de la piel. Las anormalidades de la diabetes, las cuales teóricamente contribuyen a la falla en la cicatrización de las heridas incluyen efectos metabólicos, tales como, defectos en el metabolismo energético, acumulación de sorbitol en los tejidos, incremento en la glicosilación de proteínas, los cuales pueden resultar en la falla de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos de migrar hacia los sitios de daño tisular, una producción inadecuada e incoordinada de factores de crecimiento, inhibición de la síntesis y maduración de colágena y deficiencia de minerales y

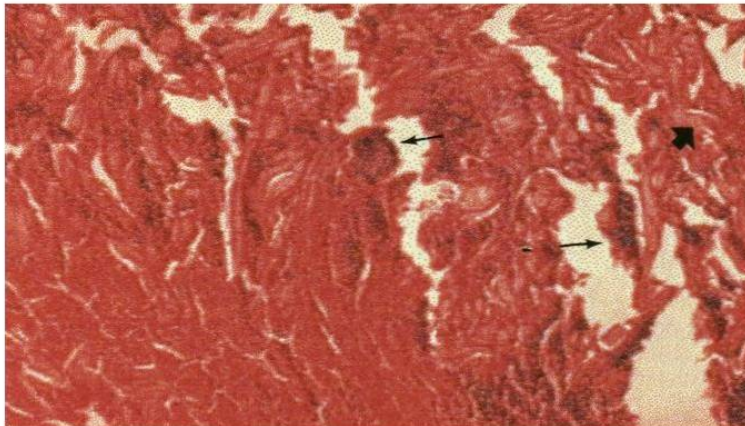
elementos trasa importantes para la reparación tisular, incluyendo al ácido ascórbico y al zinc
(Pecoraro, E. E., 1991).



A

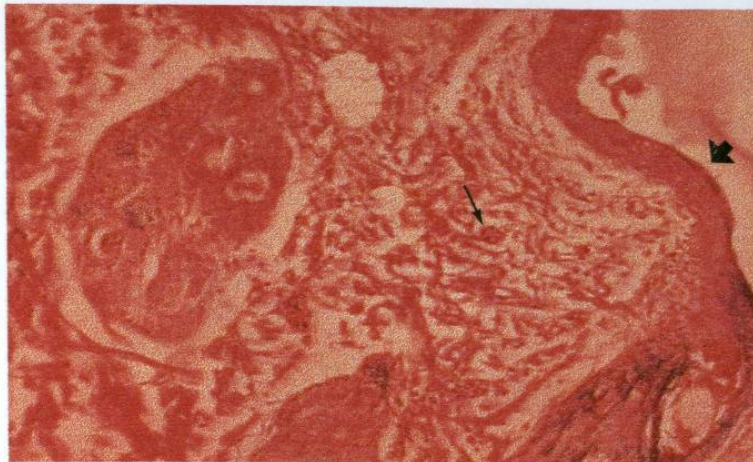


B

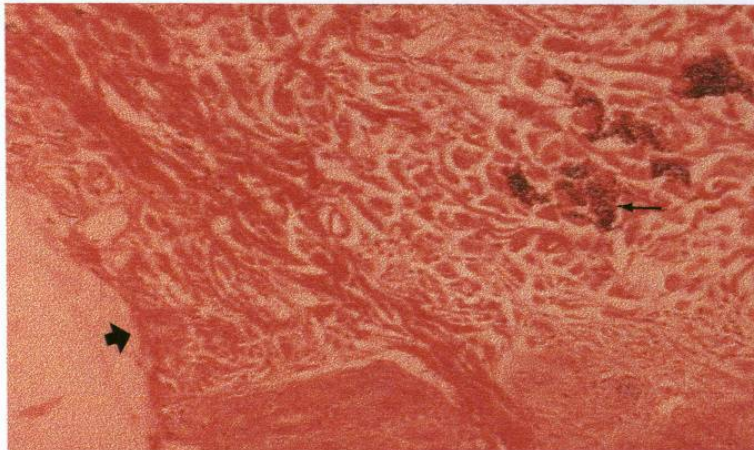


C

Fig. 17. A) piel sana, sin lesión donde se puede observar la epidermis con desfoliación de células queratinizadas (→) y la dermis con la presencia de un folículo piloso (▀). B) Lesión de la piel del grupo No diabético donde se puede observar escasas células inflamatorias y la reorganización del tejido conectivo (→), la dermis en su última etapa de organización, sin células inflamatorias y bastante engrosada (▀). C) Lesión de la piel del grupo Diabético control donde se observa abundantes células inflamatorias (→), escasa presencia de colágeno y fibroblastos y de la epidermis (▀). Cortes histológicos teñidos con H y E (100X).



A



B

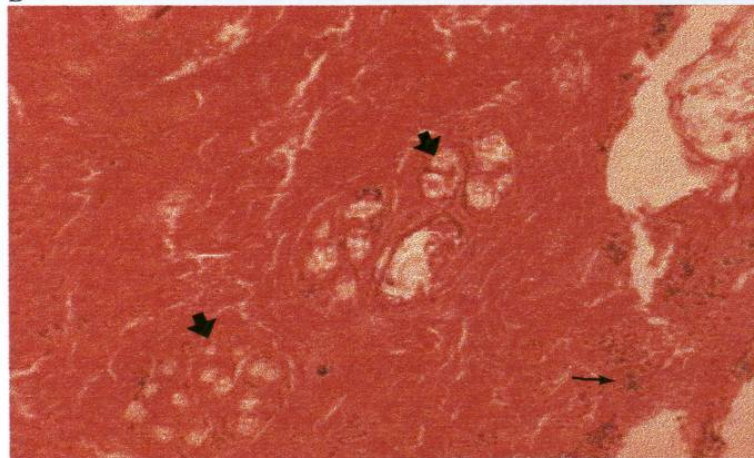
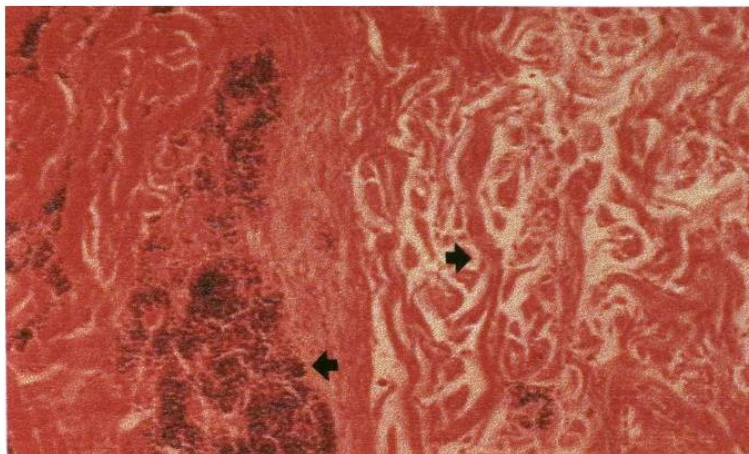
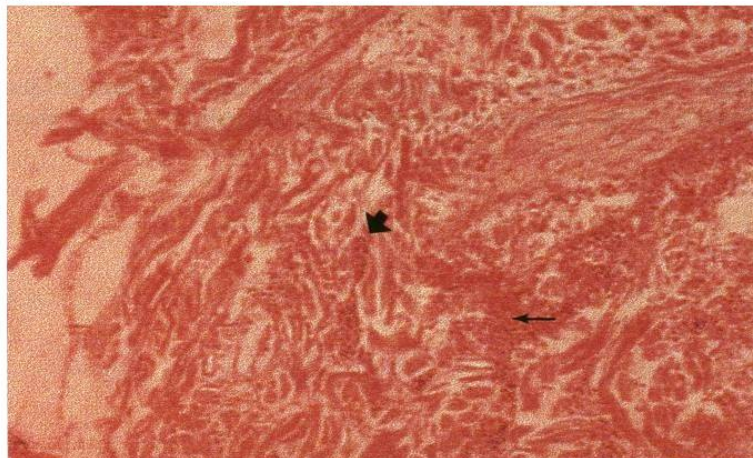


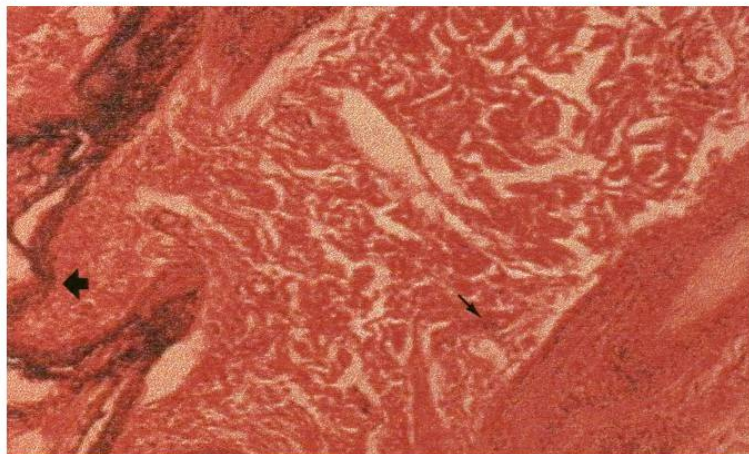
Fig. 18. A) Lesión de la piel de conejo tratado con FNT, se puede observar una buena organización de la dermis (→) la epidermis en forma continua ocluyendo totalmente la herida (▸). B) Lesión tratada con la combinación de FNT más Insulina, se puede notar la población de células inflamatorias tratando de organizar la dermis (→) y la ausencia total de la epidermis (▸). C) Lesión tratada con FNT más FCE más Insulina, se observa la migración de células inflamatorias (→) y la dermis con abundantes fibroblastos y colágena con la presencia de folículos pilosos (▸). Cortes histológicos teñidos con H y E (100X).



A



B



C

Fig. 19. A) Lesión de la piel tratada con FCE, se puede observar abundante población de células inflamatorias y escasos fibroblastos en tejido conjuntivo (➡). B) Lesión tratada con EGF + FNT se observa ausencia de epidermis con escasas células inflamatorias y fibroblastos (➡), escasa matriz extracelular (→). C) Lesiones tratadas con FCE más Insulina se puede observar células inflamatorias en la dermis tratando de organizarla y eliminar el tejido dañado (→), así como la capa superior de la piel casi en su estado normal (➡) (epidermis). Cortes histológicos teñidos con H y E (100X).

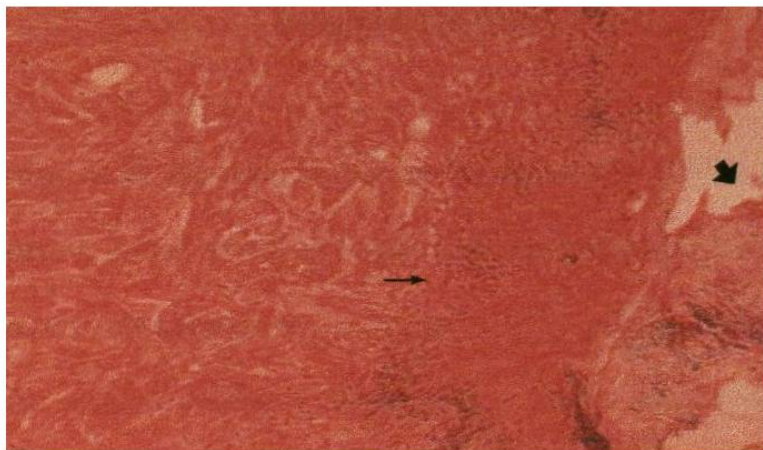


Fig. 20. Lesión en la piel de conejo tratada con Insulina, se aprecia escasas células inflamatorias y epidermis bastante engrosada (→), derprendimiento de tejido necrosado (➤). Corte histológico teñido con H y E (100X).

8. CONCLUSIONES

La aplicación local de las diferentes combinaciones de Insulina , FNT y FCE sobre los tres tipos de lesiones en la piel de conejos diabéticos producidas con las tres dosis de LPS, aceleraron el proceso de cicatrización, solamente el FNT en forma individual produjo una reparación tisular en menor tiempo al compararlo de la misma manera contra la Insulina y el FCE.

La inducción de la diabetes por medio de la alloxana en conejos es un modelo excelente para el estudio de esta enfermedad y sus posibles complicaciones asociadas. Una de ellas es la cicatrización donde este proceso se puede evaluar a través de la producción de la reacción de Shwartzman en la piel, lesión que asemeja en gran medida al daño inicial en la piel de los humanos que sufren de diabetes.

En la mayoría de las combinaciones de los tratamientos utilizados se redujo el tiempo de cicatrización. En Las lesiones tratadas con FNT se pudo observar que no producían una abundante migración celular hacia el sitio de la lesión, sin embargo, estas células fueron suficientes para producir una reducción total del área de la lesión y un 100% de cicatrización con una muy buena calidad de reparación al observar las lesiones en el microscopio y ser evaluadas histopatológicamente, por otro lado, las lesiones tratadas con I+FCE e I+FCE+FNT también mostraron un 100% de cicatrización con una muy buena calidad de reparación aún y cuando a los tres días posteriores al tratamiento el área de cicatrización se encontraba por debajo de las lesiones tratadas con I más FCE e I más TNF, pero a los 7 días

mostraron un grado de avance muy significativo en la oclusión de la herida como ya se mencionó anteriormente.

Es importante señalar que el FCE inhibe la acción del FNT cuando se aplicaron en forma conjunta y que el tratamiento a base de I+FCE e I+FNT producen una mayor cicatrización que la insulina cuando se aplica en forma individual. Además, al combinarse los tres tratamientos el efecto inhibitorio del FCE sobre el FNT queda suprimido por la presencia de la Insulina.

De este modo podemos sugerir que los tratamientos en las lesiones de la piel a base de FNT o la combinación de I+FCE o I+FCE+FNT pudieran acelerar el tiempo de cicatrización en pacientes humanos que sufren de diabetes o cualquier otro padecimiento donde se presenten alteraciones en el proceso de cicatrización.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Abrass, C.K. 1988. Measurement of the rates of basal Pinocytosis of horseradish peroxidase and internalization of heat aggregated by macrophages from normal and Streptozotocin induced diabetic rats. *Immunology*. 65: 411 - 415.
2. Bates, G.; Weiss, C. 1941. Delayed Development and Antibody to *Staphylococcus* Toxin in diabetic children. *Am. J. Dis. Child* 62: 346.
3. Beck, G.; Habitch, G.S.; Berach, J.L. and Miller, F. 1986. Interleukin 1: A common Endogenous Mediator of Immflamation and the Local Shwartzman Reaction. *The J. of Immunology*. Vol 136 No. 8 pp. 3025- 3031.
4. Boletín de Morbilidad y Mortalidad. 1994. Feb. Vol. IX No. 4. pp 26.
5. Brown, L.G.; Curtsinger, L.; Jutkiewickz, M.J.; Nahaj, F. and Schultz, G. 1991. Stimulation of Healing of Chronic Wound by Epidermal Growth Factor. *Plastic And Reconstructive Surgery*. Vol 88 No. 2 pp.189-194.
6. Brown, L. G.; Nanney, L. B.; Griffen, J.; Cramer, A. B.; Yancey, J. M.; Curtsinger III, L.J.; Holtzin, L.; Schultz, G.S.; Jurkiewicz, M. J.; Lynch, M.D. 1989. Enhancement of Wound Healing by Topical Treatment with Epidermal Growth Factor. *The New England J. of Medicine* Vol. 321 No. 2 pp. 76-79.
7. Cerda, A. C.E. 1994. Evolución de la Reacción Local de Shwartzman en Conejos Diabéticos. Tesis. FMVZ UANL.
8. Cid, M.C.; Kleinman , H.K.; Grant, D.S.; Schnaper, H.W.; Fauci, A.S. and Hoffman, G.S. 1994. Estradiol Enhances Leukocyte Bindig to Adhesion Molecules E-selentin, ICAM-1 and VCAM-1. *J. of Clin. Invest.* 93: 1 pp. 17-25.
9. Cooper, M.L.; Hansbrough, J.F.; Foreman, T.J. ; Sakabu, S.A. and Laxer, J.A. 1991. Clinical and Experimental Aproaches to dermal and Epidermal Repair: Normal And Chronic Wounds, pp 429 - 442.
10. Danilenko, D.M.; Ring, B.D.; Tarpley, J.E.; Morris, B.; Van, G.Y.; Morawiecki, A.; Callahan, W.; Goldenbeg, M.; Hershenson, S.; and Pierce, G.F. 1995. Growth Factors in Porcine Full and Partial Thicknes Burn Repair. *American Journal of Pathology*. Vol. 147 No. 5 pp.1261 - 1277
11. Darnell, J.; Lodish, H. and Baltimore, D. 1990. *Molecular Cell Biology*. Second. Ed. Scientific American Books, New York, U.S.A. pp. 743-747.

12. Davidshon, I. and Henry, J.B. 1979 *Diagnóstico Clínico para el Laboratorio*. Ed. Salvat sexta Edición pp. 624-625.
13. Durry, M.I. 1990. *Diabetes mellitus 2ª*. Ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid España.
14. Gayton, A.C. 1987. *Fisiología Humana*. Editorial interamericana. Sexta edición México pp 596 - 602..
15. Goodson, W.H. and Hunt, T.K. 1986. Wound Collagen Accumulation in Obese Hyperglycemic Mice. *Diabetes*. Vol. 35 pp. 491 -495.
16. Greenhalgh, D. G.; Sprugel, K.H.; Murray, M. J. and Ross, R. 1990. PDGF and FGF Stimulate Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse. *Am. J. of Pathology* Vol.36 No. 6 pp. 1235-1246.
17. Grotendorst, G. R.; Martin G.R., Pencev, D.; Sodek, J. and Harvey, A. 1985 Stimulation of Granulation Tissue Formation by Platelet Derived Growth Factor in Normal and Diabetic rats. *J. Clin. Invest.* Vol. 76 pp. 2323- 2329.
18. Hennessey, P. J.; Black, C.T. and Andrassy, R. J. 1990 Epidermal Growth Factor and Insulin Act Sinergistically During Diabetic Healing. *Arch. Surg.* Vol. 125 pp. 926-929.
19. Hunt, Tomas K. 1983. *Cicatrización e Infección de las Heridas. Teoría y Práctica Quirúrgica*. Editorial Manual Moderno, México, Capítulos 1,2,9. Pp1,11,107.
20. Johnson, J.E. 1970 *Infection and Diabetes*. In: *Diabetes Mellitus Theory and Practice*. MacGraw Hills New York. pp 734.
21. Jubiz, W. 1981. *Endocrinología Clínica*. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. pp 149 - 202.
22. Karp, G. 1992. *Biología Celular*. Ed. Mc. Graw-Hill segunda Ed. México. pp 710-713.
23. Lynch, S. E.; Calvin, R. B. Antoniades, H. N. 1989. Growth Factors in Wound Healing. *J. Clin. Invest* Vol. 84 pp 640-646.
24. MacCuish, A.C.; Urbaniak, S.J.; Campbell, C.J. 1974. Phytohemagglutinin Transformation and Circulating Lymphocyte subpopulation in insulin - Dependent diabetic patients. *Diabetes*; 23 .708.
25. Mooney, D.P.; O Reilly, M and Gamelli,R.L. 1990. Tumor Necrosis Factor and Wound Healing. *Ann. Surg.* Vol. 211. No. 2. pp 124 - 129.

26. Mori, W. 1981. The Shwartzman reaction: A Review Including Clinical Manifestation and Proposal for a Univisceral or Single Organ Third Type. *Histopathology* 5 pp 113-126.
27. Movat, H.Z.; Burrowes, C. E.; Cybulsky, M. I. and Dinarello, C. A. 1987. Acute Inflammation and a Shwartzman - like Reaction Induced by Interleukin -1 and Tumor Necrosis Factor. *American J. of Pathology* Vol. 129 No. 3 pp. 463-476.
28. Nevárez, G. A. M. 1991 Evaluación de la Respuesta Inflamatoria Provocada por la Reacción de Arthus en el Pulmón de Conejos Diabéticos. Tesis. FMVZ.UANL.
29. Nicolof, B.J. and Naidu, Y. 1994. Perturbation of Epidermal Barrier Function Correlates with Initiation of Citokine Cascade in Human Skin. *J of Amer. Academ. of Derm.* 30:4 pp 535-545.
30. Pecoraro, R.E. 1991. The Nonehealing Diabetic Ulcer. A Major Cause for Limb Loss. *Clinical and Experimental Approaches to Dermal and Epidermal Repair: Normal and Chronic Wounds.* pp. 27 -43.
31. Perez, M.I. and Khon, S.R. 1994. Cutaneous Manifestation of Diabetes Mellitus. *J. Academ. Derm.* 30:4 pp 519-531.
32. Ramos Rodríguez, H.G. 1994. *Ciencia Veterinaria.* Vol. 6 pp348 - 371.
33. Rayfield, E.J.; Ault, M.J.; Keusch, M.J.; Nechemias, C. and Smith, H. 1982. Infection and Diabetes: the case for Glucose Control. *The Am. J. of medicine* Vol.72 pp. 439-450.
34. Richards, J.L., Richard, C.P.; Daures, J.P.; Clouet, S.; Vannereau, D.; Bringer, J.; Rodier, M.; Jacob, C.; and Comte-Bardonnet, M. 1995. Effect of Topical Basic Fibroblast Growth Factor on the Healing of Chronic Diabetic Neuropathic Ulcer of the Foot. *Diabetes Care,* Vol. 18 No.1 pp64 -69.
35. Roitt, I.; Brostoff, J. and Male,D. 1993. *Immunology.* Editorial Mosby. 3a. Edición. Capítulo 8. U.S.A. pp 8.1 - 8.15.
36. Rothe, M.J. and Falanga, V. 1992. Growth Factors and Wound Healing. *Clinics in Dermatology.* 9: 553-559.
37. Rothe, H.; Ongoren,C.; Martin,S.; Rosen,P. and Kold,H. 1994. Abnormal TNF alpha Production in Diabetes Pronne BB Rats Enhanced TNF alpha Expression and Deffective PGE 2 Feedback Inhibition. *Immunology* 91:3 pp. 407-413.

38. Silber, A.; Newman, W.; Reimman, K.A.; Hendricks, E.; Walsh, D. and Ringler, D.J. 1994. Kinetics Expression of Endothelial Adhesion Molecules and Relationship to Leukocyte -Recruitment in two Cutaneous Models of Inflammation. *Lab. Invest.* 70:2 pp.163-175.
39. Steel, R.G.D. and Torrie, J. H.1980. Principles and Procedures of Statistics. McGraw Hill. New York. U.S.A. Capítulos 7 y 8 pp137 -191.
40. Tormo Bravo, B.R.1993. Inmunohistoquímica Empleando Anticuerpos monoclonales. CIM. Manual de Procedimientos. La Habana, Cuba. Pp.3 -10.
41. Tsai, J. C.; Feingold , K. R.; Crumrine, D.; Wood, L. C.; Grufeld, C.; and Elias, P. M. 1994 Permeability Barrier Disruption Alters the Localization and Expression of TNF alpha / protein in the Epidermis. *Arch. of Derm. Res.* 286:5 pp 242-248.
42. Wanckowics, Z.; Megyeri, P. and Issekutz, A. 1988 Synergy Between Tumour Necrosis Factor a Interleukin-1 in the Induction of Polymorphnuclear Leukocyte Migration During Inflammation. *J. of Leukocyte Biology* 43:349-356.
43. Weringer, E.J.; Kelso, J.M.; Tamai, I.Y. and Arquilla, E.R. 1982. Effects of Insulin On Wound Healing In Diabetics Mice. *Acta Endocrinologica* 99: 101-108.

