



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Química-Instituto de Ciencias

Posgrado en Ciencias Químicas

“Efecto del cadmio en la migración celular relacionado con la actividad de MMP-2 y MMP-9 durante las etapas de inflamación y proliferación del proceso de cicatrización en lesiones producidas en rata nude”

Noviembre del 2020

Tesis presentada para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular

Presenta:

Nadia Mariela Varela Pérez

Director de tesis:

D. C. Eduardo Miguel Brambila Colombres



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Bertha Alicia León Chávez, M.C. Alejandro Cesar Ruiz Tagle, Dr. Julio César Morales Medina y la Dra. Patricia Aguilar Alonso, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Efecto del cadmio en la migración celular relacionado con la actividad de MMP-2 y MMP-9 durante las etapas de inflamación y proliferación del proceso de cicatrización en lesiones producidas en rata nude”**, que presenta la alumna **Nadia Mariela Varela Pérez** para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintitrés días del mes de octubre del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Dra. Bertha Alicia León Chávez

M.C. Alejandro Cesar Ruiz Tagle

Dr. Julio César Morales Medina

Dra. Patricia Aguilar Alonso

Dedicatorias

A Dios:

Por todo el amor, la misericordia y la gracia que ha derramado en mi familia todo el tiempo.

A mis papás Jenaro y Male:

Por todo el amor, el apoyo, la paciencia y el cuidado que han tenido conmigo siempre.

A mi hermana Jaret:

Por toda la alegría y la comprensión que me ha brindado.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por ser una instancia que me apoyó para la realización de mi tesis con el número de beca 2018-000012-01NACF-03256.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por su apoyo a través del proyecto 0329, así como su impulso a la formación de recursos humanos.

Al Posgrado en Ciencias Químicas por darme la oportunidad de ingresar a su programa de Maestría en Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular.

Al Dr. Eduardo Miguel Brambila Colombres por el apoyo, la dirección, confianza y oportunidad brindadas para la realización de este proyecto.

A los Doctores que han participado como comisión revisora de este proyecto Dra. Bertha Alicia León Chávez, Dra. Patricia Aguilar Alonso, M. C. Alejandro Cesar Ruiz Tagle y al Dr. Julio César Morales Medina, por sus aportes, sugerencias, y la revisión de esta tesis.

Al Bioterio “Claude Bernard” por proporcionar a los animales de experimentación y por el apoyo otorgado durante la realización del proyecto de investigación.

Al M. V. Z. Francisco Ramos Collazo por su asesoría, apoyo y confianza en el manejo de los animales de laboratorio.

A la M. V. Z. Iliana Gutiérrez Jiménez por su asesoría y apoyo en el manejo de los animales de laboratorio.

A la Dra. Irma Pilar Herrera Camacho por su apoyo y confianza para hacer uso de las instalaciones del laboratorio de “Bioquímica y Biología Molecular”.

Resumen

La piel es un órgano importante debido a su función protectora, cuando sufre un daño es necesaria una adecuada cicatrización para restaurar la funcionalidad del tejido. La cicatrización consta de 3 fases: inflamación, proliferación y migración, y remodelación. En la segunda fase tiene lugar la degradación de la matriz extracelular por parte de matriz metaloproteinasas, enzimas dependientes de Zn, permitiendo la movilización de células hacia la lesión. Actualmente se han reportado metales divalentes sin actividad biológica que pueden sustituir biometales en sistemas proteicos, causando efectos negativos. En el caso del Cd, son pocos los estudios relacionados con un efecto negativo sobre la cicatrización, por lo que en este trabajo se evaluó el efecto de 2 vías de administración de Cd en la cicatrización. El primer grupo, constituido por ratas macho de la cepa nude fue administrado con 0.005, 0.010 y 15 ppm de Cd por vía oral (en agua potable) durante 8 semanas. A los animales se les realizaron incisiones de 8 mm de diámetro en el dorso y posteriormente una biopsia a diferentes tiempos (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 7 d, 14 d y al tiempo final). En un segundo grupo, se realizó la administración tópica de Cd a las concentraciones mencionadas y directamente en las incisiones de los animales, tomando biopsias a los mismos tiempos. En las muestras se realizó la cuantificación de metales por ICP-OES, análisis histológicos, detección de células totipotenciales empleando anticuerpos CK15 y CK19 y se cuantificó la actividad de MMP-2 y MMP-9. Los resultados mostraron modificaciones en los niveles de Zn, Cu y Ca, sin embargo, a la concentración más alta (15 ppm Cd) fue más evidente un retraso en la cicatrización. Los resultados también mostraron mayor infiltración de neutrófilos, disminución de la migración de células totipotenciales epidérmicas, epidermis engrosada y aumento en la actividad de MMP-9, características de las heridas crónicas. Tomando en cuenta las similitudes que presentan nuestros modelos con los de heridas crónicas, suponemos 3 mecanismos, relacionados con las funciones de Zn, Cu y Ca, por los cuales la administración de Cd tiene efectos negativos en la cicatrización.

Abstract

Skin is an important organ due to its protective function, therefore, when it is damaged, is necessary an adequate wound healing to restore the functionality of the tissue. Wound healing consists of 3 phases: inflammation, proliferation and migration, and remodeling. In the course of the second phase, matrix extracellular degradation is carried out by the Zn-dependent enzymes named matrix metalloproteinases, allowing the cell migration until the wound. Currently, divalent metals without biological activity have been reported that can replace a number of essential metals from protein systems, causing a negative effect on wound healing, therefore, in this research we evaluated the effect of Cd administration by two different routes on wound healing. The first group, nude male rats, were administered with 0.005, 0.010 and 15 ppm Cd orally (in drinking water) for 8 weeks. Subsequently wounds with 8 mm diameter were made in the animals and wound biopsies were taken at different times (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 7 d, 14 d and at final time). In a second group, topical Cd was administered, at the same concentrations, directly in the incisions made to the animals, and biopsies were taken at the same times, as in the oral administration. Metals in the samples were quantified using ICP-OES, also was carry out histological analysis, stem cell detection (using CK15 and CK19 antibodies) and MMP-2 and MMP-9 activity were quantified. Results showed modifications in Zn, Cu and Ca levels, however, data obtained with the highest concentration (15 ppm Cd) a delay in healing was more evident. Results also showed a neutrophils infiltration increase in the wound, decreased migration of epidermal stem cells, thickened epidermis, and increased MMP-9 activity, all these characteristics showed by chronic wounds. According to the similarities that our models present with those of chronic wounds, we assume 3 mechanisms, related to the functions of Zn, Cu and Ca, by which Cd administrations has negative effects on wound healing.

Índice

Oficio de aprobación de la comisión revisora de tesis para la impresión.....	2
Dedicatorias.....	3
Agradecimientos.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Índice.....	7
Lista de abreviaturas.....	9
Lista de gráficas y figuras.....	11
Lista de tablas.....	14
Capítulo I. Introducción, antecedentes, hipótesis y objetivos.....	15
Introducción.....	15
Anatomía y función de la piel.....	15
Proceso de cicatrización.....	18
Matriz metaloproteinasas (MMPs).....	25
Metalotioneínas (MTs).....	27
Toxicidad del cadmio (Cd).....	28
Antecedentes.....	29
Planteamiento del problema.....	31
Justificación.....	31
Hipótesis.....	32
Hipótesis nula.....	32
Hipótesis alternativa.....	32
Objetivos.....	32
Objetivo general.....	32
Objetivos específicos.....	32
Capítulo II. Parte experimental.....	33
Diagrama experimental.....	33
Animales.....	33
Lesiones en piel.....	34
Cuantificación de metales.....	34
Histología.....	35

Inmunohistoquímica	35
Recuperación antigénica	36
Inactivación de peroxidasa endógena.....	36
Bloqueo y anticuerpo primario.....	36
Anticuerpo secundario.....	36
Revelado.....	36
Actividad de MMP-2 y MMP-9.....	37
Preparación de la muestra	37
Determinación de proteínas totales	37
Zimografía.....	37
Análisis estadístico.....	38
Capítulo III. Resultados y discusión.....	39
Cuantificación de metales	39
Exposición a Cd y comportamiento de la cicatrización de las heridas	47
Efecto del Cd sobre la estructura de la piel.....	53
Semicuantificación de colágeno tipo I.....	62
Presencia de polimorfonucleares, neutrófilos (PMN).....	65
Detección de células totipotenciales	68
Actividad de MMP-2 y MMP-9.....	75
Capítulo IV. Conclusión.....	83
Bibliografía.....	85
Anexos	93
Anexo 1	93
Tinción de Hematoxilina Eosina	93
Tinción tricrómica de Masson.....	93
Mieloperoxidasa	93
Anexo 2.....	95
Anexo 3.....	96

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
APS	Persulfato de amonio
Au	Oro
Ca	Calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CEP	Células endoteliales progenitoras
CK15	Citoqueratina 15
CK19	Citoqueratina 19
CTR1	Transportador de cobre 1
Cu	Cobre
DAB	Diaminobencidina
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
Fe	Hierro
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HE	Hematoxilina eosina
Hg	Mercurio
HIF	Factor inducible de hipoxia
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente
IGF-1	Factor de crecimiento derivado de insulina
IKKB	Inhibidor del factor nuclear kappa-B quinasa subunidad beta
IL	Interleucina
Kg	Kilogramos
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LTB4	Leucotrieno B4
MEC	Matriz extracelular

Mg	Magnesio
mg	Miligramos
MMPs	Matriz metaloproteinasas
MPO	Tinción de mieloperoxidasa
MTs	Metalotioneínas
N	Nitrógeno
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos
NOM	Norma Oficial Mexicana
O	Oxígeno
PBS	Buffer de fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SC	Células totipotenciales
SEM	Error estándar de la media
SDF	Factor derivado se células del estroma
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TGF- α	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U.A.	Unidades arbitrarias
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VDR	Receptor de calcitriol
Zn	Zinc

Lista de gráficas y figuras

Figura 1. Anatomía de la piel, que muestra la epidermis, capa más externa de la piel y que, posteriormente la dermis que se encuentra mayormente irrigada y que contiene glándulas sudoríparas y los folículos pilosos, y finalmente el tejido subcutáneo (2).	15
Figura 2. Estratos de la epidermis, en el fondo cerca de dermis se encuentra el estrato basal conformado por células con una actividad mitótica, posteriormente se encuentre el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido y finalmente el estrato córneo más externo que se compone de células muertas queratinizadas (Lumen Anatomy and Physiology I. https://courses.lumenlearning.com/cuny-csi-ap-1/chapter/organ-level-skin-epidermis-and-dermis/ (Acceso 3 febrero 2020) Organ Level-Skin (Epidermis and Dermis).	16
Figura 3. Corte de la piel que muestra la región papilar y reticular de la dermis, así como también un folículo piloso con su glándula sebácea (6).	17
Figura 4. Fases del proceso de cicatrización con las principales células involucradas (Gonzalez, A. C.; Costa, T. F.; Andrade, Z.; Medrado, A. (2016). Wound healing - A literature review. <i>An. Bras. Dermatol.</i> 2016, 91(5), 614-620).	18
Figura 5. Fase de inflamación. 1) Las plaquetas son las primeras en llegar al sitio de la lesión para promover la coagulación, 2) posteriormente inician la secreción de factores de crecimiento que contribuyen principalmente al reclutamiento de neutrófilos y monocitos circulantes al sitio de la lesión, y a la proliferación de los fibroblastos y de las células totipotenciales. 3) Los macrófagos a su vez liberan que factores de crecimiento que promueven el inicio de la angiogénesis y proliferación de fibroblastos para poder dar paso a la etapa de proliferación y migración (12).	20
Figura 6. Fase de proliferación. Eventos: proliferación, donde los fibroblastos migran hacia el sitio de la lesión en respuesta a los factores liberados por plaquetas y neutrófilos, liberando MMPs y otros componentes de la MEC; neovascularización, que es estimulada por VEGF, FGF; formación del tejido de granulación como MEC temporal; epitelización por parte de las células totipotenciales de la membrana basal de los bordes de la herida (12, 19).	22
Figura 7. Fase de remodelación, donde hay una abundante presencia de fibroblastos y células totipotenciales en el sitio de la herida, principalmente la dermis, así como también hay una abundante presencia de fibras de colágeno, y en menor cantidad factores de crecimiento y MMPs (21).	23
Figura 8. Estructura de las gelatinasas (34).	27
Figura 9. Sitio de la herida de una rata tratada durante 7 días con 1% de cloruro de cadmio (59).	29
Figura 10. A y B: Morfología típica de la piel de los anfibios. C y D: Morfología de la piel después de la exposición a Cd en una concentración de 44.5 nM/L por 3 meses (60).	30
Figura 11. A: Morfología de la piel del grupo control. B: Grupo administrado con 5 ppm. C: Grupo administrado con 50 ppm (61).	30
Figura 12. Diagrama experimental	33
Figura 13. Cuantificación de Cadmio en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y en el grupo de 15 ppm Cd vía tópica.	39

Figura 14. Cuantificación de Zinc en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y los grupos administrados con Cd. A) Vía oral y B) Vía tópica.....	41
Figura 15. Cuantificación de Cobre en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y los grupos administrados con Cd. A) Vía oral y B) Vía tópica.....	42
Figura 16. Cuantificación de Calcio en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y los grupos administrados con Cd. A) Vía oral y B) Vía tópica.....	44
Figura 17. Cuantificación de Magnesio en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y los grupos administrados con Cd. A) Vía oral y B) Vía tópica.....	46
Figura 18. Vista macroscópica de las heridas del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía oral a diferentes tiempos.	50
Figura 19. Vista macroscópica de las heridas del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía tópica a los diferentes tiempos.	52
Figura 20. Porcentaje del área del tejido cicatricial del grupo control y de los grupos administrados vía oral (A) y tópica (B).	53
Figura 21. Histología del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía oral a los diferentes tiempos, HE 10X. Las flechas indican alteraciones en el grosor de la epidermis. E: epidermis, D: dermis y FH: fondo de la herida.	56
Figura 22. Histología del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía tópica a los diferentes tiempos. HE 10X. Las flechas indican alteraciones en el grosor de la epidermis. E: epidermis, D: dermis y FH: fondo de la herida.	59
Figura 23. Alteraciones en el grosor de la epidermis del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía oral y tópica a los 7 días. Tricromica de Masson 10X. E: epidermis, D: dermis, C: coágulo de fibrina.	60
Figura 24. Densidad de colágeno en la dermis de los grupos de animales control y administrados con 15 ppm de Cd por vía oral y tópica a los 7, 14 días y al tiempo final. Tricromica de Masson 20X. D: dermis, E: epidermis.	64
Figura 25. Presencia de PMN en el sitio de la lesión a las 48h en el grupo control. Tinción de Mieloperoxidasa. 20X. D: dermis, FH: fondo de la herida.	67
Figura 26. Cuantificación de PMN presentes en el tejido de la herida en el grupo control y de los grupos administrados con Cd vía A) oral y B) tópica a los diferentes tiempos mediante tinción de MPO.....	67
Figura 27. Inmunohistoquímica para CK15+ de los grupos de animales control y administrados con 15 ppm de Cd por vía oral y tópica a las 24h, 48h y 7 d. CK15 20X. D: dermis, E: epidermis, FH: fondo de la herida.	70
Figura 28. Inmunohistoquímica para CK15 del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía oral a los diferentes tiempos. CK15 10X. Las flechas indican abundante presencia de células positivas a CK15 en la zona de la herida. E: epidermis, D: dermis, FH: Fondo de la herida y C: coágulo de fibrina	72
Figura 29. Inmunohistoquímica para CK15 del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía tópica a los diferentes tiempos. CK15 10X. Las flechas indican abundante presencia de células positivas a CK15 en la zona de la herida. E: epidermis, D: dermis, FH: Fondo de la herida y C: coágulo de fibrina.	74

Figura 30. Zimogramas del tejido de la herida del A) grupo control y del B) grupo administrado con 15 ppm Cd vía oral a los diferentes tiempos.....	77
Figura 31. Zimogramas del tejido de la herida del A) grupo control y del B) grupo administrado con 15 ppm Cd vía tópica a los diferentes tiempos.	78
Figura 32. Densidad de las bandas correspondientes a la actividad enzimática de las formas A) Pro MMP-9, B) MMP-9 activa, C) Pro MMP-2 y D) MMP-2 activa en el grupo control y los administrados con Cd vía oral.	80
Figura 33. Densidad de las bandas correspondientes a la actividad enzimática de las formas A) Pro MMP-9, B) MMP-9 activa, C) Pro MMP-2 y D) MMP-2 activa en el grupo control y los administrados con Cd vía tópica.....	82
Figura 34. Mecanismos propuestos por los cuales la administración de Cd causa la formación de heridas con un comportamiento similar a las heridas crónicas durante el proceso de cicatrización.....	84

Lista de tablas

Tabla 1. Papel de las MMPs en la cicatrización.	26
Tabla 2. Concentraciones de los anticuerpos utilizados.	36
Tabla 3. Preparación de los geles de separación y de empaquetamiento.	37
Tabla 4. Puntuaciones de la presencia de colágeno en el sitio de la herida en el grupo control y los grupos administrados con Cd a los diferentes tiempos.	63
Tabla 5. Puntuaciones de la inmunohistoquímica para CK15 en el grupo control y los grupos administrados con Cd a los diferentes tiempos.	70
Tabla 6. Puntuaciones de la inmunohistoquímica para CK19 en el grupo control y los grupos administrados con Cd a los diferentes tiempos.	75

Capítulo I. Introducción, antecedentes, hipótesis y objetivos

Introducción

Anatomía y función de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y representa el 7% del peso corporal total. Entre sus funciones se encuentran la protección contra deshidratación, fricción y rayos UV, termorregulación, y barrera contra agentes patógenos (1).

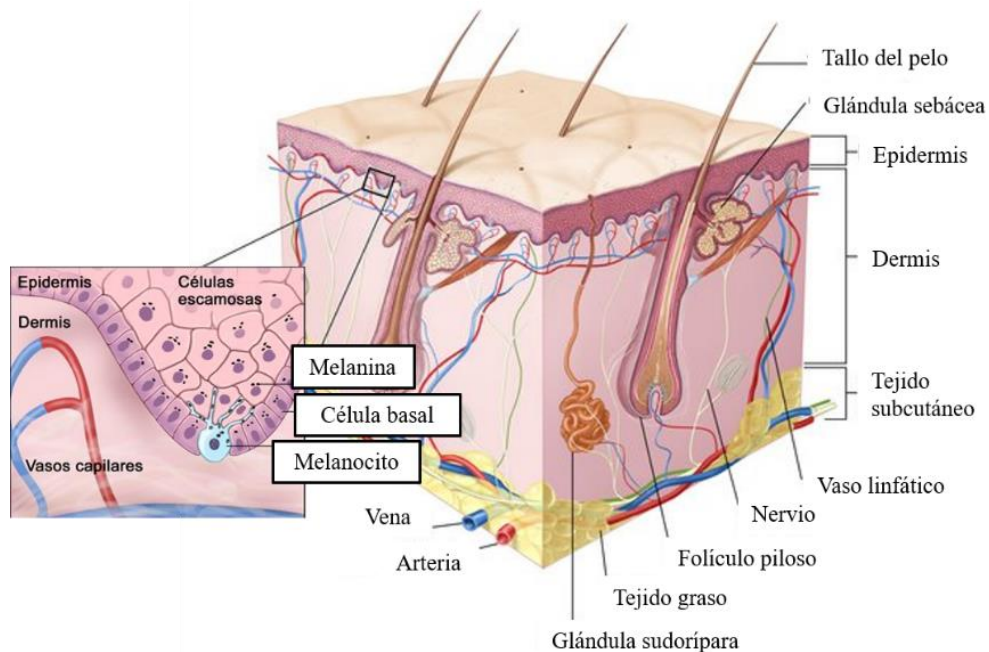


Figura 1. Anatomía de la piel, que muestra la epidermis, capa más externa de la piel y que, posteriormente la dermis que se encuentra mayormente irrigada y que contiene glándulas sudoríparas y los folículos pilosos, y finalmente el tejido subcutáneo (2).

Su estructura consiste en tres capas como se observa en la Figura 1 (2):

- Epidermis: Es la capa más externa de la piel y la más delgada, considerada avascular, se compone de epitelio estratificado plano queratinizado, donde abundan los queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Contiene 5 estratos, denominados como: basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo, Figura 2.
 1. Estrato basal: Contiene células cúbicas, basófilas que se apoyan sobre la membrana basal que separa la dermis de la epidermis. Estas células poseen una alta actividad mitótica, además de que contienen filamentos intermedios de queratina que se tornan

más numerosos a medida que la célula avanza hacia la superficie. Este estrato se encarga de la renovación constante de la epidermis.

2. Estrato espinoso: Contiene células aplanadas con un citoplasma con protuberancias cortas que contienen los haces de filamentos de queratina. Estas células presentan menor actividad mitótica.
3. Estrato granuloso: Contiene entre 3 y 5 hileras de células aplanadas con un citoplasma cargado de gránulos basófilos denominados gránulos de queratohialina. Estos gránulos se fusionan con la membrana plasmática y expulsan su contenido al espacio intercelular del estrato granuloso donde está el material lipídico para formar una barrera y evitar la deshidratación.
4. Estrato lúcido: Capa delgada de células aplanadas cuyos núcleos y orgánulos del citoplasma han desaparecido.
5. Estrato córneo: De espesor variable, contiene células aplanadas, muertas y sin núcleo, el citoplasma se encuentra repleto de queratina. En este estrato los queratinocitos se han transformado en escamas sin vida (3).

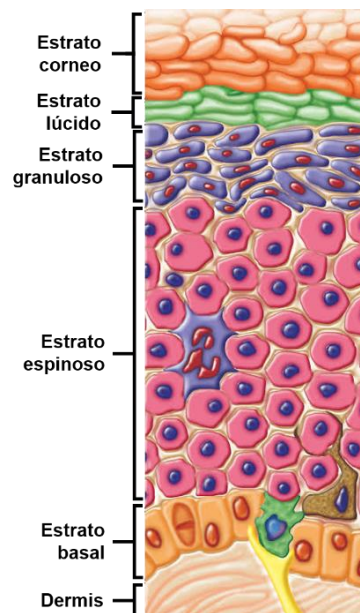


Figura 2. Estratos de la epidermis, en el fondo cerca de dermis se encuentra el estrato basal conformado por células con una actividad mitótica, posteriormente se encuentre el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido y finalmente el estrato córneo más externo que se compone de células muertas queratinizadas (4).

- Dermis: Es una capa profunda y gruesa de la piel, vascularizada, compuesta por tejido conectivo, fibroblastos, Matriz Extracelular (MEC), glándulas sebáceas y folículos pilosos, los cuales son capaces de autorrenovarse debido a la diferenciación de sus propias células totipotenciales (5), las cuales, no son esenciales para el cierre de la herida, pero aceleran significativamente la cicatrización durante las primeras etapas del proceso (6). La dermis se compone de dos capas, Figura 3 (7):
 1. Dermis papilar: Capa delgada, contiene tejido conjuntivo laxo que forma las papilas dérmicas.
 2. Dermis reticular: Capa más gruesa, con tejido conjuntivo denso, contiene los folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas (3).

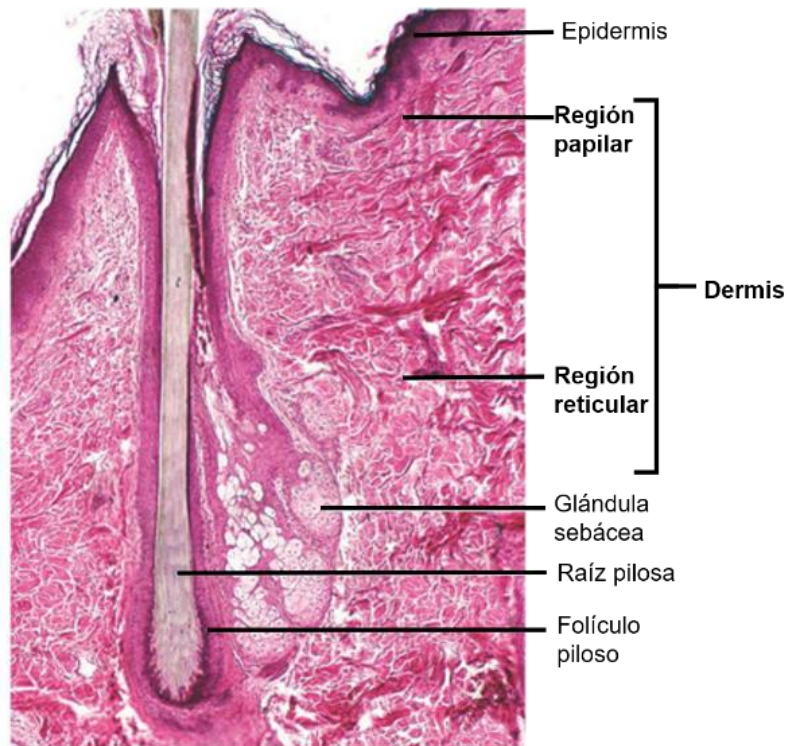


Figura 3. Corte de la piel que muestra la región papilar y reticular de la dermis, así como también un folículo piloso con su glándula sebácea (7).

- Hipodermis: También denominada tejido subcutáneo, se encuentra constituida por tejido adiposo, vasos sanguíneos y es donde se encuentran los corpúsculos de Pacini (1).

Proceso de cicatrización

Cuando la piel sufre una lesión mecánica es necesario restaurar su integridad para que ésta pueda continuar ejerciendo sus funciones, esto tiene lugar mediante el proceso denominado cicatrización. Este proceso es muy complejo, en donde participan una amplia variedad de citocinas, factores de crecimiento, proteínas, enzimas, iones metálicos, así como también células residentes de la piel y células de origen inflamatorio. La desregulación de alguno de los factores mencionados puede provocar que las heridas no cicatricen correctamente (8). Este proceso comprende 3 etapas superpuestas (Figura 4):

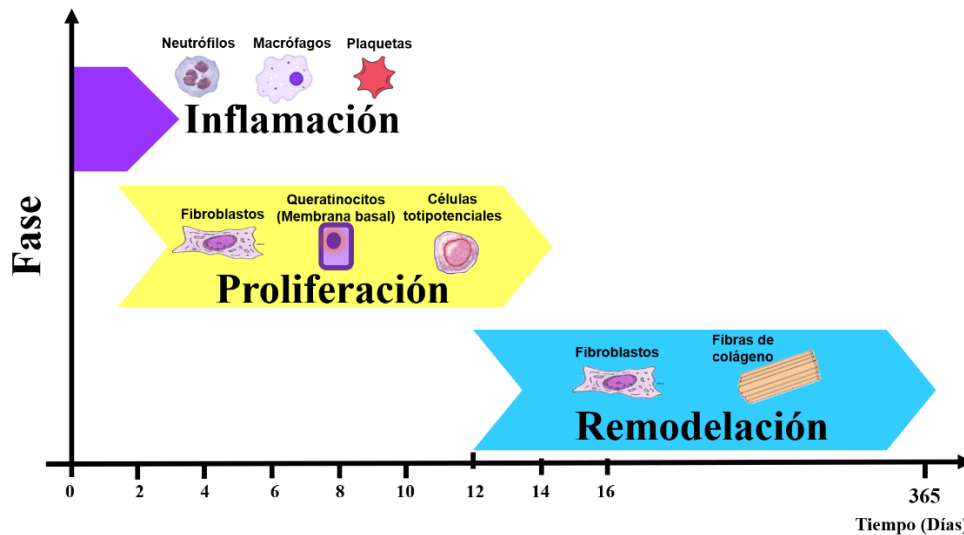


Figura 4. Fases del proceso de cicatrización con las principales células involucradas (9).

- **Inflamación:** Esta etapa dura aproximadamente 4 días, tiene como objetivo la formación de un coágulo de fibrina, el cual asegura la hemostasia, protege contra la invasión de microorganismos, y proporciona la base de la MEC para la migración de células en general (10). Una vez que se presenta una lesión, las plaquetas se activan al estar en contacto con el colágeno tipo I, liberando factores de crecimiento, adenosín monofosfato cíclico (cAMP), fibrinógeno, fibronectina, trombospondina y factor de von Willebrand provenientes de los gránulos α que dan lugar a la formación del coágulo. Los gránulos alfa también contienen al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial

vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de insulina 1(IGF-1) (11). Durante esta etapa los neutrófilos y monocitos son reclutados por PDGF y TGF- β para unirse a la fibrina mediante el receptor CD11b/CD18 de la integrina (12), mientras que las células endoteliales son activadas por VEGF, TGF- α y FGF para iniciar la angiogénesis. Posteriormente, los fibroblastos son activados por PDGF para migrar al sitio de la lesión e iniciar la secreción de colágeno y proteínas de la matriz extracelular (13). La inflamación tiene lugar durante las primeras 24 horas después de la lesión, los neutrófilos, monocitos y macrófagos eliminan los desechos de la herida y liberan citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)) y factores de crecimiento que reclutan y activan fibroblastos y células epiteliales (11). Además de las citocinas y factores de crecimiento también se encuentran involucradas las quimiocinas, las cuales tienen como función el regular el tráfico de poblaciones de neutrófilos, linfocitos, macrófagos, eosinófilos y basófilos durante la inflamación. Figura 5 (14).

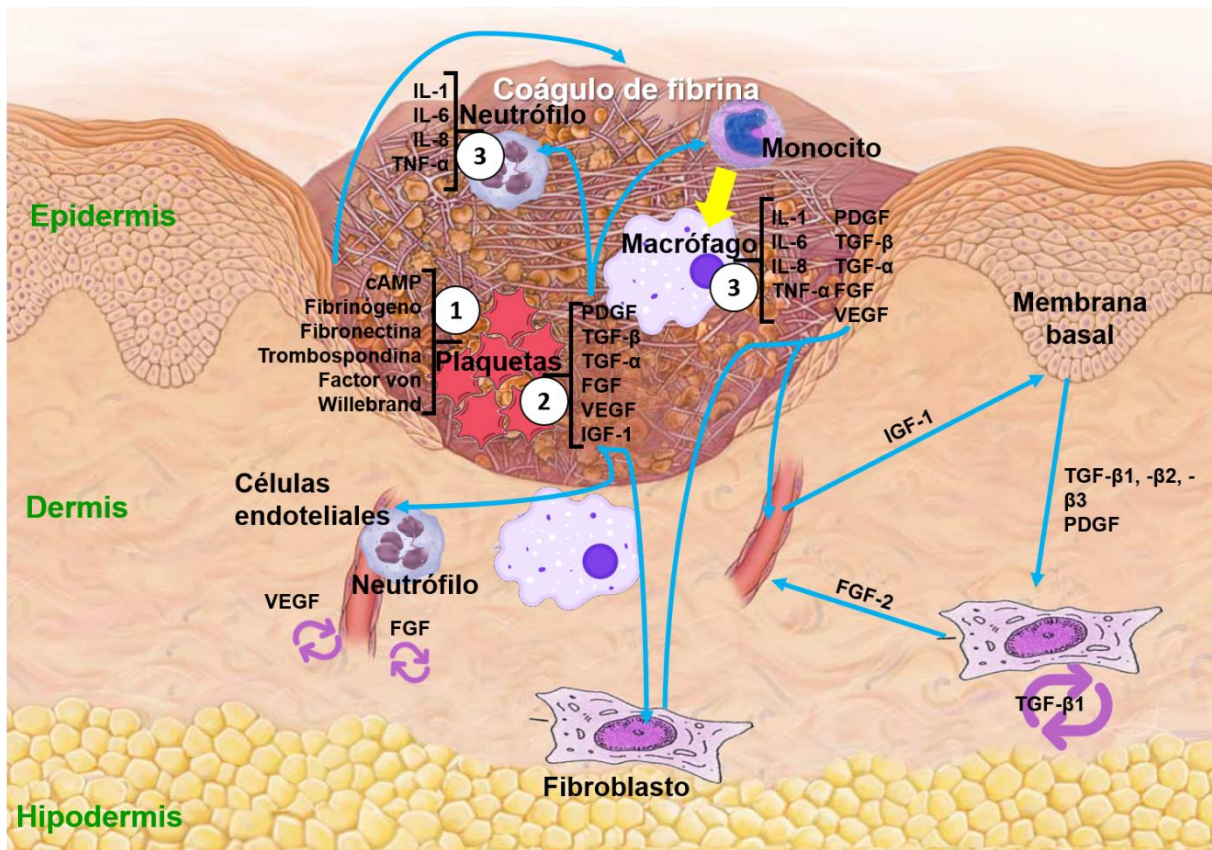


Figura 5. Fase de inflamación. 1) Las plaquetas son las primeras en llegar al sitio de la lesión para promover la coagulación, 2) posteriormente inician la secreción de factores de crecimiento que contribuyen principalmente al reclutamiento de neutrófilos y monocitos circulantes al sitio de la lesión, y a la proliferación de los fibroblastos y de las células totipotenciales. 3) Los macrófagos a su vez liberan que factores de crecimiento que promueven el inicio de la angiogénesis y proliferación de fibroblastos para poder dar paso a la etapa de proliferación y migración (14).

- Proliferación: En esta fase tienen lugar varios eventos, como el reemplazo de la matriz de fibrina con una matriz de fibras de colágeno, la angiogénesis, la proliferación y migración de fibroblastos para formar el tejido de granulación. Los fibroblastos migran hacia el sitio de la lesión en respuesta a los mediadores secretados por las plaquetas, neutrófilos y macrófagos. Su movilización comienza con la unión a componentes de la MEC, como fibronectina, vitronectina y fibrina, para lo cual, los fibroblastos secretan 3 tipos de enzimas proteolíticas denominadas matriz metaloproteinasas (MMPs), colagenasas (MMP-1), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y estromelinasas (MMP-3). El PDGF que es secretado por plaquetas y macrófagos estimula la proliferación y secreción de colagenasa, mientras que TGF-β secretado también por plaquetas y macrófagos disminuye la secreción general de MMPs y estimula la síntesis del inhibidor tisular de

metaloproteinasas (TIMP) en fibroblastos (9). La producción de la mayoría de los componentes del tejido de granulación está dada principalmente por fibroblastos, que han migrado hasta el sitio de la lesión, este evento tiene lugar del día 3 al día 5 aproximadamente, y es estimulado por PDGF, TGF- β , factor de crecimiento epidérmico (EGF), IGF-1 y FGF (6). Las fibras de colágeno resultantes son más pequeñas que las del tejido normal y tienen una apariencia aleatoria, además de que el tejido cicatricial siempre es más débil.

En la etapa de proliferación también tiene lugar la neovascularización, mediante la formación de capilares, células endoteliales vasculares y células totipotenciales endoteliales de sostén, cuya migración tiene lugar desde el día 2 y es estimulada por VEGF, FGF, angiopoyetina, TGF- β , MMP-2 y MMP-9 (15). La aparición del tejido de granulación se da después de 5 a 20 días después de la herida, este tejido funciona como una transición hasta una dermis normal y se caracteriza por la gran densidad de fibroblastos, macrófagos y fibras de colágeno, y alta actividad metabólica. La epitelización es el proceso en el que las células epiteliales del borde de la lesión comienzan a migrar hacia la herida, las células de la membrana basal comienzan a proliferar para dar lugar a nuevas células epiteliales. Este proceso es estimulado por EGF, el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y TGF- α , permitiendo la separación de los desmosomas y hemidesmosomas de las células epiteliales de los bordes. Posteriormente, estas células entran en una fase proliferativa para restablecer las capas de la epidermis.

La epidermis, las glándulas sebáceas y los folículos pilosos tienen la capacidad de autorrenovarse debido a la presencia de células totipotenciales (SC), sin embargo, solo las 2 primeras lo hacen de manera constante, mientras que el tercero lo realizan de forma cíclica (16). Para el caso de los ratones solo el 10 al 12% de las células de la membrana basal son SC (17), mientras que el bulbo de los folículos pilosos es considerado como reservorio principal de SC, e incluso se ha reportado que en los folículos pilosos de rata el 95% de SC se ubican en el bulbo y solo el 5% se encuentran en la MEC, mientras que para el caso del cuero cabelludo humano la mayoría se encuentran directamente debajo del bulbo (18). Cuando la herida abarca el grosor completo de la dermis, la cicatrización tiene lugar a partir de la movilización de SC provenientes de la epidermis de los bordes

de la herida. En cambio, cuando la herida no abarca completamente el grosor de la dermis la cicatrización se acelera con la migración de células provenientes de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas (19). Es necesario mencionar que las SC no son esenciales para la cicatrización, pero su presencia es capaz de acelerar el cierre durante las primeras horas después de la lesión (5). En particular, SC endoteliales participan activamente en la angiogénesis durante la cicatrización. Estas células llegan al sitio de la lesión en respuesta al factor derivado de células del estroma (SDF) inducido por el factor inducible de hipoxia (HIF) (20), Figura 6 (14, 21).

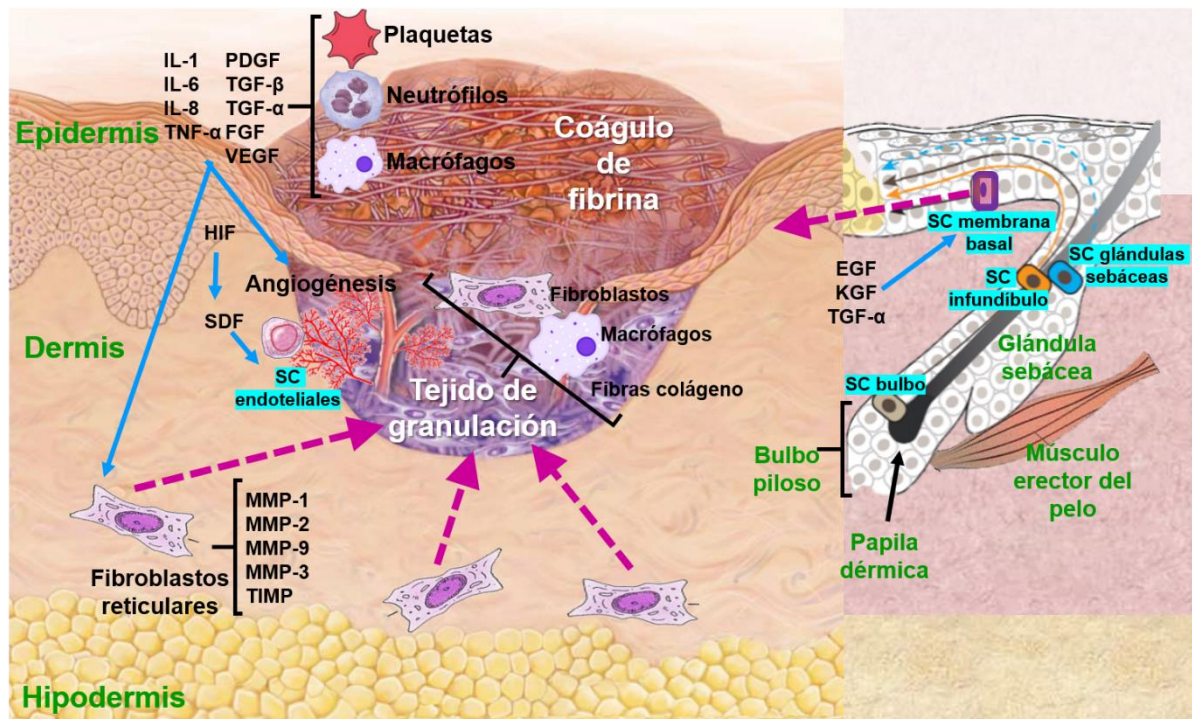


Figura 6. Fase de proliferación. Eventos: proliferación, donde los fibroblastos migran hacia el sitio de la lesión en respuesta a los factores liberados por plaquetas y neutrófilos, liberando MMPs y otros componentes de la MEC; neovascularización, que es estimulada por VEGF, FGF; formación del tejido de granulación como MEC temporal; epitelización por parte de las células totipotenciales de la membrana basal de los bordes de la herida (14, 21).

- Remodelación: Fase final de proceso, donde el tejido de granulación madura y se reestablece la MEC con una morfología similar a la piel normal. La dermis recupera su resistencia, así como también hay una disminución en la densidad de fibroblastos y capilares. Esta fase puede prolongarse hasta 1 año (22). Figura 7 (23).

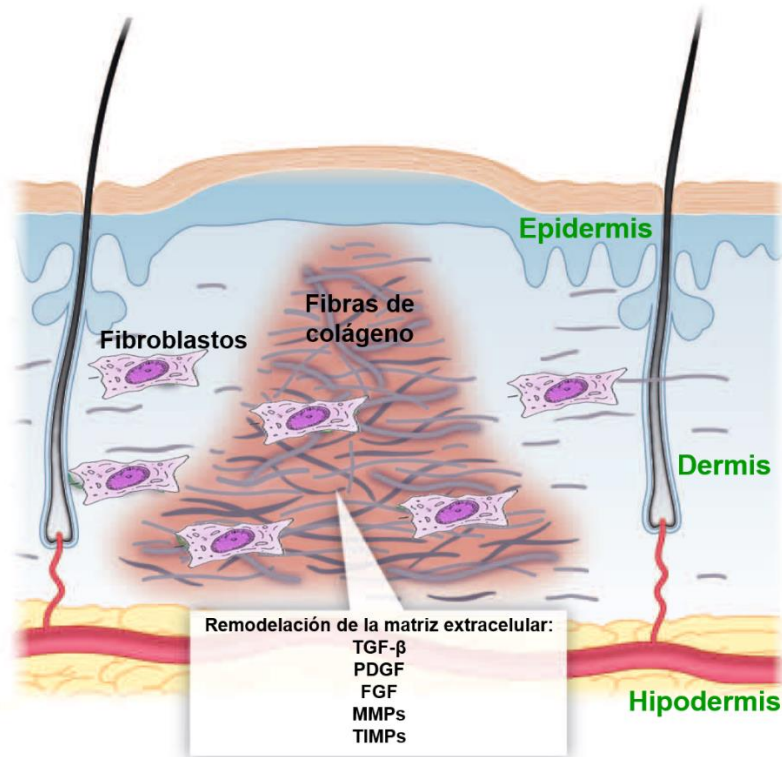


Figura 7. Fase de remodelación, donde hay una abundante presencia de fibroblastos y células totipotenciales en el sitio de la herida, principalmente la dermis, así como también hay una abundante presencia de fibras de colágeno, y en menor cantidad factores de crecimiento y MMPs (23).

Factores que afectan el proceso de cicatrización

El proceso de cicatrización es afectado por dos tipos de factores (24), los externos, como la oxigenación, infecciones, presencia de cuerpo extraños en la lesión, y los factores sistémicos, como la edad, género, estrés, enfermedades como diabetes, obesidad, medicamentos como los antiinflamatorios y glucocorticoides, malnutrición, alcoholismo y el tabaquismo. Estos factores pueden afectar eventos particulares en cada una de las etapas del proceso de cicatrización, como: la actividad de las células inflamatorias, disminución de citocinas (IL-1, IL-8 y TNF- α) y quimiocinas para el caso de la fase inflamatoria. Durante la fase de proliferación puede afectarse la señalización celular, así como también disminuir la migración de fibroblastos y SC debido a alteraciones en la actividad de las MMPs. Finalmente, durante la remodelación se puede afectar la producción de colágeno tipo 1 característico de la MEC normal, causando disminución de la resistencia a la tracción de la cicatriz final (25).

Como ha sido mostrado con anterioridad, el proceso de cicatrización es complejo no solo por la cantidad de moléculas y células involucradas, sino también porque las etapas de dicho proceso se encuentran superpuestas y son interdependientes. Sin embargo, cada vez existen más estudios que mencionan la importancia de los metales a lo largo de todo el proceso de cicatrización y su capacidad de promover el cierre de la herida mediante su suplementación oral (26). La dinámica entre los metales puede ser muy compleja debido a sus propiedades químicas como número de oxidación y tamaño, dando lugar a que exista competencia por los sitios de unión a una misma proteína por dos o más metales, resultando en un efecto sobre la funcionalidad de algunas proteínas y enzimas que participan activamente durante la cicatrización (27).

Dentro de los metales que participan activamente durante la cicatrización tenemos al zinc (Zn), calcio (Ca), cobre (Cu), hierro (Fe) y magnesio (Mg) (28). Incluso se ha reportado que sus concentraciones varían de acuerdo con la fase de cicatrización en la que se encuentra la herida, de ahí el hecho de que su concentración sea clave para una correcta cicatrización (29).

En particular, el Mg promueve la adhesión de las células epiteliales a la laminina (30), mientras que el Fe y el Cu inducen la expresión de MMP-1 en fibroblastos (31).

Para el caso del Ca, el metal divalente más abundante en los mamíferos participa en la contracción muscular, la actividad neurológica, y se ha observado que tiene un papel importante en la cicatrización al promover la proliferación, y promover la señalización para la diferenciación, migración y maduración, donde pequeñas variaciones de su concentración puede afectar el ciclo de las células epidérmicas (32).

El Zn es un cofactor importante para el funcionamiento de más del 10 % de las proteínas codificadas por el genoma humano, estas proteínas tienen papeles importantes dentro de las células y en diferentes procesos, como en el metabolismo óseo, en el sistema nervioso central, en la función inmunológica y en la cicatrización de heridas (33). En la piel, el contenido de Zn es considerable, concentrándose principalmente en la epidermis (34), y su deficiencia se ha asociado con una cicatrización retardada (35). Dentro del proceso de cicatrización el Zn se ha visto involucrado en la hemostasia, la inflamación, pero especialmente en la epitelización donde aumenta la migración de queratinocitos, y en la neovascularización promoviendo la migración de células endoteliales. Se ha observado que, durante la fase de inflamación, hay

un aumento del 15% al 20% en los niveles de Zn, llegando hasta un 30% más, durante el desarrollo del tejido de granulación y la proliferación de la epidermis, que se ve acompañado por un aumento en la expresión de metalotioneínas (MTs) en los queratinocitos y en los fibroblastos. En las siguientes fases la concentración de Zn disminuye debido a la baja de actividad metabólica celular y maduración de la cicatriz (36). El Zn es fundamental para el funcionamiento de algunas proteínas con papeles importantes durante la cicatrización, como las MTs y las MMPs, donde como se mencionó anteriormente, la actividad de estas últimas facilita los procesos de migración de los fibroblastos y de las SC de la membrana basal y de los folículos pilosos (33).

Matriz metaloproteinasas (MMPs)

Las MMPs son endopeptidasas dependientes de Zn responsables de la remodelación de la MEC mediante la degradación de sus componentes. Durante la cicatrización promueven la proliferación celular, la migración, la angiogénesis, la deposición de colágeno y la formación de tejido fibroso (37).

La mayoría de las MMPs tienen elementos estructurales en común, entre los que se encuentran un péptido señal, un dominio propéptido, un sitio activo dependiente de Ca que se coordina con 2 iones de Zn, uno catalítico y otro estructural, un dominio de unión (linker) y un dominio de hemopexina. En el sitio activo se encuentra una región S1 hidrofóbica encargada de otorgar la especificidad del sustrato (38). Las MMPs se clasifican de acuerdo con su función, estructura y especificidad en:

- 1) Colagenasas (MMP-1, MMP-8): Degradan el colágeno fibrilar de tipo I, II y III.
- 2) Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9): Degradan el colágeno desnaturalizado, además de que también pueden escindir diferentes quimiocinas o activar otras MMPs.
- 3) Estromelinas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11): Degradan proteoglicanos, fibronectina, laminina, caseína, colágeno y pueden activar otras MMPs.
- 4) Matrilisinas (MMP-7 y MMP-26): Modulan la adhesión celular, degradación de colágeno tipo IV y proteoglicanos
- 5) Matriz metaloproteinasas de tipo membrana (MP MMP-14, MP MMP-15)

La secreción y actividad de las MMPs se encuentran muy bien reguladas. Cuando la piel sufre una lesión, la MMPs son secretadas por una amplia variedad de células, como

queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales e inflamatorias como monocitos, neutrófilos y macrófagos como respuesta a las citocinas y factores de crecimiento presentes en la lesión. Una vez activadas las MMPs en el tejido lesionado, éstas cumplen diferentes funciones, Tabla 1 (38).

Tabla 1. Papel de las MMPs en la cicatrización (38).

<i>MMPs</i>	<i>Sustratos</i>	<i>Rol en la cicatrización</i>
<i>Colagenasas: MMP-1, MMP-8 y MMP-13</i>	Colágeno I, III, VII y X, gelatina, fibronectina, laminina	Promueven la migración de queratinocitos, reepitelización Aceleran la migración,
<i>Gelatinasas: MMP-2 y MMP-9</i>	Gelatina, colágeno I, III, IV, V, VII y X, elastina, fibronectina, fibrilina	expresadas por queratinocitos del borde la lesión, promueven migración y reepitelización
<i>Estromelisinias: MMP-3, MMP-10 y MMP-11</i>	Colágeno IV, V, IX y X, fibronectina, elastina, gelatina, laminina, E-cadherina	Expresadas por queratinocitos cercanos a la población proliferante
<i>Matrilisinias: MMP-7</i>	Colágeno IV, Gelatina, fibronectina, laminina, elastina, vitronectina, fibrilina	Reepitelización de la mucosa
<i>MMPs de membrana: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25</i>	Colágeno I, II y III, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, caseína, fibrinógeno.	Promueven el crecimiento de queratinocitos, reepitelización y migración.

Dentro de esta clasificación, las gelatinasas, Figura 8 (37), son las que participan activamente durante la cicatrización promoviendo y acelerando procesos de migración y reepitelización de las células en el borde de la lesión (38). Para el caso específico de la MMP-2, ésta es secretada principalmente por células residentes de la epidermis y dermis, así como por queratinocitos, células epiteliales y fibroblastos, y su función principal es la degradación de colágeno I (22). La MMP-9 es liberada principalmente por macrófagos activados (39) y se encuentra presente en los gránulos de los neutrófilos (40). La enzima también es producida por células T (41), se ha reportado que CXCL8 estimula la desgranulación de los neutrófilos y la liberación de MMP-9. Una vez que esta enzima es liberada realiza modificaciones en la CXCL8, dando como resultado un aumento en su actividad quimiotáctica sobre los neutrófilos, resultando en un feedback positivo que da lugar a que la MMP-9 se secrete como respuesta inflamatoria (42). Por otro lado, es necesario mencionar que MMP-9 degrada colágeno IV, principal componente de la membrana basal de la epidermis, razón por el cual se ha asociado a la expresión de esta enzima con la metástasis e invasión de los tumores como en el caso del carcinoma de células basales y espinosas (43).



Figura 8. Estructura de las gelatinasas (37).

Metalotioneínas (MTs)

Dentro de las proteínas más importantes en el metabolismo del Zn y que participan en la cicatrización se encuentran las MTs, proteínas intracelulares ricas en el aminoácido cisteína con una alta afinidad por metales de configuración electrónica $d10$, como el Zn, aunque también son capaces de interactuar con Cu, Cd y mercurio (Hg) (44). Las MT se clasifican en 4 familias, MT-1, MT-2, MT-3 y MT-4, de las cuales las dos primeras están involucradas con la homeóstasis del Zn, la protección contra metales pesados, estrés oxidativo, y se encuentran principalmente en las células metabólicamente activas de la epidermis (45), la MT-3 se encuentra principalmente en neuronas y la MT-4 se encuentra en células epiteliales (46). La expresión de las MT está regulada por el incremento de las concentraciones de Zn, Cu, Cd, plata (Ag), oro (Au) y platino (Pt).

Entre las funciones propuestas de las MT, se encuentran la eliminación de radicales libres, disminución de la producción de óxido nítrico, regulación de las concentraciones de Zn, depósito intracelular de Zn, protección contra metales pesados (47), mantenimiento de la homeóstasis de metales traza como el Zn y el Cu (44), la desintoxicación de metales no esenciales como Hg y Cd mediante su captación (48). Sin embargo, cuando el tiempo de exposición a metales tóxicos es prolongado, el mecanismo de defensa de las MTs es sobrepasado, causando un aumento en las concentraciones de metales tóxicos libres, esto ocurre especialmente con Cd. A diferencia del Zn, el Cd no tiene actividad fisiológica y es considerado un metal pesado que puede llegar a acumularse en el organismo por largos periodos de tiempo, 17 a 30 años. La importancia de la intoxicación por Cd se ha hecho más evidente debido a que actualmente los niveles ambientales de dicho metal han ido aumentando principalmente por productos industriales (49), como baterías, recubrimientos metálicos y pigmentos (50).

Toxicidad del cadmio (Cd)

El Cd es un metal pesado con un comportamiento químico similar al Zn, generalmente se encuentra como un catión divalente. La exposición de Cd en los individuos ocurre principalmente por inhalación, o ingestión de alimentos o agua contaminados, y puede producir a largo plazo efectos en la salud. El Cd se transporta por todo el organismo generalmente unido a los grupos sulfhidrilo de las MTs almacenándose finalmente en el hígado y en los riñones, el resto se distribuye por todo el cuerpo (51).

Toxicológicamente, el Cd tiene una amplia variedad de efectos, tal es el caso de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los tejidos (52), la unión a ligandos de cisteína, cambios epigenéticos en la expresión del ADN (53), efectos proinflamatorios en las células del sistema inmune (54), aumento en la movilización y disfunción de las células del sistema inmune innato, y sobreexpresión de citocinas proinflamatorias. Otros mecanismos incluyen la interferencia competitiva con la acción del Zn o Mg (55), así como la distorsión estructural de las proteínas debido a la unión del Cd con los grupos sulfhidrilo de la cisteína, histidina y ácido glutámico (56).

Recientemente, se ha observado que el Cd es capaz de sustituir al Zn de la estructura de las MTs formando estructuras de tipo Cd_5Zn_2MT (48). Previamente, hemos descrito que el Cd tiene la capacidad de inhibir no competitivamente a la enzima fosfatasa alcalina, ya sea por sustitución de Zn o por interacción con ligandos necesarios en su actividad enzimática, y que además puede también aumentar las concentraciones de MT (57). Un caso similar se ha observado con la proteína Bloom, una helicasa reparadora de DNA, donde se observó que el Cd es capaz de inactivarla por diferentes mecanismos incluyendo la sustitución del Zn (58). Otro ejemplo de sustitución es la proteína Ros87, sin embargo, no se observaron efectos negativos sobre su actividad catalítica (59). Se ha reportado que el Cd también puede sustituir al Zn en estructuras de dedos de Zn como ha sido reportado para la proteína SUP37 de *Arabidopsis thaliana* (60).

Esta capacidad del Cd para sustituir al Zn y otros metales divalentes en los sistemas enzimáticos puede deberse a la similitud de sus características químicas, así como el mismo estado de oxidación (+2), bajo punto de fusión, tamaño similar en su estado ionizado, dando lugar a que el Cd pueda unirse con una fuerza 10 veces mayor que el Zn, especialmente con ligandos con grupos tiol (61). Debido a que el cadmio es más tiofílico que el Zn, pero menos

estable cuando forma complejos con oxígeno (O) o con nitrógeno (N), las concentraciones de Cd necesarias para desplazar el Zn en estos sistemas enzimáticos son de solo una milésima parte (59). La capacidad del Cd para alterar la disponibilidad y el metabolismo de proteínas dependientes de Zn, como las MT, también podría tener efecto sobre otras enzimas Zn-dependientes involucradas en la migración de células inflamatorias y epiteliales durante las etapas de inflamación y de proliferación del proceso de cicatrización teniendo implicaciones en el proceso en general. Además, también podría verse afectado el metabolismo de otros iones bivalentes como Ca o Mg.

Antecedentes

Los estudios enfocados en los efectos del Cd en la piel o en el proceso de cicatrización en general han sido pocos, dentro de éstos se puede mencionar el realizado por Lansdown y col. en 2001 (62), donde se generaron lesiones en ratas para posteriormente administrar CdCl_2 a diferentes concentraciones por 10 días. Los resultados mostraron que las heridas expuestas a 1% de CdCl_2 no lograron epitelizarse en el mismo tiempo que los controles, produciendo un crecimiento epidérmico aberrante (Figura 9), así como también se observaron alteraciones en los niveles de Zn, Ca y Mg.

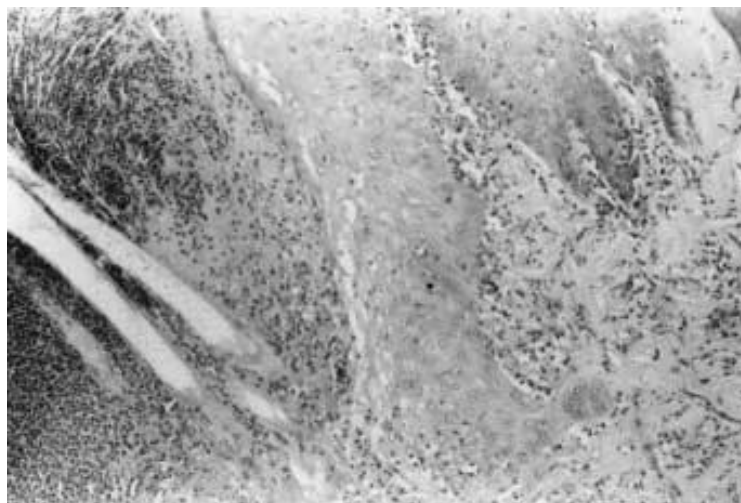


Figura 9. Sitio de la herida de una rata tratada durante 7 días con 1% de cloruro de cadmio (62).

En 2017, Capaldo y col. (63) trabajando con anfibios expuestos a Cd por 3 y 9 meses, observaron la acumulación de Cd en piel, hígado y riñón, así como también alteraciones histológicas en dichos tejidos (Figura 10).

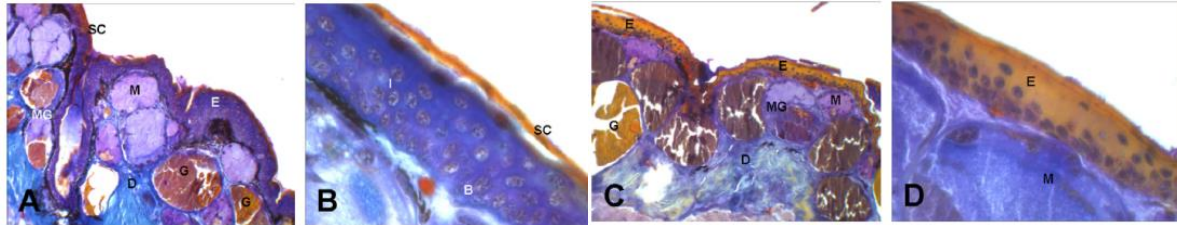


Figura 10. A y B: Morfología típica de la piel de los anfibios. C y D: Morfología de la piel después de la exposición a Cd en una concentración de 44.5 nM/L por 3 meses (63).

En un estudio más reciente realizado por Tucovic y col. en 2018 (64), los resultados obtenidos mostraron que la administración de 5 y 50 ppm de Cd vía oral a ratas ocasionaba la dilatación de los folículos sebáceos, así como también hiperqueratosis e hipergranulosis en la herida, (Figura 11).

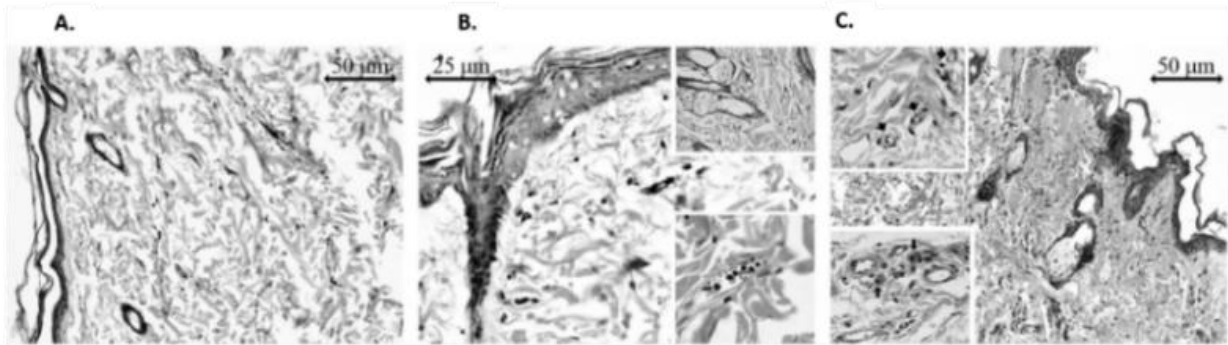


Figura 11. A: Morfología de la piel del grupo control. B: Grupo administrado con 5 ppm. C: Grupo administrado con 50 ppm (64).

Los estudios de Mei y col en 2017 (65) mostraron que la administración de CdCl₂ vía oral en ratones, disminuye la eficacia de la cicatrización en función de la concentración administrada de Cd y que además afecta la quimiotaxis de los neutrófilos en el sitio de la lesión, así como también la liberación de quimiocinas proinflamatorias y la liberación de Ca presente en la herida.

Actualmente, se ha observado que el Cd puede tener un efecto negativo en la actividad de las MMPs, como los demuestra el trabajo de Lacorte y col. en 2015 (66), donde la administración crónica por vía oral de Cd disminuye la actividad de las MMPs presentes en próstata y testículo de rata.

Como se ha mostrado en trabajos previos, el Cd tiene un efecto negativo sobre el proceso de cicatrización en general, produce alteraciones en la epitelización y por consiguiente da lugar a la formación de una cicatriz menos estable, sin embargo, el mecanismo por el cual el Cd afecta el proceso de cicatrización aún no ha sido completamente esclarecido.

Planteamiento del problema

Actualmente, la contaminación por Cd en el ambiente ha aumentado considerablemente debido a la presencia de desechos industriales, donde la acumulación en suelo representa los mayores riesgos debido a que puede entrar en contacto con depósitos subterráneos de agua, ríos, lagos o puede ser absorbido por las plantas y posteriormente ser distribuido por toda la cadena alimenticia, llegando a contaminar y bioacumularse en los organismos. La toxicidad de Cd causa un desequilibrio en la concentración y en el metabolismo de otros biometales como Zn, Ca o Mg, los cuales forman parte de sistemas proteicos, incluyendo enzimas, dando como resultado efectos negativos en diferentes procesos, tal es el caso de una adecuada cicatrización después de una lesión en la piel.

Justificación

Los efectos tóxicos del Cd han sido estudiados ampliamente en órganos como hígado, riñón, páncreas, pulmones, así como su efecto sobre el sistema endócrino. Sin embargo, aún no se conocen claramente los efectos tóxicos que puede tener este metal durante un proceso de cicatrización en piel, cuya importancia es reestablecer la principal barrera de protección contra el ambiente. Es importante mencionar que, si bien, existen estudios de los efectos tóxicos del Cd en piel, aún no se conocen en su totalidad los mecanismos involucrados en el desarrollo del proceso inflamatorio, ni cual es la causa de una alteración en la epitelización de las lesiones epidérmicas. El estudiar los efectos del Cd durante un evento crucial del proceso de cicatrización como la migración celular, así como la inhibición de MMPs servirá para comprender los mecanismos de toxicidad de este metal en el proceso general de regeneración de la piel.

Hipótesis

Hipótesis nula

El Cd no tiene efecto en la cicatrización y en los procesos implicados en la migración celular, la regeneración de la epidermis y la actividad de las MMPs.

Hipótesis alternativa

El Cd tiene efecto en la cicatrización y en los procesos implicados en la migración celular, la regeneración de la epidermis y la actividad de las MMPs.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar los efectos morfológicos y fisiológicos durante la administración oral y tópica de Cd a diferentes concentraciones en la migración y proliferación celular durante el proceso de cicatrización de heridas en ratas nude.

Objetivos específicos

- Establecer la cantidad de Cd acumulado en la piel después de su administración oral y tópica, y evaluar si hay cambios en la concentración de Zn, Ca, Mg y Cu.
- Evaluar el comportamiento celular del tejido epidérmico y dérmico en el proceso de cicatrización durante la administración oral y tópica de Cd, en comparación con un proceso de cicatrización normal.
- Determinar si la actividad de MMP-2 y MMP-9 es afectada por la administración oral y tópica de Cd.

Capítulo II. Parte experimental

Diagrama experimental

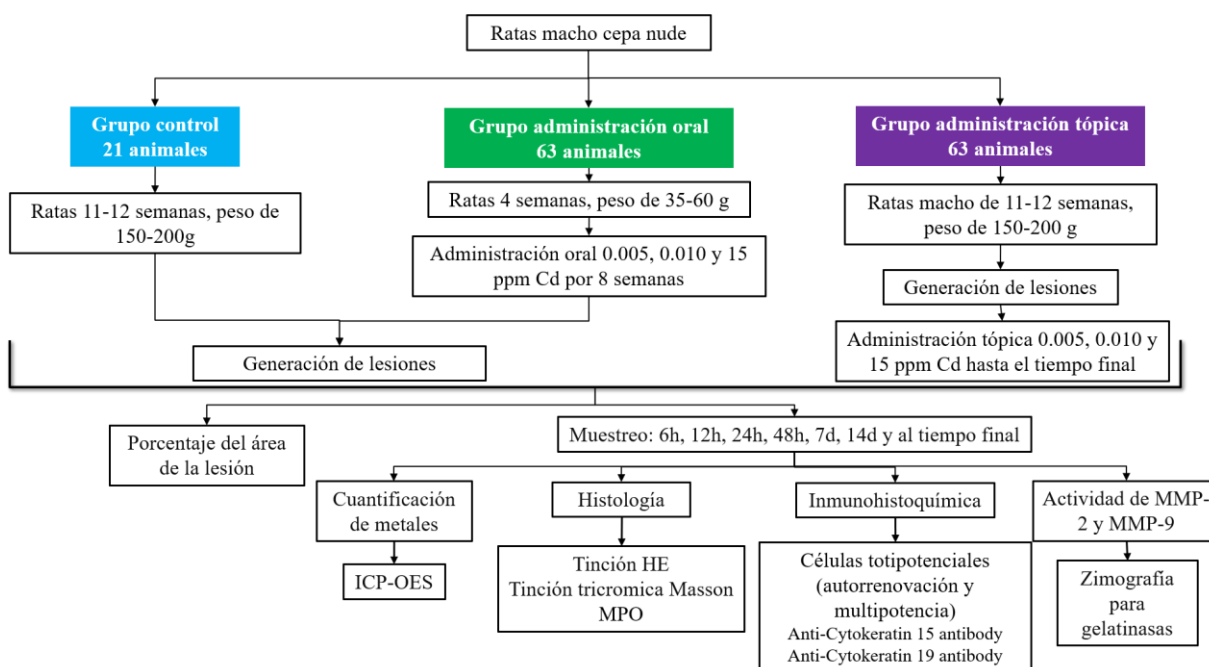


Figura 12. Diagrama experimental

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa nude, clínicamente sanas provenientes del bioterio Claude Bernard de la BUAP. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad 12/12, a una temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, un porcentaje de humedad de $50 \pm 10\%$, y fueron alimentados con una dieta específica para rata (LabDiet 5008) y agua purificada *ad libitum*.

En este estudio se utilizaron ratas de la cepa nude, las cuales presentan una mutación que disminuye la densidad del pelo de la piel, dando lugar a una piel con características similares a la del humano, funcionando adecuadamente como un buen modelo de cicatrización de heridas.

Los animales fueron divididos en 3 grupos:

Grupo control: 21 ratas de 11-12 semanas de edad, con un peso entre 150-200 g, las cuales se sometieron a un periodo de aclimatación de 1 semana. Después de este tiempo se les realizaron las lesiones correspondientes.

Grupo administración oral: 63 ratas de 4 semanas de edad con un peso entre 35-60 g, se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de 21 animales cada uno, las que fueron mantenidas

durante un periodo de aclimatación de 1 semana. Posterior a este tiempo, los animales fueron administrados con cloruro de cadmio a diferentes concentraciones vía oral durante un periodo de 8 semanas. Finalmente se procedió a la generación de las lesiones.

Grupo administración tópica: 63 ratas de 11 a 12 semanas de edad con un peso entre 150-200 g, se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de 21 animales cada uno, los que se sometieron a un periodo de aclimatación de 1 semana. Después de realizar las lesiones de piel correspondientes se inició con una administración de cloruro de cadmio a diferentes concentraciones por vía tópica, hasta el tiempo final de cicatrización.

Todos los animales fueron mantenidos en cajas individuales durante 3 a 5 días posteriores a la generación de las heridas, pasado ese tiempo se colocaron en cajas en grupos de 5 animales durante el resto del proceso de cicatrización. Las dosis utilizadas para ambos grupos administrados fueron de 0.005 ppm de acuerdo con la máxima concentración permitida de Cd en agua potable por la NOM-127-SSA1-1994 (67), 0.010 ppm correspondiente al doble permitido por la misma NOM y 15 ppm de acuerdo a la concentración máxima de Cd permitida en óxido de zinc, polvo de bronce, polvo de cobre, como materia prima en productos de perfumería y belleza por la NOM-118-SSA1-1994 (68).

Lesiones en piel

Para la generación de las lesiones, los animales fueron anestesiados con ketamina-xilazina 75/10 mg/Kg por vía intraperitoneal, y se empleó como analgésico clorhidrato de tramadol a una concentración de 1mg/Kg por vía subcutánea. Después de ser anestesiado, a cada animal se le practicaron 6 lesiones circulares de 8 mm de diámetro en la zona dorsal mediante tijeras de disección. Finalmente, los animales se sometieron a eutanasia en una cámara de CO₂. El muestreo se realizó a las 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 7 d, 14 d y al tiempo final después de la realización de las lesiones. Las muestras de tejido obtenidas de la lesión se almacenaron a -70° C hasta la realización de los análisis correspondientes.

Cuantificación de metales

Con el objetivo de determinar si el Cd administrado por diferentes vías se administró podía acumularse en piel, y tener un efecto sobre la concentración de otros metales, se determinó

la cantidad de Cd, Zn, Ca, Cu y Mg en el sitio de la herida. Los tejidos fueron digeridos basándonos en el método reportado por Zhao y col. en 2017 (69), para lo cual se tomaron 500 mg de tejido del sitio de la herida, posteriormente se realizó una predigestión del tejido con HNO₃ concentrado (68%) y H₂O₂ (30%) en una relación de volumen 10:1 por 3 horas a temperatura ambiente, y posteriormente se realizó la digestión del tejido a 37° C por 48 horas. Finalmente, se realizó una dilución del tejido digerido con agua desionizada para su posterior análisis mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente, ICP-OES (Varian 720-ES ICP Optical Emission Spectrometer).

Histología

Para evaluar los cambios en el comportamiento celular durante el proceso de cicatrización, se realizaron estudios histológicos a diferentes tiempos después de la generación de la lesión en el grupo control y los grupos administrados con Cd. Para este estudio los tejidos se fijaron en formalina al 4% con PBS 1X y se incluyeron en Parafina (Surgipath Paraplast Leica Biosystems 39601006), para posteriormente realizar cortes de 5 µm con un microtomo (Leica Biosystems). Para desparafinar los tejidos se colocaron en Xilol 1 al 100% (10 min), Xilol 2 al 100% (15 inmersiones), Xilol-Etanol (1:1) (15 inmersiones), Etanol 1 al 100% (15 inmersiones), Etanol 2 al 100% (15 inmersiones), Etanol 1 al 96% (15 inmersiones), Etanol 2 al 96% (15 inmersiones) y agua destilada (15 inmersiones). Finalmente se realizaron las tinciones de Hematoxilina Eosina, tricrómica de Masson (Hycel Reactivos Químicas, Cat. 64297) y Mieloperoxidasa (Sigma-Aldrich 391A-1KT, Peroxidase (Myeloperoxidase) Leukocyte Kit) (Anexo 1).

Posteriormente se deshidrataron los tejidos con Etanol 2 al 96% (15 inmersiones), Etanol 1 al 96% (15 inmersiones), Etanol 2 al 100% (15 inmersiones), Etanol 1 al 100% (15 inmersiones), Xilol-Etanol (1:1) (15 inmersiones), Xilol 2 al 100% (15 inmersiones) y Xilol 1 al 100% (5 minutos), finalmente se montaron las muestras con Entellan.

Inmunohistoquímica

Las muestras fueron fijadas, incluidas y cortadas como se describe para la realización de las tinciones histológicas. Una vez realizada la desparafinación de las muestras se procedió de la siguiente manera:

Recuperación antigénica

Las muestras se colocaron en Diva Decloacker 1X (Biocare Medical DV2004) por 30 minutos a 60° C, se dejaron enfriar por 15 minutos y finalmente se lavaron 3 veces con PBS 1X.

Inactivación de peroxidasa endógena

Se colocaron los tejidos en solución de peróxido de hidrógeno al 0.3% por 10 minutos, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X.

Bloqueo y anticuerpo primario

Se colocó solución de albúmina libre de IgG al 2% en PBS 1X sobre cada tejido por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron los tejidos 3 veces con PBS 1X.

Se agregaron 50 µL de la solución de albúmina al 1% con el anticuerpo primario (Tabla 2.) (70, 71) a cada tejido y se dejaron incubar por 2 noches a una temperatura de 4° C.

Tabla 2. Concentraciones de los anticuerpos utilizados.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Concentración</i>
<i>Anti-Cytokeratin 15 antibody (ab80522)</i>	7 µg/ml
<i>Anti-Cytokeratin 19 antibody (ab220193)</i>	7 µg/ml

Anticuerpo secundario

Se lavaron los tejidos 3 veces con PBS 1X, para después agregar 50 µl de la solución de albúmina al 1% con el anticuerpo secundario Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology 7076S) y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

Revelado

Se lavaron nuevamente los tejidos 3 veces con PBS 1X y se agregaron 50 µL del sustrato utilizado Betazoid DAB Chromogen Kit (Biocare Medical BDB2004L), por 3 minutos para el caso de Anti-Cytokeratin 15, y 5 minutos para Anti-Cytokeratin 19, posteriormente se volvieron a lavar con PBS-1X, se tiñeron con hematoxilina por 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente.

Finalmente se deshidrataron los tejidos y se montaron con Entellan de la misma forma como se realizó para las tinciones histológicas.

Actividad de MMP-2 y MMP-9

Con la finalidad de determinar si la administración de Cd tiene efecto sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9, se realizaron estudios de zimografía a partir del tejido con la lesión de la piel de los animales a diferentes tiempos.

Preparación de la muestra

Se pesaron 200 mg de tejido de la zona de la lesión, posteriormente se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido en un cuarto a 4° C y se añadió 1 mL de Buffer de lisis (Thermo Fisher, Cat. 00-4333-57).

Determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales se realizó mediante el método de Lowry y col. (1951). Para la preparación de la curva patrón se utilizó una solución de albúmina sérica de bovino como solución patrón con una concentración de 1 mg/mL (Anexo 2).

Zimografía

Las muestras se analizaron mediante Zimografía en un sistema Mini Protean II (Bio-Rad, 2000 Cat. 65-2941) por el método de Laemmli *et al.* (1970) en geles de acrilamida al 7.5% con gelatina (72, 73). Los reactivos y buffers utilizados se describen en el Anexo 3.

Procedimiento:

1. Montaje de aparato de electroforesis

Se montó el aparato de preparación del gel de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se determinó la altura a la que se vertería el gel de separación insertando un peine y marcando en la placa exterior 0.5 cm debajo de los dientes del peine.

2. Preparación del gel

Se preparó la solución para el gel de separación y de empaquetamiento de acuerdo con la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación de los geles de separación y de empaquetamiento (72).

Reactivos	Gel de separación (7.5% acrilamida)	Gel de empaquetamiento
1.5 M Tris pH 8.8	2 mL	-
0.5 M Tris pH 6.8	-	1.25 mL
30% acrilamida	2 mL	0.67 mL
Agua destilada	2 mL	3.08 mL
4 mg/ml gelatina	2 mL	-
10% SDS	80 µl	50 µl
10% APS	80 µl	50 µl

TEMED

| 10 μ l

10 μ l

Posteriormente, se ensambló el aparato de electroforesis de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se retiró el peine y se agregó el buffer de corrimiento 5X electrode hasta cubrir ambos geles.

3. Electroforesis

Se realizó la carga de 100 μ g de proteína total con buffer de muestra en cada pocillo y se incluyó el marcador de peso molecular. Posteriormente, se realizó el corrimiento del gel a 150 V por 50 minutos.

4. Revelado y tinción de los geles

Se lavaron los geles 2 veces por 30 minutos cada uno con buffer de lavado a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente, se lavaron por 5 a 10 minutos con buffer de incubación a temperatura ambiente. Se cambió el buffer de incubación y se incubaron a 37° C por 24 horas en un recipiente cerrado.

Posteriormente, se tiñó el gel con solución de tinción por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante, finalmente se colocaron los geles en solución de destinción hasta la aparición de bandas claras.

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como la media \pm SEM (Error estándar de la media). El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Prism Software, Inc.). Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante el análisis de varianza bidireccional (ANOVA) y las pruebas de comparaciones múltiples de Dunnett o Sidak. Los valores de *P* menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Capítulo III. Resultados y discusión

Cuantificación de metales

Cadmio

La absorción del Cd tiene lugar en pulmones (25-60%), tracto gastrointestinal (5-10%), y piel (<1%) en los humanos. Una vez que el Cd es absorbido en el tracto gastrointestinal, circula en la sangre unido a los grupos aniónicos como los grupos sulfhidrilos de las proteínas, especialmente de albúmina y MTs. El Cd unido a las MTs es filtrado por el riñón y reabsorbido en los túbulos proximales, se distribuye por el resto de los tejidos, y se almacena principalmente en riñón e hígado (74).

Los resultados de la cuantificación de Cd por medio de ICP-OES obtenidos en este estudio no mostraron una acumulación de este metal en el sitio de la lesión para los grupos de animales administrados por vía oral, así como en el sitio de la lesión de los animales expuestos a 0.005 y 0.010 ppm de Cd por vía tópica. Por otro lado, el grupo de animales expuesto a 15 ppm de Cd por vía tópica se encontró una acumulación progresiva de este metal en el sitio de la lesión a las 6 horas, alcanzando un máximo de 1.49 $\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo a los 7 días (Figura 13), sin embargo, este metal prácticamente no se encuentra presente a los 14 y 26 días.

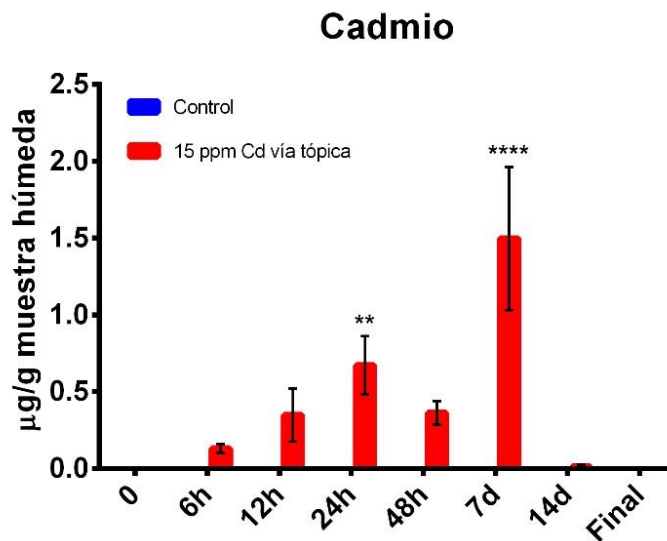


Figura 13. Cuantificación de Cadmio en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y en el grupo de 15 ppm Cd vía tópica

Los resultados obtenidos sugieren que la cantidad y vía de exposición de Cd en los organismos es importante para su acumulación en diferentes tejidos. De acuerdo con los

resultados, la exposición de una lesión con bajas cantidades de Cd por vía tópica no se ve reflejada en una acumulación en el sitio de la lesión, sin embargo, al incrementar la concentración (p. e. con 15 ppm de Cd), el metal presenta acumulación, al menos en las primeras etapas del proceso de cicatrización, en donde la herida se encuentra más expuesta a sustancias externas, no así en las etapas posteriores de la cicatrización, en donde la herida ya no tiene contacto con el medio externo.

Bajo condiciones basales donde no hay una lesión en piel se ha observado que la deposición de Cd es dependiente de la dosis administrada por vía oral (64), por lo que, cuando tiene lugar una herida durante la fase de inflamación la llegada de plaquetas, neutrófilos, y monocitos provenientes del torrente sanguíneo podría promover la llegada de Cd al sitio de la lesión. En el caso particular de los grupos de animales de nuestro estudio que recibieron una administración oral con diferentes cantidades de Cd, los cuales no mostraron una acumulación en el sitio de la lesión en los animales, nos hace suponer que el Cd se ha distribuido a otros tejidos como hígado, riñón, médula ósea, etc., como ha sido reportado por otros autores (62), antes de poder llegar al sitio de la lesión como se ha observado bajo condiciones basales.

Zinc

Los resultados de la cuantificación de Zn en los grupos administrados con Cd mostraron un aumento significativo a las 12 horas en el grupo de animales administrado con 15 ppm Cd por vía oral (Figura 14A), así como aumentos significativos en los grupos de animales expuestos a 0.005, 0.010 y 15 ppm de Cd por vía tópica (Figura 14B). Para el caso específico de este último grupo, la presencia de Cd tuvo efecto sobre las concentraciones de Zn en el sitio de la lesión a las 12 horas, la cual corresponde a la etapa inflamatoria.

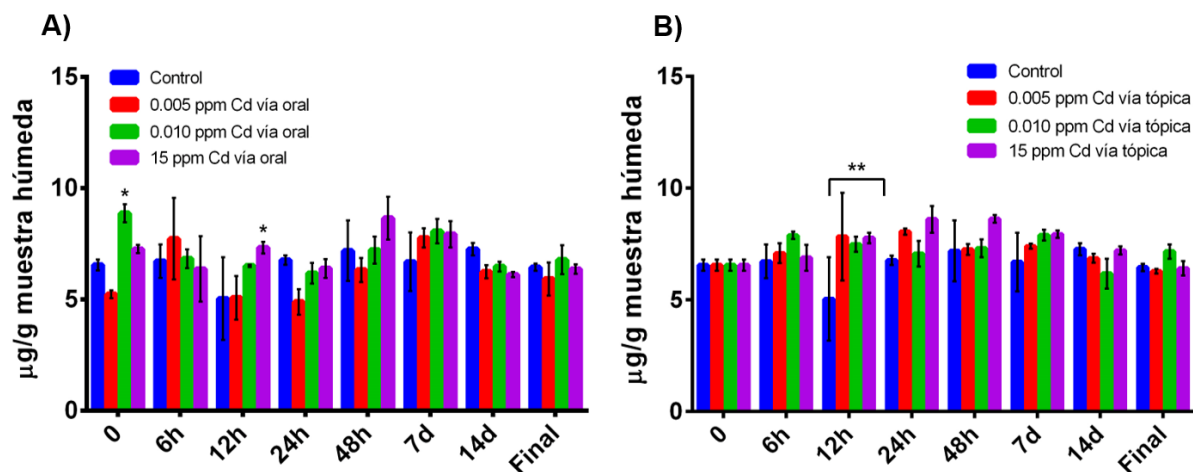


Figura 14. Cuantificación de Zinc en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y los grupos administrados con Cd. A) Vía oral y B) Vía tópica.

La piel es el tercer órgano con mayor cantidad del Zn en el cuerpo después de los músculos y los huesos (75), el tejido epidérmico contiene alrededor del 5% del contenido de Zn corporal (34), por lo que una deficiencia de este metal puede tener efectos adversos en la cicatrización de heridas (35). Durante un proceso inflamatorio se genera estrés oxidativo debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales dan lugar a la oxidación de LDL que activa la señalización de NF- κ B, promoviendo la liberación de citocinas y quimiocinas, las cuales son responsables del reclutamiento de neutrófilos, monocitos y macrófagos (76). El Zn participa activamente durante las 2 primeras fases de la cicatrización, su papel en la inflamación es bastante complejo y se ha relacionado con los mecanismos de protección contra agentes patógenos, aunque también se ha relacionado de manera importante con la producción de citocinas.

La activación de la vía NF- κ B funciona como un regulador transcripcional involucrado en la respuesta inflamatoria, la remodelación, la proliferación, la apoptosis y la adhesión celular (77). La señalización NF- κ B generalmente es activada por citocinas proinflamatorias (IL-1 e IL-6), motivos específicos provenientes de patógenos como virus y bacterias (mediada por lipopolisacárido (LPS)/TLR4) (78), parásitos o ROS (79). La concentración de Zn intracelular puede contribuir a la regulación de la vía NF- κ B, e incluso se ha reportado que, durante la etapa inflamatoria, NF- κ B promueve la expresión de ZIP8, facilitando la entrada de Zn e inhibiendo IKK β y dando como resultado la inhibición del proceso inflamatorio (80).

Los resultados obtenidos son importantes debido a que el Zn participa en la regulación de la respuesta inflamatoria vía NF- κ B, lo cual significaría que los incrementos de Zn a las 12 horas en la fase de inflamación, éste también puede ejercer un efecto sobre el metabolismo intracelular y por lo tanto tener un efecto inhibitor de la inflamación provocada por las citocinas proinflamatorias, patógenos y ROS.

Cobre

Estudios previos han descrito que el Cu ejerce efectos positivos en la cicatrización de heridas, sin embargo, su participación en la homeostasis de la piel no se limita a un único papel.

El aumento de la concentración de Cu durante la cicatrización tiene lugar desde el inicio hasta el día 2 aproximadamente de la cicatrización, donde inicia la formación del tejido de granulación (28). En este estudio, los niveles de Cu en el grupo control mostraron un máximo a las 24 horas, para posteriormente disminuir hasta los niveles basales. Por otra parte, los animales administrados con Cd tanto por vía oral, así como los expuestos por la vía tópica, mostraron una disminución de los niveles de Cu a las 24 horas en comparación con el grupo de animales control, aunque los animales expuestos por vía tópica mostraron un aumento de Cu a las 12 horas (Figuras 15A y 15B).

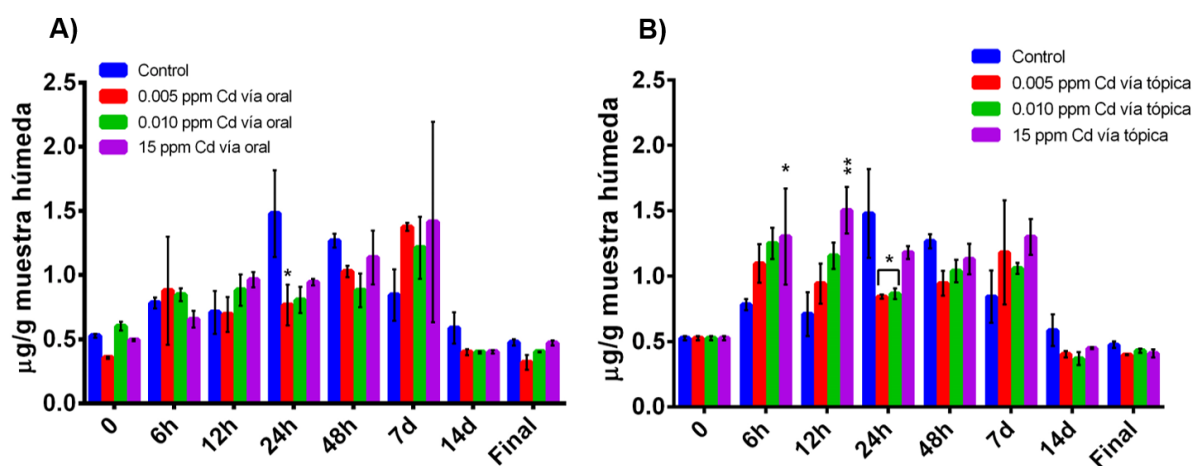


Figura 15. Cuantificación de Cobre en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y los grupos administrados con Cd. A) Vía oral y B) Vía tópica.

La concentración intracelular de Cu se encuentra regulada por un transportador de Cu y chaperonas. Atox1 es una chaperona citosólica que une al Cu proveniente del importador de Cu

denominado Transportador de Cobre 1 (CTR1). CTR1 transporta el Cu a la ATPasa transportadora/exportadora de Cu (ATP7A) para mantener la homeostasis intracelular de Cu (81). Atox1 también se encarga de suministrar Cu a través de la ATP7A a otras enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) (82) y la lisil oxidasa (LOX), ésta última adquiere relevancia durante la cicatrización debido a que regula la reticulación del colágeno durante la proliferación y remodelación de la MEC (83).

Trabajos previos han reportado que el Cu puede promover la angiogénesis durante la cicatrización al aumentar la expresión de VEGF, a través de la activación de HIF-1 α . El mecanismo por el cual tiene lugar esta expresión se debe a que Atox1 funciona como un factor de transcripción dependiente de Cu, y el promotor de HIF-1 α posee una región sensible a Atox1 (GAAAGA), lo que aumenta la posibilidad de que la ruta Cu-Atox1-HIF-1 α pueda regular el aumento de la expresión de VEGF, y la angiogénesis en la herida (84).

Los resultados obtenidos indican que independientemente de la vía de administración de Cd, ya sea oral o tópica, pueden verse afectados los niveles de Cu en la piel lesionada. Por otra parte, una disminución de Cu durante la cicatrización de piel (24 horas), y tomando en cuenta su papel en el proceso de cicatrización, podemos suponer que la disminución de Cu puede tener efecto en la expresión de VEGF y, por lo tanto, alterar la angiogénesis durante el inicio de la etapa de proliferación (84).

Finalmente, el comportamiento del Cu en los grupos de animales con exposición a Cd puede estar relacionado con Zn, ya que se sabe que la cinética del Zn y del Cu son interdependientes debido a que pueden unirse a las mismas proteínas, donde la presencia de Cu con mayor afinidad puede disminuir la disponibilidad del Zn, por lo que podemos suponer que la disminución de Cu también puede causar aumento proporcional en la concentración de Zn contribuyendo a una mayor disponibilidad del Zn para el metabolismo celular (28). Con esto se podría sugerir que, debido a la interdependencia de Zn y Cu, los cambios en las concentraciones de Zn también podrían ser causadas indirectamente por Cd, quien podría afectar el metabolismo del Cu y éste tener efecto en las concentraciones de Zn (62).

Calcio

Los resultados obtenidos de la cuantificación de Ca en el grupo control mostraron un aumento progresivo de su nivel, teniendo un máximo a las 24 horas (Figura 16), para posteriormente disminuir hasta alcanzar nuevamente los niveles basales. El punto máximo en donde el Ca alcanza su máximo nivel coincide con el inicio de la fase de proliferación, y es en este punto donde el Ca puede estar ejerciendo su función de activación de la proliferación de las células totipotenciales y los fibroblastos para el proceso de cicatrización “normal”.

En el caso de los grupos de animales administrados con Cd por vía oral, los resultados obtenidos mostraron un comportamiento similar a los animales del grupo control, sin embargo, el máximo nivel de Ca fue alcanzado hasta las 48 horas y 7 días (Figura 16A), mientras que los animales administrados por vía tópica, los puntos máximos se observaron a los 7 días, siendo más significativos en el grupo administrado con 15 ppm de Cd (Figura 16B).

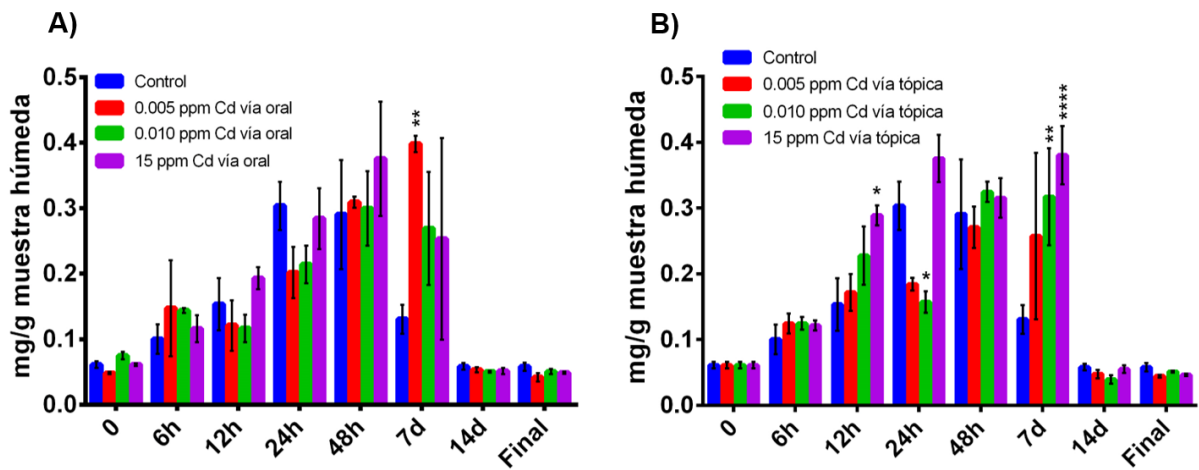


Figura 16. Cuantificación de Calcio en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y los grupos administrados con Cd. A) Vía oral y B) Vía tópica.

En el proceso de cicatrización el Ca se encuentra involucrado (Factor IV) durante la hemostasia, sin embargo, también está involucrado en la fase de proliferación celular de los queratinocitos del borde de la herida (32). También se ha reportado que el Ca tiene la capacidad de aumentar el metabolismo celular, la actividad de las MMPs, la síntesis de colágeno y la expresión de citocinas (85).

Dentro de los mecanismos en donde Ca interviene en el proceso de cicatrización de heridas, probablemente se encuentre relacionado con el receptor de vitamina D (VDR) en queratinocitos, ya que se ha observado que después de una dieta baja en Ca, tiene lugar la pérdida de VDR acompañada de un retraso en la cicatrización, al parecer por una falla en la activación de la señalización de β -catenina en las células totipotenciales de la epidermis, afectando su proliferación y migración (86). Como sabemos, la β -catenina es el componente principal de la vía Wnt/ β -catenina, encargada de la regulación de procesos como la regeneración de tejidos, la diferenciación de células totipotenciales y la proliferación celular. Estos resultados muestran que el papel del Ca dentro de la cicatrización de la piel no solo está relacionado con la formación del coágulo de fibrina, sino que también juega un papel importante en conjunto con VDR para promover procesos de proliferación y migración de las células totipotenciales de la epidermis y de los folículos pilosos.

Los resultados obtenidos muestran que el máximo nivel de Ca en el proceso de cicatrización presenta un retraso (presencia de punto máximo a las 48 horas y 7 días) en comparación al grupo control (punto máximo a las 24 horas) o para una cicatrización considerada “normal”. Este hallazgo es importante debido a que la administración de Cd por vía oral, o su exposición a nivel tópico puede interferir y alterar de alguna manera el metabolismo de Ca durante la cicatrización, lo que supondría una alteración en los procesos de proliferación, migración y maduración de las células totipotenciales y de los fibroblastos, que podrían contribuir a un retraso en la cicatrización.

Magnesio

En este trabajo, los resultados de la cuantificación de Mg obtenidos en el grupo control mostraron un máximo a las 24 horas, punto donde da inicio la etapa de proliferación que es caracterizada por el desarrollo de angiogénesis en la cicatrización. La cuantificación de Mg en los grupos de animales administrados con Cd por vía oral no mostró diferencias significativas en comparación con los animales control (Figura 17A). Sin embargo, en los animales administrados vía tópica se observó un incremento significativo en el nivel de Mg con un máximo a las 12 horas, especialmente para el grupo con 15 ppm Cd (Figura 17B). En el caso de este último grupo, las diferencias ponen en evidencia que el Cd presente en la herida altera el

metabolismo de Mg, lo cual es importante dada la función del metal en la promoción de la angiogénesis.

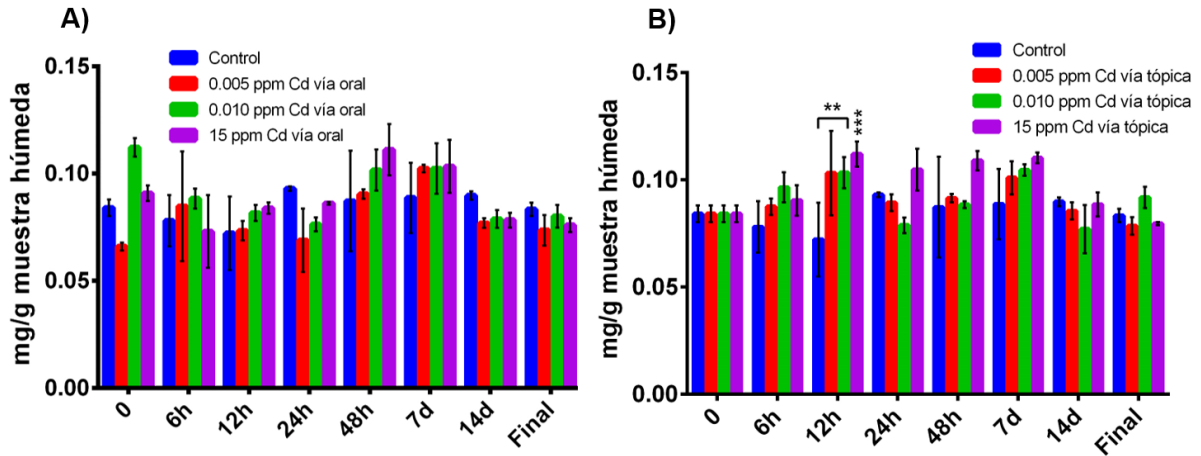


Figura 17. Cuantificación de Magnesio en el tejido de la lesión a diferentes tiempos en el grupo control y los grupos administrados con Cd. A) Vía oral y B) Vía tópica.

El biometal Mg se ha relacionado con la migración de macrófagos, queratinocitos y fibroblastos, esto debido a que durante la reparación de una herida el Mg regula la adhesión mediada por integrina $\beta 1$ entre fibroblastos y queratinocitos con proteínas de la MEC (87). También, este bioelemento se encuentra involucrado con la producción de colágeno tipo I, dando como resultado una mejora en la cicatrización (88). Por otro lado, también se ha reportado que la proliferación de las células endoteliales depende de la concentración de Mg, mostrando que este metal tiene un papel importante durante el inicio de la etapa de proliferación. Se ha sugerido que la deficiencia de Mg podría influir negativamente en la cicatrización, provocando una angiogénesis tardía o inadecuada (89).

La cuantificación de metales durante el proceso de cicatrización en los animales administrados con Cd tanto por vía oral como los expuestos por vía tópica dan un panorama general de la participación de estos en la reparación de heridas. No obstante que solo se detectó presencia de Cd en el grupo de 15 ppm de Cd por vía tópica, las alteraciones observadas en cuanto a las concentraciones de Zn, Cu, Ca y Mg ocurrieron en tiempos específicos del proceso de cicatrización. Las modificaciones en la concentración de Zn y Cu a las 24 horas, tiempo que coinciden con la fase de inflamación, pueden alterar los procesos de liberación de citocinas y

afectar la angiogénesis respectivamente, además de que ambos metales pueden interactuar con las mismas biomoléculas. Otro de los metales que presentó modificaciones a las 12 horas (etapa de inflamación) fue el Mg, pudiendo causar una desregulación en la angiogénesis y el correcto desarrollo de la etapa de proliferación. Para el caso del Ca, éste fue el único metal que se vio alterado en tiempos posteriores a la inflamación (48 horas y 7 días), su retraso en su incremento comparado con el grupo control puede tener efectos en la proliferación y maduración de las células totipotenciales y fibroblastos. Tomando en cuenta las alteraciones en la cantidad de Zn, Cu, y Mg durante la etapa de inflamación, y de Ca durante la proliferación es posible inferir que, durante una cicatrización, la administración o exposición de Cd afecta el metabolismo de los metales, pudiendo producir alteraciones en la etapa de proliferación y migración, así como en el proceso de cicatrización general. Sin embargo, aún se requiere estudiar los mecanismos involucrados que llevan a los cambios descritos en este trabajo.

Exposición a Cd y comportamiento de la cicatrización de las heridas

Los resultados del análisis macroscópico de las heridas del grupo control son presentados en la Figura 18. Estas fotografías muestran el proceso de cicatrización desde el inicio de la lesión hasta el día 21, tiempo en donde se observa la formación de una cicatriz madura y poco visible. Es importante mencionar que durante esta cicatrización los animales en estudio presentaron la pérdida de la costra entre los días 6 y 8.

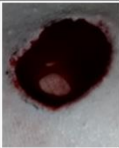
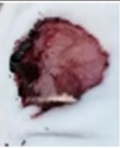










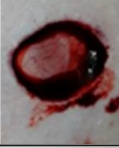



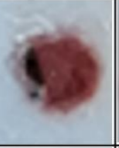







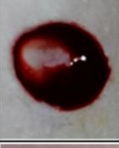
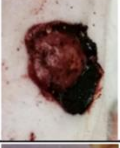
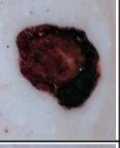
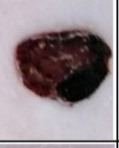








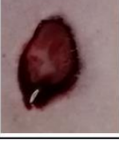

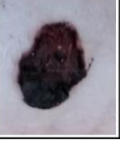

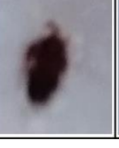







	Tiempo cero	Día 1	Día 2	Día 6	Día 8	Día 11	Día 13	Día 15	Día 21	Día 23	Día 25	Día 28
Grupo control												
0.005 ppm Cd vía oral												
0.010 ppm Cd vía oral												
15 ppm Cd vía oral												

Figura 18. Vista macroscópica de las heridas del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía oral a diferentes tiempos.

En los grupos de animales administrados con Cd por vía oral (Figura 18), la cicatrización mostró un retraso en comparación con los animales del grupo control. También se observó que la pérdida de la costra tuvo lugar a los días 8, 11 y 11 en los animales administrados con 0.005, 0.010 y 15 ppm por vía oral respectivamente. Otra diferencia significativa fue el tiempo en el cual se observó la formación de la cicatriz con un grado de madurez en cuanto a la coloración, apariencia y tamaño respecto al grupo de animales sin administración de Cd. El cierre final de la cicatriz en los grupos de animales administrados con 0.005, 0.010 y 15 ppm de Cd por vía oral se presentó a los días 23, 25 y 28 respectivamente. Estos resultados ponen en evidencia un retraso en el tiempo de cicatrización, que fue dependiente de la cantidad de Cd administrada. Tomando como base el mayor tiempo necesario para la desaparición de la costra en los animales administrados con Cd, estos resultados también sugieren un retraso en la formación del tejido de granulación maduro que tiene como función principal servir de barrera de protección.

Para el caso de los grupos de animales expuestos a Cd por vía tópica (Figura 19) se presentó un comportamiento similar a los animales administrados con Cd por vía oral, en donde la pérdida de la costra tuvo lugar después de los 8 días en los 3 grupos de animales, mientras que el tiempo de formación de la cicatriz final fue a los 24, 25 y 28 días para los grupos expuestos a 0.005, 0.010 y 15 ppm de Cd, respectivamente. Estos resultados también muestran un retraso en el proceso de cicatrización que es dependiente de la concentración de Cd, siendo este tiempo mayor para el grupo expuesto a 15 ppm de Cd. De esta forma podemos inferir que el retraso en el proceso de cicatrización depende de la concentración de Cd, así como también de la vía de administración.

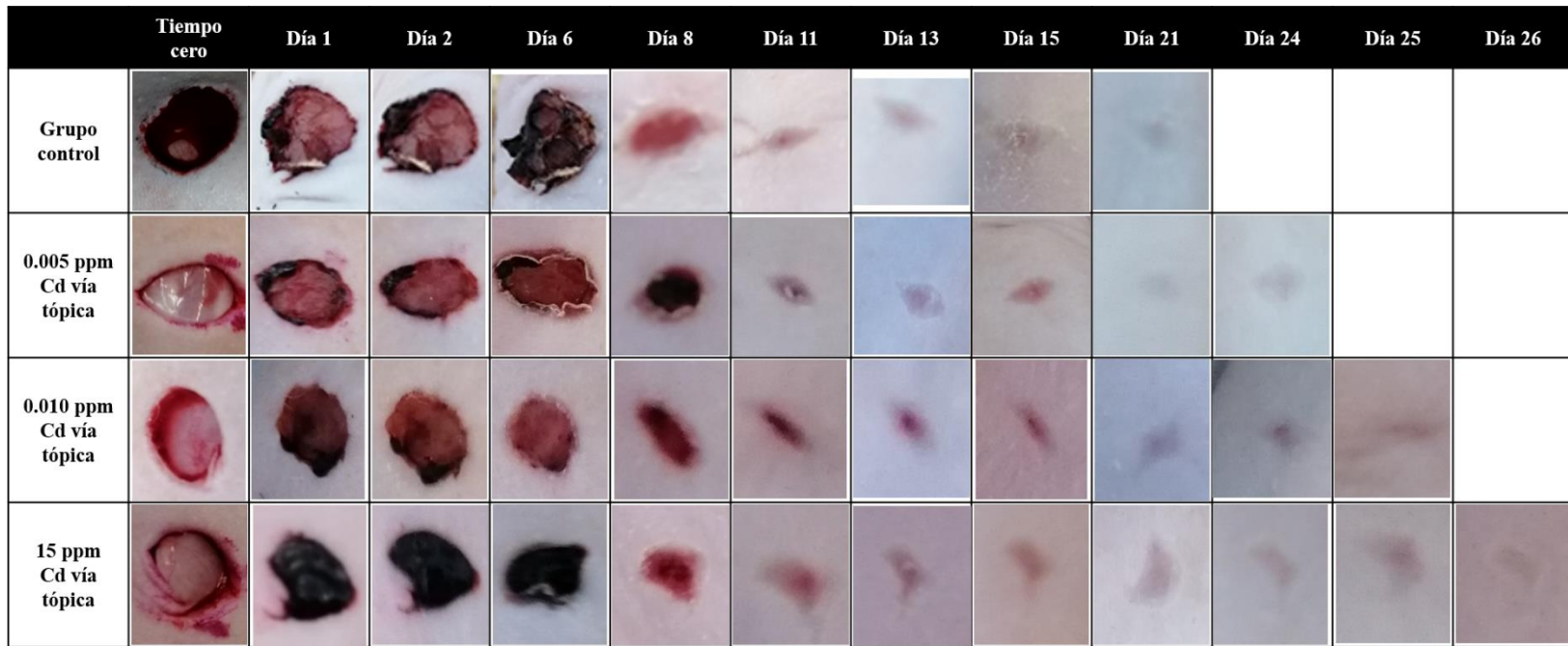


Figura 19. Vista macroscópica de las heridas del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía tópica a los diferentes tiempos.

Las diferencias en los tiempos necesarios para el cierre total de la herida en los diferentes grupos en estudio se pueden visualizar más adecuadamente al graficar el porcentaje del área del tejido cicatricial a los diferentes tiempos. La Figura 20 muestra que el cierre total de la herida en los animales del grupo control tuvo lugar a los 13 días (99.91% área de tejido cicatricial), mientras que para el caso de los grupos administrados con 15 ppm de Cd vía oral (Figura 20A) y los expuestos con 15 ppm de Cd por vía tópica (Figura 20B), los tiempos de cierre de las heridas ocurrieron a los días 21 (99.72% área de tejido cicatricial) y 15 (99.86% área de tejido cicatricial) respectivamente. Cabe mencionar que se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control a los 2 días en todos los grupos administrados con Cd, y a los 8 días para los 3 grupos administrados vía oral y solo en el grupo con 15 ppm de Cd en el caso de la vía tópica. Estos resultados ponen en evidencia que la administración de Cd vía oral y tópica afecta visiblemente las etapas tempranas (2 días) y tardías (8 días) de la fase de proliferación, teniendo efecto en el proceso general de cicatrización.

No obstante que en los resultados se puede apreciar visiblemente el efecto del Cd al inicio de la fase de proliferación, es muy probable que las alteraciones por la administración de Cd también involucren a la fase de inflamación. En el caso de la administración tópica en el grupo expuesto a 15 ppm de Cd, este efecto se prolongó hasta el final de la fase de proliferación.

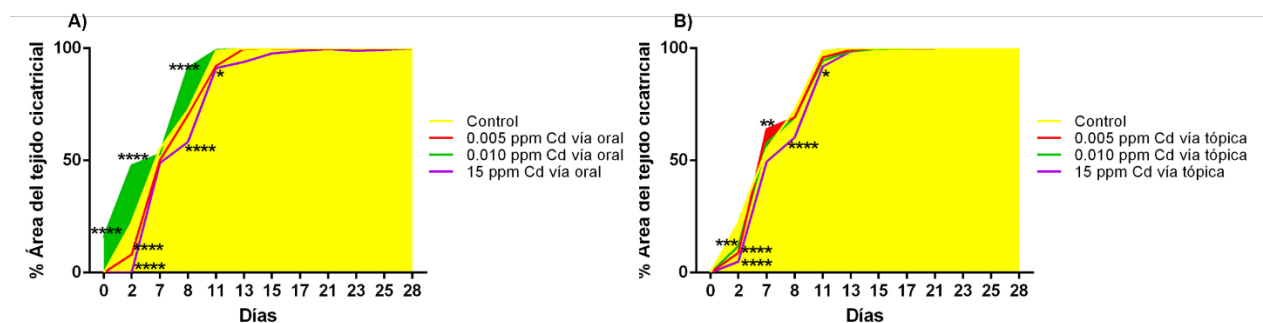


Figura 20. Porcentaje del área del tejido cicatricial del grupo control y de los grupos administrados vía oral (A) y tópica (B).

Efecto del Cd sobre la estructura de la piel

La Figura 21 muestra la estructura de la piel en el grupo de animales control con ayuda de la tinción de HE, en esta figura se observan los cuatro estratos típicos de la piel, con una

epidermis bien definida, una dermis con presencia de glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, folículos pilosos, en su mayoría en fase anágena, y músculos erectores del pelo.

A las 6 horas después de la generación experimental de la lesión, se observó la formación del coágulo de fibrina, necesario para controlar la hemorragia mediante el proceso de hemostasis, que tiene lugar durante las primeras etapas después de la lesión. En esta etapa del proceso de cicatrización las plaquetas inician la liberación de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento para promover la llegada de neutrófilos y activar propiamente la fase de inflamación.

A las 12 horas después de la lesión se observó una abundante presencia de células localizadas en el borde y base de la lesión, las cuales correspondieron a neutrófilos, así como monocitos, células que tienen como finalidad eliminar microorganismos y restos celulares presentes. Estos monocitos se diferenciarán posteriormente a macrófagos M1 y M2 durante las diferentes etapas de la inflamación (90).

A las 24 horas, la profundidad de la lesión se mantuvo sin cambios aparentes. Se observó una discreta formación de nuevos vasos sanguíneos en la base de la lesión, indicando el inicio de la fase de proliferación. También se observó presencia de macrófagos y en menor medida de fibroblastos tanto en el fondo de la herida como en los bordes. Se ha reportado que a las 24 horas hay gran cantidad de macrófagos M1, cuya función es la eliminación de restos celulares y neutrófilos que han iniciado procesos de apoptosis celular.

A las 48 horas posteriores de la lesión, la profundidad de la lesión se mantuvo sin cambios, y sin desprendimiento del coágulo de fibrina, sin embargo, se observó mayor presencia de angiogénesis en el fondo de la herida, mayor cantidad de fibroblastos, macrófagos, así como probablemente también células progenitoras endoteliales (CPE) o células totipotenciales de la epidermis. Se ha reportado que alrededor de las 48 horas después de una lesión en piel se alcanza el máximo número de macrófagos M1, así como también se inicia su activación al fenotipo M2, los cuales tienen una vida media de hasta 3 o 4 días después de la lesión. Específicamente los macrófagos M2b y M2c son los encargados de suprimir la inflamación vía la síntesis de IL-10 y la síntesis de los componentes de la MEC y la liberación de MMPs dando lugar a las etapas finales de la fase de inflamación e inicio de la fase de proliferación, la cual inicia desde las 24

horas. Cabe mencionar que se ha descrito un tercer fenotipo de macrófagos, denominados M2d, a los cuales se les ha atribuido un papel importante en la angiogénesis, que es regulada por la vía VEGF durante la etapa de proliferación (90).

A los 7 días después de lesión, la herida se encuentra prácticamente cerrada. La epidermis muestra estratos basales y granulosos con una morfología similar a las encontradas bajo condiciones basales, mientras que el estrato córneo presentó un grosor disminuido y en algunas zonas de la lesión se mostró ausente. En el caso de la dermis, se observó una gran cantidad de fibroblastos en el sitio de la lesión, también se pudo observar en menor medida presencia de células totipotenciales, disminución de la angiogénesis, folículos pilosos, glándulas sudoríparas y sebáceas. Durante esta etapa los animales presentaron pérdida de la costra, evidenciando la madurez del tejido de granulación que sustituye a la MEC. Este último evento, aunado a la abundante cantidad de fibroblastos indica las etapas finales de la proliferación y migración.

A los 14 días la morfología de la piel es prácticamente “normal”, la epidermis presenta un grosor normal, con los estratos característicos de las condiciones basales. La dermis muestra disminución de la cantidad de fibroblastos y células totipotenciales, hay presencia de glándulas sudoríparas, folículos pilosos, con una dermis similar a las condiciones basales, indicando que se ha iniciado el proceso de remodelación de las fibras de colágeno.

Finalmente, a los 21 días la epidermis y la dermis mostraron la morfología típica de la piel en condiciones basales, con un mínimo de fibroblastos y células totipotenciales.

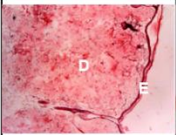
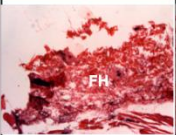
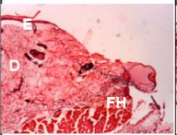
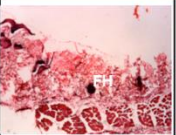
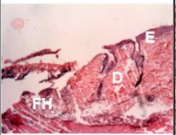
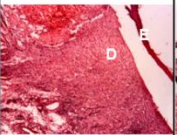
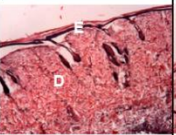
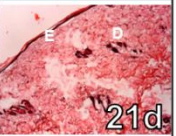
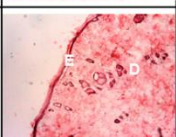
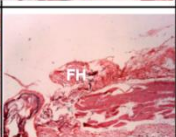
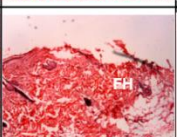
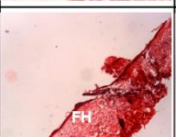
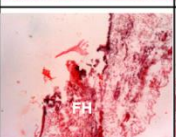
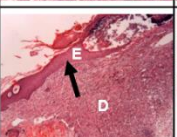
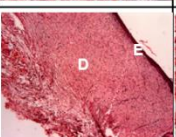
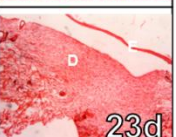
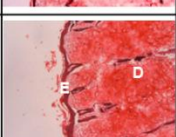

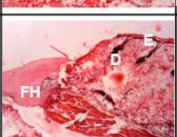
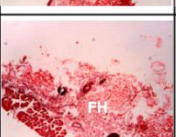
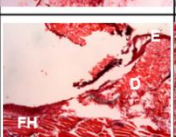
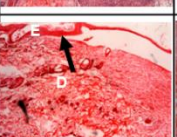
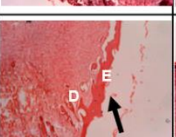
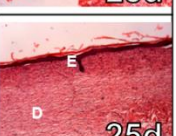
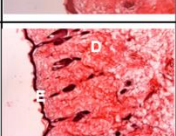

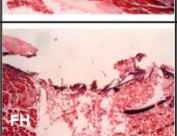
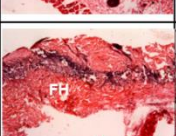
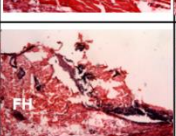
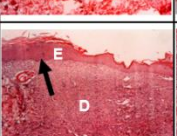

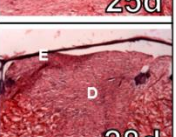
Grupo	Tiempo cero	Inflamación			Proliferación y migración		Remodelación	
		6h	12h	24h	48h	7d	14d	Tiempo final
Control								
0.005 ppm Cd vía oral								
0.010 ppm Cd vía oral								
15 ppm Cd vía oral								

Figura 21. Histología del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía oral a los diferentes tiempos, HE 10X. Las flechas indican alteraciones en el grosor de la epidermis. E: epidermis, D: dermis y FH: fondo de la herida.

En comparación con los animales administrados con 0.005 y 0.010 ppm de Cd por vía oral (Figura 21), no se presentaron diferencias en la histología de la piel a las primeras 24 horas después de practicada la lesión, sin embargo, a las 48 horas se observó mayor cantidad de celularidad en la base de la herida. De acuerdo con la morfología de las células, éstas corresponderían a macrófagos, células totipotenciales y fibroblastos. A los 7 días, ambos grupos de animales administrados con Cd mostraron la presencia de un coágulo de fibrina en el sitio de la lesión, así como también una gran cantidad de fibroblastos y células totipotenciales en la dermis, siendo ligeramente mayor a lo observado en el control. Para el caso de la epidermis, ésta mostró alteraciones en el grosor de los estratos granuloso y espinoso, ya que fue mayor al compararse con los resultados de los animales del grupo control, lo cual evidencia desorganización celular de los estratos mencionados. A los 14 días, en la dermis se observó la presencia de fibroblastos, mientras que la epidermis mostró algunas zonas de engrosamiento y desorganización celular de los estratos granuloso y espinoso, aunque en menor medida que a los 7 días. Al tiempo final, ambos grupos recuperaron la morfología normal de la piel, mostrando su similitud con las condiciones basales, sin embargo, cabe mencionar que el tiempo final de cicatrización para los grupos administrados con 0.005 y 0.010 ppm de Cd por vía oral fue mayor que para el grupo control.

Con relación el grupo de animales administrados con 15 ppm de Cd por vía oral (Figura 21), los resultados mostraron un comportamiento similar al grupo de animales control hasta las 12 horas después de la lesión. A las 24 horas se observó una abundante cantidad de celularidad con características similares a las observadas en los grupos administrados con 0.005 y 0.010 ppm de Cd. Posteriormente, a los 7, 14 y 28 días posteriores a la lesión se observó un comportamiento similar al presentado en los otros grupos administrados con Cd, incluyendo el grosor de los estratos granuloso y espinoso.

Estos resultados permiten inferir que las alteraciones observadas en la celularidad de la dermis durante la fase inflamatoria (24 y 48 horas) en los 3 grupos administrados con Cd por vía oral, podrían dar como resultado la alteración de los estratos granuloso y espinoso de la epidermis, originando el engrosamiento y la desorganización celular en los tejidos. Al relacionar los resultados con el área de las lesiones, la cuantificación de Zn, Cu y Mg, la etapa de liberación de citocinas y de la angiogénesis, etapas que mostraron modificaciones principalmente a las 48

horas, podemos sugerir que el retraso en la cicatrización de los animales administrados con Cd sigue un mecanismo que inicia en la alteración de la fase inflamatoria de la cicatrización y que tiene efectos en la etapa de proliferación, alterando los niveles de Ca.

Por otro lado, es importante tomar en cuenta que, dado que no se detectó Cd en el sitio de la lesión en los grupos administrados por vía oral, aún no es claro como el Cd sistémico puede producir los cambios observados en la piel.

Los resultados de los cambios histológicos en los grupos de animales expuestos a 0.005 y 0.010 ppm de Cd por vía tópica (Figura 22) mostraron comportamientos similares a los grupos administrados con 0.005 y 0.010 ppm de Cd por vía oral a lo largo de todo el proceso de cicatrización, incluyendo el engrosamiento de los estratos granuloso y espinoso a los 7 y 14 días, aunque presentaron una menor cantidad de células en los bordes de la herida a las 48 horas. En el caso del grupo expuesto a 15 ppm de Cd por vía tópica, los resultados fueron similares a lo observado en el grupo con 15 ppm de Cd por vía oral, pero con mayor densidad celular a las 24 y 48 horas y con el posterior engrosamiento de la epidermis a los 7 días, mostrando una disminución a los 14 días, finalizando con una morfología en la cicatriz similar a los grupos administrados por vía oral.

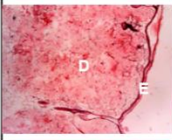
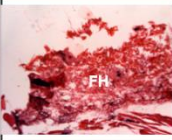
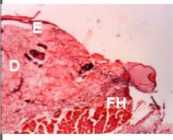
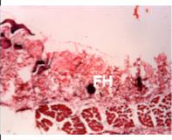
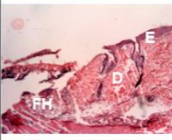
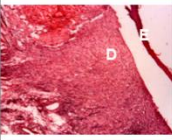
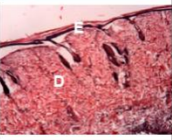
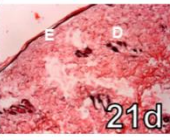
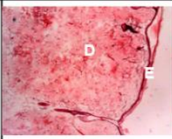
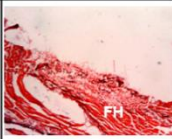
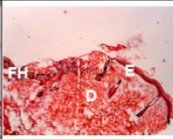
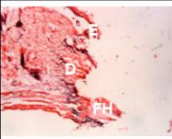
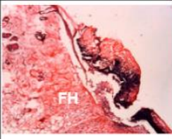
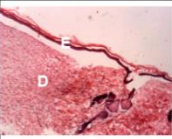
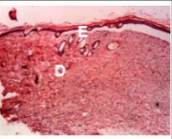
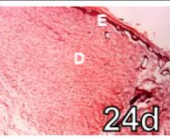
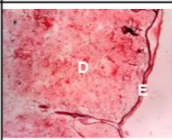
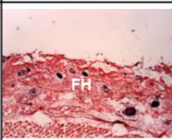
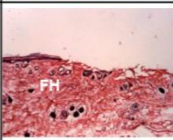
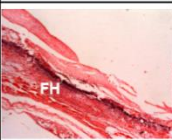
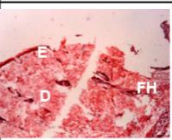
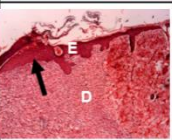
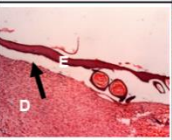
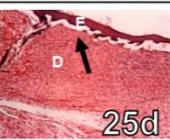
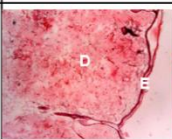
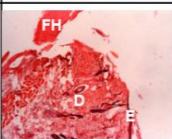
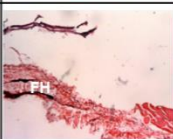
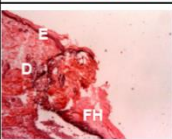
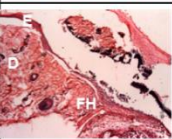
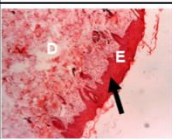
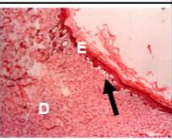
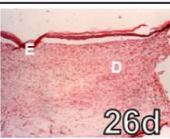
Grupo	Tiempo cero	Inflamación			Proliferación y migración		Remodelación	
		6h	12h	24h	48h	7d	14d	Tiempo final
Control								
0.005 ppm Cd vía tópica								
0.010 ppm Cd vía tópica								
15 ppm Cd vía tópica								

Figura 22. Histología del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía tópica a los diferentes tiempos. HE 10X. Las flechas indican alteraciones en el grosor de la epidermis. E: epidermis, D: dermis y FH: fondo de la herida.

Con relación al engrosamiento y desorganización celular de la epidermis, los resultados obtenidos en los animales administrados con Cd por vía oral y los expuestos a Cd por vía tópica (Figura 23) muestran que estos cambios durante las etapas de inflamación y proliferación son independientes de la concentración de Cd y de la vía de exposición.

Se ha reportado que la disminución en la velocidad del cierre de la herida podría estar relacionada con la liberación de citocinas proinflamatorias (65).

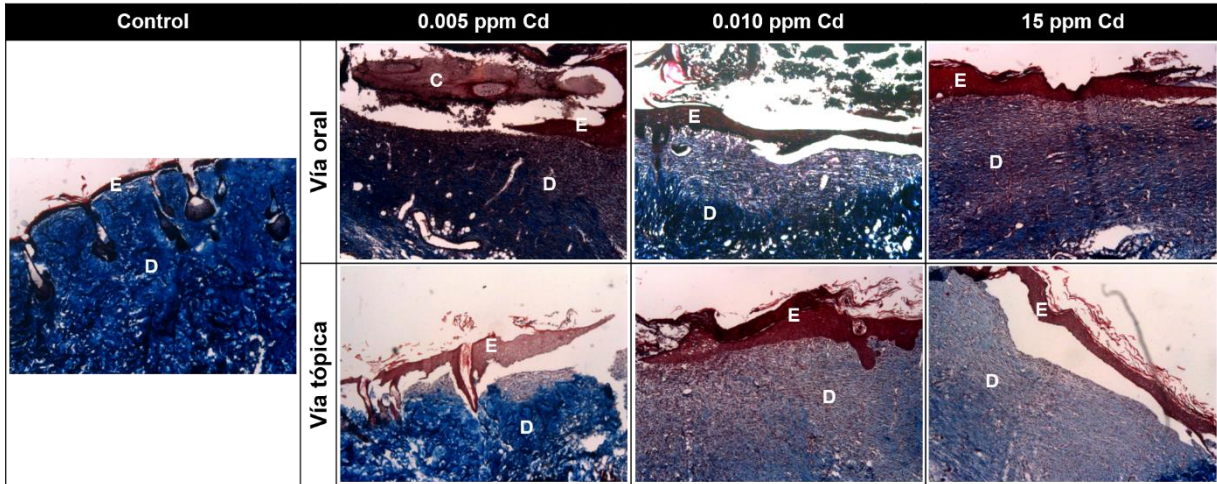


Figura 23. Alteraciones en el grosor de la epidermis del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía oral y tópica a los 7 días. Tricromica de Masson 10X. E: epidermis, D: dermis, C: coágulo de fibrina.

Es importante mencionar que existen diferentes tipos de heridas con características específicas en cuanto al desarrollo de la cicatrización. Las heridas son clasificadas como crónicas muestran un inadecuado desarrollo de las etapas de proliferación y remodelación, las que se caracterizan por el aumento de infiltrados celulares como neutrófilos y macrófagos (91), y la desregulación de la secreción de varias citocinas proinflamatorias como IL-1 β y el TNF- α , llevando a una prolongación de la fase de inflamación (92), además de mostrar elevados niveles de MMPs y disminución de TIMPs (93, 94). Estas heridas también muestran una epidermis hiperproliferativa y no migratoria, donde a pesar de haber un aumento en las células inflamatorias, no todas funcionan correctamente, hay reducción de la angiogénesis y la activación de las células totipotenciales (95). En este tipo de lesiones se encuentran las heridas con infección, heridas de pacientes diabéticos y en heridas posteriores a la operación de pacientes fumadores (24).

En pacientes diabéticos se ha observado que la hiperglucemia promueve el estrés oxidativo (96), hay disfunción de fibroblastos, alteraciones en la angiogénesis, altos niveles de MMPs (97), estados de hipoxia que dan origen a una hiperinflamación en el tejido y una epidermis hiperproliferativa (95).

Un número de pacientes fumadores que han sido sometidos a un proceso quirúrgico presentan retraso en la cicatrización debido a una variedad de complicaciones, como infección, abertura de la herida, necrosis y epidermólisis (98). Sin embargo, es difícil identificar las causantes de estas complicaciones, ya que se han identificado más de 4000 sustancias en el humo del tabaco, incluyendo la presencia de Cd, nicotina, monóxido de carbono y el cianuro de hidrógeno, los que están relacionados con la oxigenación e hipoxia celular (99). Se ha observado que el humo del cigarro afecta principalmente la fase de inflamación alterando la migración de neutrófilos, monocitos y macrófagos al sitio de lesión (100). Mientras que para el caso de la fase de proliferación se ha observado disminución de la proliferación y migración de fibroblastos, reducción de la contracción de la herida, disminución en la producción de la MEC y alteración en el equilibrio de MMPs (99). Sin embargo, se tiene certeza de que dejar de fumar mejora la cicatrización y reduce la infección en las heridas (101).

Las heridas crónicas caracterizadas por una hiperproliferación de la epidermis y de acuerdo con los resultados de los estudios realizados por Lansdown (62) y Tucovic (64), quienes reportan que en animales expuestos a Cd se presenta una hiperqueratosis e hipergranulosis en heridas tisulares, hace suponer que Cd puede tener un papel en el desarrollo de estas alteraciones en la cicatrización. Al comparar estos hallazgos con los resultados obtenidos en nuestro modelo con administración oral y tópica de Cd encontramos que el comportamiento celular durante la cicatrización de la epidermis es similar al de las heridas crónicas. Lo anterior permite inferir que probablemente la administración oral o tópica de Cd sigue alguno de los mecanismos relacionados con el reclutamiento de células inflamatorias, como neutrófilos, monocitos y macrófagos, causando el aumento de un estado inflamatorio que es exacerbado en las heridas crónicas. Esto es especialmente importante en el caso de las heridas en los pacientes fumadores en donde el Cd está presente en cantidades significativas en el humo del cigarro. Sin embargo, es necesario mencionar que todos los grupos administrados con Cd finalmente lograron recuperar una morfología similar a la del grupo control, aunque con variación de los tiempos

finales de la cicatrización. También es importante tomar en cuenta que existen diferencias en la cicatrización de heridas crónicas entre humanos y modelos murinos. En el caso de los primeros, la cicatrización no solo muestra retrasos, sino que puede en algunos casos no concretarse, mientras que en los modelos murinos el cierre de la herida eventualmente tendrá lugar, no obstante, la presencia de patologías asociadas, como diabetes. Una de las razones propuestas es que la piel murina no cierra únicamente por reepitelización, sino también por contracción, mientras que la piel humana solo cierra por reepitelización. Pese a estas diferencias, los modelos murinos tienen muchas similitudes en cuanto a la celularidad de los tejidos, convirtiéndolo en un modelo aceptable, pero siempre tomando en cuenta estas diferencias al momento de realizar el estudio de heridas crónicas no cicatrizantes, como podría ser el caso de nuestro modelo de estudio (102).

Semicuantificación de colágeno tipo I

Durante la fase de proliferación y migración se lleva a cabo la formación del tejido de granulación, el cual, a diferencia de la dermis típica que contiene colágeno tipo I, este se compone principalmente de colágeno tipo III, fibroblastos y nuevos vasos sanguíneos. Durante la fase de remodelación hay una sustitución de colágeno tipo III por colágeno tipo I, el cual es más resistente y formará parte del tejido cicatricial final. Este proceso es promovido por miofibroblastos, que se desarrollan a partir de los fibroblastos presentes en la herida en respuesta a la señalización de TGF- β , y la secreción de MMPs que degradan colágeno (103).

En este trabajo el seguimiento de la sustitución de colágeno se realizó mediante la tinción tricrómica de Masson, la cual tiñe principalmente fibras de colágeno tipo I (104). Posteriormente la cuantificación del porcentaje del área teñida para colágeno tipo I se realizó mediante el uso del software Image J con el complemento Colour Deconvolution 1.5.

Los resultados del grupo control (Tabla 4) mostraron un punto máximo en el nivel de colágeno tipo I a partir de los 7 días, manteniéndose hasta el día 21 (Figura 23), etapa correspondiente a la proliferación tardía, en donde se lleva a cabo la remodelación de la MEC con la sustitución de colágeno. Estos resultados muestran que la fase de remodelación tiene su inicio a partir del día 7, tal como se ha descrito previamente en un proceso “normal” de cicatrización (105).

Tabla 4. Puntuaciones de la presencia de colágeno en el sitio de la herida en el grupo control y los grupos administrados con Cd a los diferentes tiempos.

	<i>0</i>	<i>6h</i>	<i>12h</i>	<i>24h</i>	<i>48h</i>	<i>7d</i>	<i>14d</i>	<i>Final</i>
<i>Control</i>	+++	++++	+++	++	+++	++++	++++	++++
<i>0.005 ppm Cd vía oral</i>	++++*	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
<i>0.010 ppm Cd vía oral</i>	++++**	++****	+++	+***	++++	++++	++++	+++
<i>15 ppm Cd vía oral</i>	+++	+++	++***	+***	++***	+++	++++	+++
<i>0.005 ppm Cd vía tópica</i>	+++	++****	+++	+++	++	+++	++**	+****
<i>0.010 ppm Cd vía tópica</i>	+++	+++	+++	++	+++	++****	++++	+++
<i>15 ppm Cd tópica</i>	+++	++****	++++	+++	++++	++++	++**	++++

La puntuación del porcentaje del área teñida para colágeno fue:

- (-) <1%
- (+) 1-25%
- (++) 26-50%
- (+++) 51-75%
- (++++) 76-100%

En este trabajo, los animales administrados con 0.005 y 0.010 ppm de Cd por vía oral mostraron un comportamiento similar a los animales control, sin embargo, en el grupo administrado con 15 ppm de Cd por vía oral, el porcentaje del área teñida para colágeno fue menor a los 7 y 28 días, resultados que muestran que la cantidad de colágeno tipo I es menor al presentado en los animales del grupo control (Figura 24). Estos datos sugieren una alteración en el recambio de colágeno durante esta fase de remodelación, lo cual puede contribuir a un retraso en la formación del tejido cicatricial final.

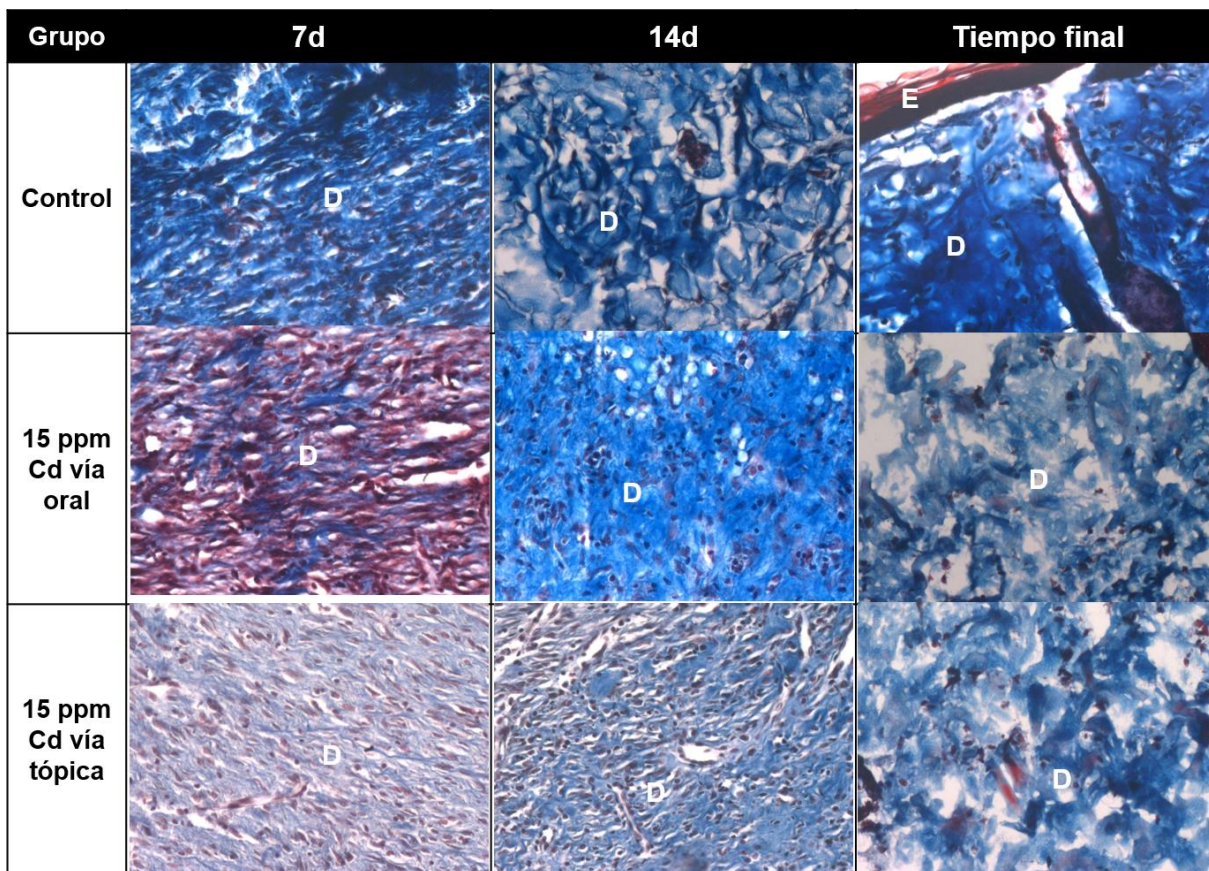


Figura 24. Densidad de colágeno en la dermis de los grupos de animales control y administrados con 15 ppm de Cd por vía oral y tópica a los 7, 14 días y al tiempo final. Tricromica de Masson 20X. D: dermis, E: epidermis.

Por otro lado, en los grupos administrados por vía tópica la disminución del porcentaje del área teñida fue más evidente a los 7 días en los grupos expuestos a 0.005 y 0.010 ppm de Cd, mientras que para el caso del grupo expuesto a 15 ppm de Cd la disminución se observó a los 14 días (Figura 24). Estos resultados presentan un comportamiento similar al del grupo de animales administrados con Cd por vía oral, donde el recambio de colágeno tipo III al tipo I mostró igualmente disminuciones. De esta forma podemos evidenciar que las alteraciones en los grupos administrados con Cd no solo tienen consecuencias durante la etapa tardía de la proliferación en los estratos de la epidermis, sino que también se altera el desarrollo de la dermis durante la fase de remodelación. Esta dificultad en el paso de la fase de proliferación a la de remodelación es una de las características principales de las heridas crónicas.

Presencia de polimorfonucleares, neutrófilos (PMN)

Los neutrófilos son producidos en médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas, los que posteriormente son liberados a la circulación. Cuando ocurre una lesión en la piel, los neutrófilos son capaces de recibir señales para su reclutamiento, tal es el caso de los patrones moleculares asociados al daño (DAMP), citocinas y quimiocinas. Se considera que los DAMP son las primeras señales que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos al sitio de la herida (106).

Los DAMP funcionan como quimioatrayentes formando gradientes de señalización para impulsar la migración de neutrófilos, también inducen la producción de CXCL8 y leucotrieno B4 (LTB4) que a su vez promueven la quimiotaxis en neutrófilos. CXCL8 al ser liberado por macrófagos (107) estimula los receptores de superficie de neutrófilos CXCR1 y CXCR2 amplificando aún más su reclutamiento (108). Una vez que los neutrófilos llegan a la herida secretan CXCL8 dando lugar a un circuito de retroalimentación proinflamatorio.

Otras quimiocinas involucradas en la quimiotaxis de neutrófilos son CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 y CXCL7 (109). Estas quimiocinas se unen a los glucosaminoglucanos de la MEC para crear un gradiente de señalización y permitir la migración (103). La liberación de citocinas y factores de crecimiento, como CXCL1, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , PDGF y TGF- β (110) también promueve el reclutamiento de neutrófilos.

Una vez que los neutrófilos llegan al tejido dañado pueden adoptar varias estrategias con el propósito de restaurar la arquitectura y función del tejido. En primer lugar, tienen una función fagocítica para la eliminación de restos celulares, patógenos, eritrocitos (111) mediante el uso de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). También se ha observado que contribuyen a la regeneración mediante la liberación de VEGF para promover la angiogénesis (112), sin embargo, esta función no la realizan en solitario, sino que también inducen la producción de VEGF en las células epiteliales. Los neutrófilos también son una fuente importante de MMP-9, promotora de la angiogénesis (113), así como también inducen la expresión de citocinas reclutadoras de macrófagos, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL2.

Para que la cicatrización sea eficiente los neutrófilos deben ser eliminados, por lo cual se sigue un programa de resolución anticipada donde la apoptosis de neutrófilos produce que los

macrófagos pasen de un fenotipo proinflamatorio M1 a uno antiinflamatorio M2 (114), vía IL-10, IL-4/IL-13 receptores de tipo TLR (115), siendo estos macrófagos M2 los encargados de la fagocitosis de neutrófilos. La transición de una herida proinflamatoria a un medio antiinflamatorio con abundantes M2 es esencial para finalizar el proceso inflamatorio y promover el inicio de la proliferación.

Cuando se altera la transición de un fenotipo M1 a M2, también se altera la eliminación de neutrófilos, prolongando su presencia en el sitio de la lesión. Muchos estudios sugieren que la presencia prolongada de neutrófilos y sus mediadores inflamatorios contribuyen a la formación de heridas crónicas, donde los elevados niveles de MMPs contribuyen a la degradación de la MEC (103).

Trabajos previos han reportado que los neutrófilos de algunos tejidos con inflamación pueden adoptar una migración reversa, donde éstos regresan al torrente sanguíneo en lugar de volverse apoptóticos, esto con el propósito de combatir la inflamación, sin embargo, también son capaces de extender la inflamación a otros tejidos (116).

La Figura 25 es una imagen de microscopía óptica donde se muestran los PMN que se utilizaron como base para la cuantificación de PMN por campo.

Los resultados de la cuantificación de PMN, principalmente neutrófilos, en el grupo control se encontraron ausentes en condiciones basales, sin embargo, después de realizada la lesión se observó un aumento gradual de PMN alcanzando un punto máximo a las 48 horas, para posteriormente ir disminuyendo hasta los 21 días (Figura 26).

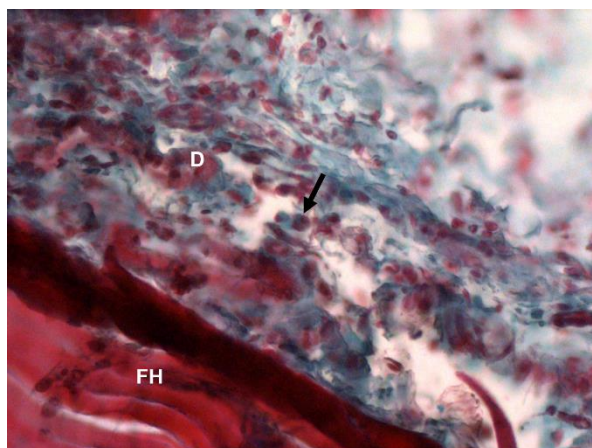


Figura 25. Presencia de PMN en el sitio de la lesión a las 48h en el grupo control. Tinción de Mieloperoxidasa. 20X. D: dermis, FH: fondo de la herida.

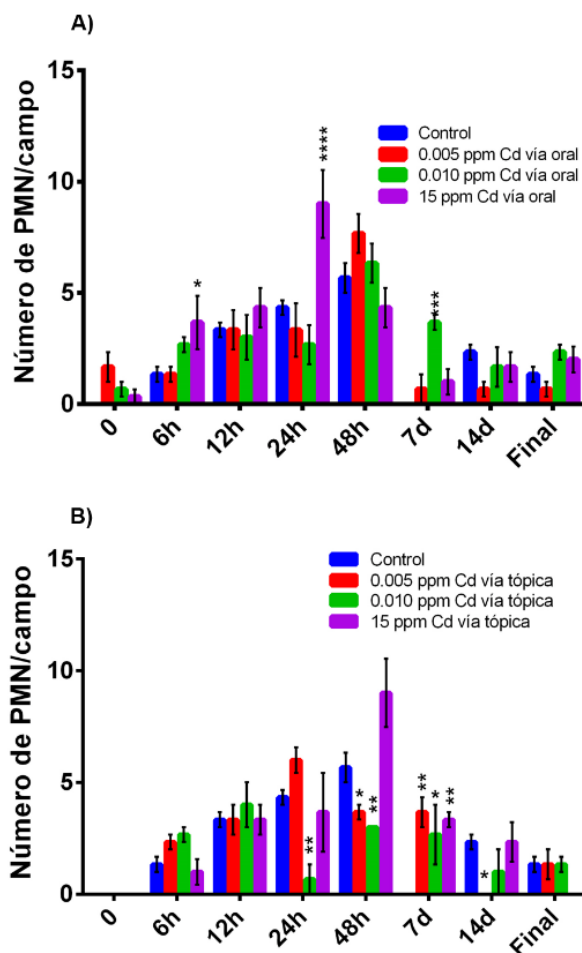


Figura 26. Cuantificación de PMN presentes en el tejido de la herida en el grupo control y de los grupos administrados con Cd vía A) oral y B) tópica a los diferentes tiempos mediante tinción de MPO.

Los grupos de animales administrados con 0.005 y 0.010 ppm Cd vía oral no mostraron diferencias significativas en el número de PMN en comparación con los animales control, sin embargo, en las ratas administradas con 15 ppm de Cd por vía oral se presentó un incremento de PMN a las 6 y 24 horas al compararse con los animales control, para posteriormente disminuir a los 28 días (Figura 26A). El aumento en el reclutamiento de neutrófilos durante la etapa de inflamación es interesante cuando se relaciona con el aumento de las concentraciones de Zn durante esta etapa, ya que como se mencionó anteriormente, dentro de las funciones del Zn está su capacidad de regular de forma negativa y/o positiva las vías de señalización de TLR, reflejando su capacidad para regular la activación de NF- κ B y la posterior liberación de quimiocinas inflamatorias durante la fase de inflamación por parte de las plaquetas (CXCL8, CXCL1 y CXCL2) y neutrófilos (principalmente CXCL8, CCL2, CCL3 y CCL5). De estas quimiocinas, CCL2 y CXCL2 se han relacionado con un número elevado tanto de neutrófilos, como de macrófagos, así como niveles elevados de IL-1 y TNF- α en heridas crónicas (117). Esta información es importante porque nos permite inferir bajo el modelo de herida crónica, como los grupos administrados con Cd por vía oral, tanto los incrementos del nivel de Zn y el aumento en el número de neutrófilos observado en nuestro modelo puede favorecer la liberación de quimiocinas proinflamatorias mediante la activación de NF- κ B (118). El efecto del Cd en la activación de la vía de NF- κ B puede estar afectando a las células de la circulación general, como plaquetas, monocitos y neutrófilos, debido a la distribución del metal en la circulación durante la administración por vía oral.

Con relación a los 3 grupos expuestos a Cd por vía tópica (Figura 26B), se observó un aumento en el número de PMN a los 7 días, particularmente en el grupo expuesto con 15 ppm de Cd, el incremento de PMN tuvo su máximo a las 48 horas. Este aumento a los 7 días es importante porque nos estaría indicando una prolongación de la presencia de neutrófilos en el sitio de la lesión (característica de las heridas crónicas) donde el Cd administrado vía tópica tiene la capacidad de alterar directamente el reclutamiento de neutrófilos por medio de la misma vía NF- κ B pero en las células residentes de la piel, como queratinocitos y fibroblastos.

Detección de células totipotenciales

En la piel existen 3 compartimientos capaces de autorrenovarse, la epidermis, las glándulas sebáceas y los folículos pilosos, los dos primeros se renuevan constantemente,

mientras que el último presenta ciclos de reposo (15). Cuando se presentan heridas de profundidad completa, como es el caso de nuestro estudio, la cicatrización tiene lugar desde los bordes de la herida (12), donde las células totipotenciales de la epidermis comienzan a proliferar 2-3 días después de la lesión (119).

Durante el cierre de una herida se han identificado dos zonas de actividad celular totipotencial, la primera es la población celular más cercana al borde de la herida que se caracteriza por una migración rápida y diferenciación a lo largo de la membrana basal. En esta zona las células basales migran hacia el centro de la herida y las tasas de migración y diferenciación se acoplan causando un engrosamiento del tejido de la epidermis en el borde de la herida. La segunda zona proliferativa controla la participación del epitelio no adherido circundante durante la reepitelización (21).

En este trabajo se evaluó el comportamiento de las células totipotenciales mediante inmunohistoquímica de los marcadores CK15 y CK19, ya que se ha reportado que detectan células que poseen características de células totipotenciales como autorrenovación y multipotencia (120). Posteriormente se cuantificó el porcentaje del área teñida con DAB mediante el uso del software Image J con el complemento Colour Deconvolution 1.5.

CK15

Los resultados obtenidos en el grupo control (Tabla 5) mostraron que el mayor porcentaje de células CK15 se observó a las 24 y 48 horas, correspondiendo a las etapas iniciales de la fase de proliferación. Mientras que, para el caso de los grupos de animales administrados con Cd por vía oral y tópica, el mayor porcentaje de células CK15+ se observó desde las 6 hasta las 24 horas en el caso del grupo con 15 ppm de Cd por vía oral. En los grupos administrados por vía tópica este porcentaje se mantuvo elevado hasta los 7 días (Figura 27).

Tabla 5. Puntuaciones de la inmunohistoquímica para CK15 en el grupo control y los grupos administrados con Cd a los diferentes tiempos.

	0	6h	12h	24h	48h	7d	14d	Final
Control	++	+	++	+++	+++	+	+	+
0.005 ppm Cd vía oral	+***	+++**	+++	+++	++	+++****	++*	+
0.010 ppm Cd vía oral	+***	+++****	+++*	+++	+++	+	++	++*
15 ppm Cd vía oral	+***	+++**	+++*	+++	++*	+++****	+++****	+
0.005 ppm Cd vía tópica	++	+++***	+++	+++	+++	+++****	++	+
0.010 ppm Cd vía tópica	++	+++***	++	+++	+++	+++****	++	+
15 ppm Cd vía tópica	++	+++***	+++	+++	+++	++***	+	+

La puntuación del porcentaje del área positiva a las inmunohistoquímicas fue:

(-) <1%

(+) 1-25%

(++) 26-50%

(+++) 51-75%

(++++) 76-100%

*Diferencias estadísticas $p < 0.02$, ANOVA bidireccional

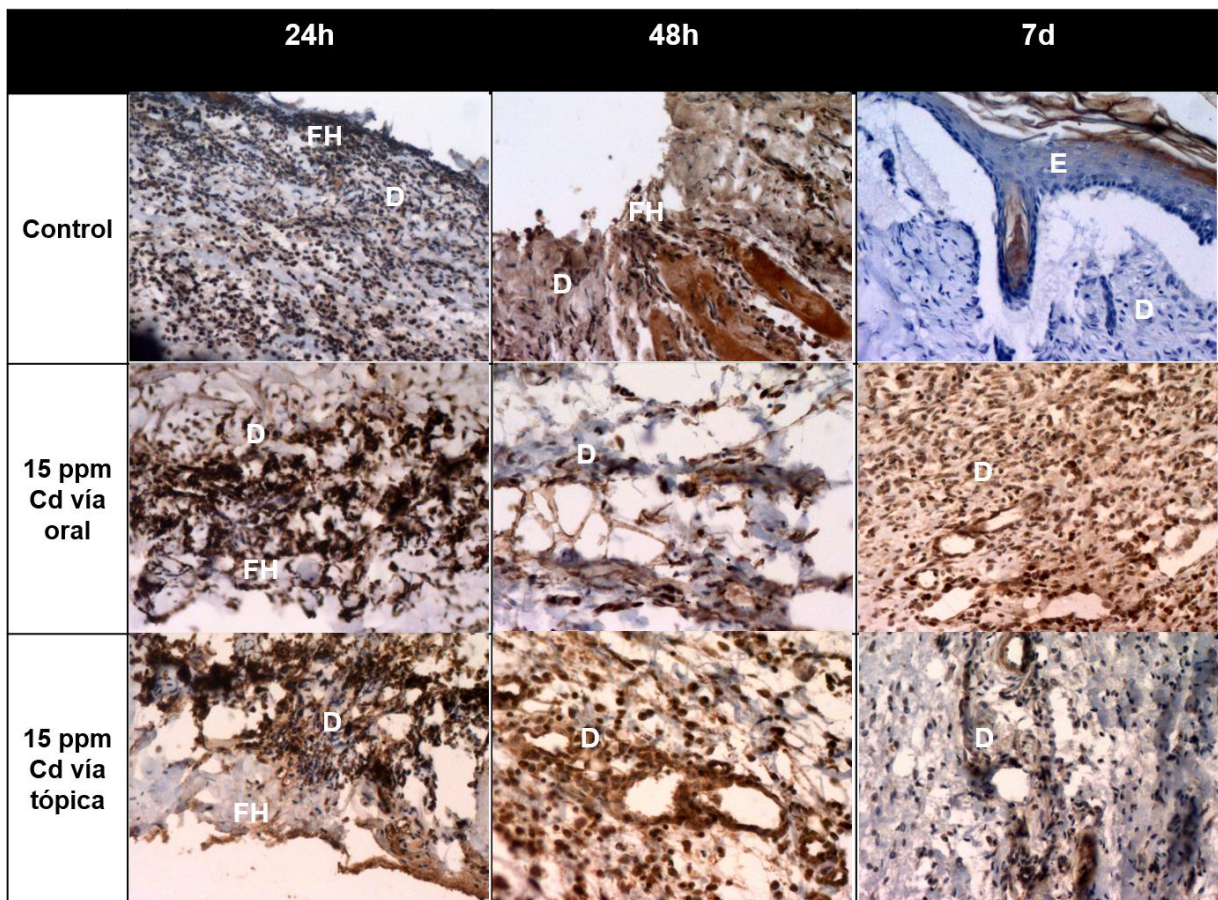


Figura 27. Inmunohistoquímica para CK15+ de los grupos de animales control y administrados con 15 ppm de Cd por vía oral y tópica a las 24h, 48h y 7 d. CK15 20X. D: dermis, E: epidermis, FH: fondo de la herida.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia que los grupos administrados con Cd presentan alteraciones en cuanto al tiempo durante el cual se desarrolla la proliferación celular de las células totipotenciales, pudiendo afectar la correcta activación y desarrollo de la fase de proliferación y migración. En el caso particular de los grupos con 15 ppm Cd vía oral y los tres grupos con administración tópica que mantuvieron la presencia de células marcadas hasta los 7 días, podría ser evidencia de la dificultad que presentan las heridas para poder iniciar adecuadamente la fase de remodelación. También es importante recordar que es precisamente a los 7 días donde se observó el engrosamiento y la desorganización celular de los estratos granuloso y espinoso de la epidermis, donde tiene lugar la migración por parte de las células totipotenciales epidérmicas (Figuras 28 y 29). Cabe mencionar que este comportamiento no se observó en el grupo control a los 7 días, evidenciando el retraso en la migración de las células totipotenciales epidérmicas en los grupos administrados con Cd. Estos resultados adquieren mayor importancia al ser relacionados con la cuantificación de Ca, que muestra mayores niveles a los 7 días en todos los grupos administrados con Cd, por lo cual se sugiere que podría estar aumentando la proliferación de las células totipotenciales epidérmicas vía señalización β -catenina.

Nuevamente, es importante recordar que esta dificultad para promover el inicio de la fase de remodelación, y la presencia de la epidermis hiperproliferativa presentes en nuestro modelo son características de las heridas crónicas.

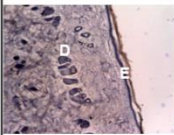
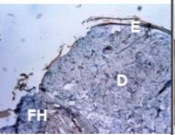
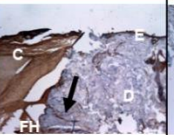
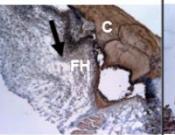
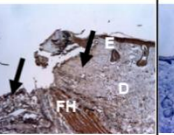
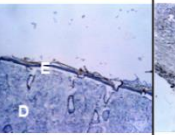
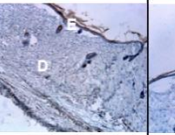
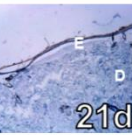
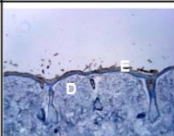
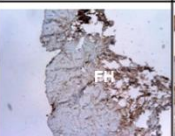
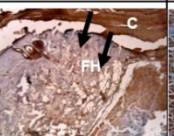
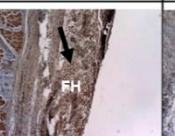
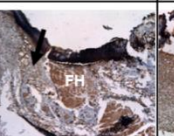
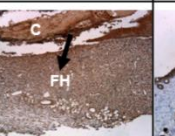
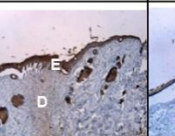
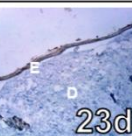
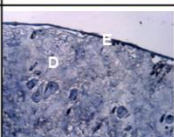
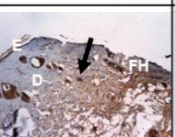
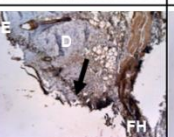
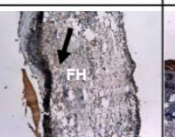
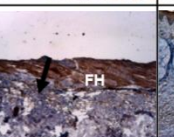
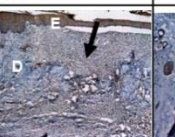


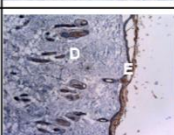
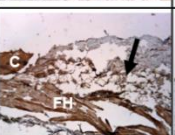
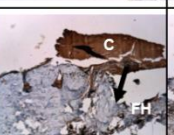
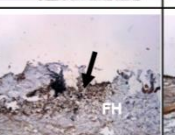
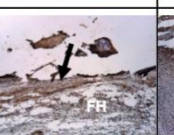


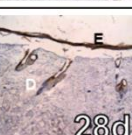
Grupo	Tiempo cero	Inflamación			Proliferación y migración		Remodelación	
		6h	12h	24h	48h	7d	14d	Tiempo final
Control								
0.005 ppm Cd vía oral								
0.010 ppm Cd vía oral								
15 ppm Cd vía oral								

Figura 28. Inmunohistoquímica para CK15 del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía oral a los diferentes tiempos. CK15 10X. Las flechas indican abundante presencia de células positivas a CK15 en la zona de la herida. E: epidermis, D: dermis, FH: Fondo de la herida y C: coágulo de fibrina

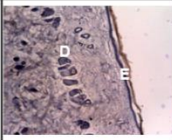
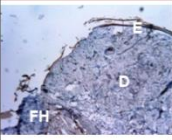
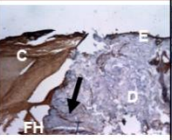
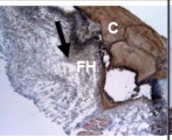
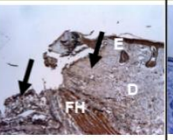
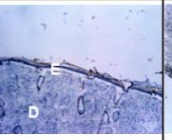
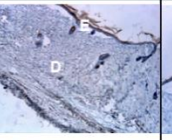
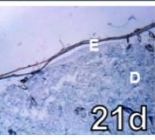
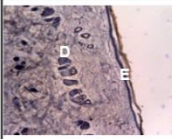
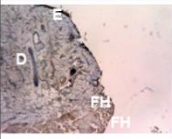
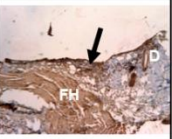
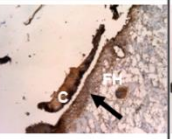
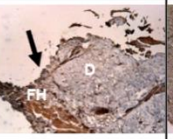
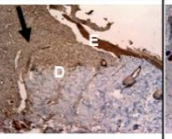
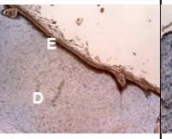
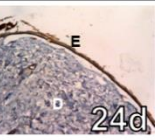
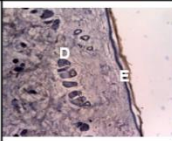
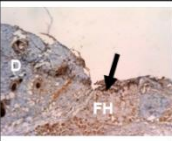
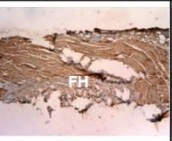
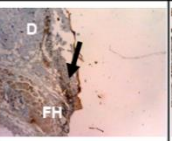
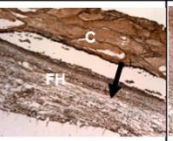
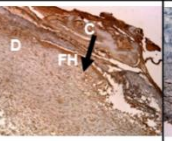
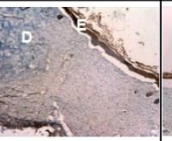
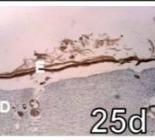
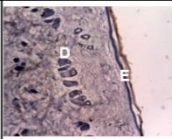
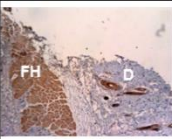
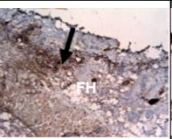
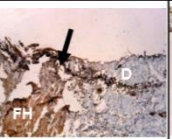
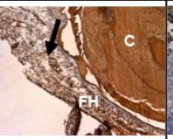
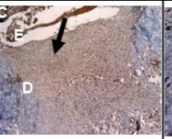
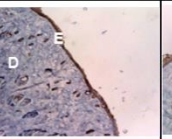
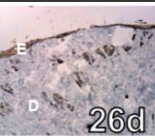
Grupo	Tiempo cero	Inflamación			Proliferación y migración		Remodelación	
		6h	12h	24h	48h	7d	14d	Tiempo final
Control								
0.005 ppm Cd vía tópica								
0.010 ppm Cd vía tópica								
15 ppm Cd vía tópica								

Figura 29. Inmunohistoquímica para CK15 del grupo control y de los grupos administrados con Cd vía tópica a los diferentes tiempos. CK15 10X. Las flechas indican abundante presencia de células positivas a CK15 en la zona de la herida. E: epidermis, D: dermis, FH: Fondo de la herida y C: coágulo de fibrina.

CK19

Para el caso de CK19 en el grupo control (Tabla 6) se observó aumento del porcentaje del área marcada desde las 6 hasta las 24 horas, correspondiente a la etapa de inflamación. En el caso del grupo con 0.005 ppm Cd vía oral los niveles máximos se observaron a las 48 horas y a los 7 días, mientras que para 0.010 y 15 ppm Cd vía oral los niveles máximos se observaron a las 48 horas. En el caso de los grupos administrados por vía tópica, los tres grupos mostraron niveles máximos a las 48 horas, pero en menor medida que el grupo control.

Si bien para el caso del grupo control los resultados difieren de los obtenidos con CK15, en los grupos orales con 0.005 y 0.010 los resultados muestran un comportamiento similar a los resultados con CK15, donde hay dificultad para iniciar las fases de proliferación y remodelación. Sin embargo, para el resto de los grupos los resultados son irregulares. Este comportamiento del marcador CK19 ya ha sido reportado en otro estudio (70), en donde se reportan resultados variables. No obstante, los resultados obtenidos nos dan una idea general del comportamiento de algunos grupos para poder relacionarlos con los resultados obtenidos con CK15.

Tabla 6. Puntuaciones de la inmunohistoquímica para CK19 en el grupo control y los grupos administrados con Cd a los diferentes tiempos

	tiempos							
	0	6h	12h	24h	48h	7d	14d	Final
<i>Control</i>	+	+++	+++	+++	++	+	+	+
<i>0.005 ppm Cd vía oral</i>	+	++	++	++	+++*	+++***	+	+
<i>0.010 ppm Cd vía oral</i>	+	++*	+**	+***	+	+	-	+
<i>15 ppm Cd vía oral</i>	-	++	+****	+****	+	+	-	-
<i>0.005 ppm Cd vía tópica</i>	+	+****	+****	+****	++	-	-	+
<i>0.010 ppm Cd vía tópica</i>	+	-****	+****	++*	++	+	-	+
<i>15 ppm Cd vía tópica</i>	+	+****	++**	+****	++	+	-	+

La puntuación del porcentaje del área positiva a las inmunohistoquímicas fue:

(-) <1%

(+) 1-25%

(++) 26-50%

(+++) 51-75%

(++++) 76-100%

*Diferencias estadísticas $p < 0.02$, ANOVA bidireccional

Actividad de MMP-2 y MMP-9

Las MMPs participan en todas las fases del proceso de cicatrización, sin embargo, su actividad varía dependiendo del lugar de la lesión, la etapa de la cicatrización, y su regulación por los TIMP. Un desequilibrio entre las MMPs y sus respectivos TIMP puede causar

sobredegradación de la MEC afectando la cicatrización. La expresión de las MMPs es regulada por varias vías de señalización, como NF- κ B, MAPk y Wnt (38).

Las MMPs pueden presentar tanto una actividad proinflamatoria, así como actividad antiinflamatoria, tal es el caso de la MMP-9, que puede activar algunas quimiocinas como CXCL8 y CXCL6, las que reclutan neutrófilos durante la etapa de inflamación, en donde la secreción de MMP-9 generalmente es atribuida a los mismos neutrófilos.

Para el caso de MMP-2, se ha observado que es una enzima presente en la piel bajo condiciones basales, mientras que en presencia de una herida puede causar la escisión de CCL7, impidiendo su unión al receptor CCR2 involucrado en la quimiotaxis de monocitos. Por otro lado, MMP-2 se ha relacionado con la expresión de laminina 322, la cual ha mostrado tener funciones duales en la migración (121).

Las heridas crónicas generalmente tienen lugar debido a una inflamación tardía que produce altos niveles de MMPs destruyendo moléculas importantes para la cicatrización, como factores de crecimiento, receptores, proteínas de la MEC, citocinas y quimiocinas, lo que afecta la fase de remodelación. En este tipo de heridas se ha identificado mayor actividad de MMP-1, MMP-8 y MMP-9, así como niveles bajos de TIMP. En pacientes con diabetes tipo 2 se ha reportado que especialmente MMP-9 se encuentra aumentada, mientras que TIMP-3 está disminuido (121). Además, se ha mencionado que en heridas crónicas el aumento de MMP-8 y MMP-9 puede alterar la síntesis de colágeno (122).

Con relación a los resultados obtenidos en este trabajo, el zimograma general del grupo control en todos los tiempos estudiados (Figura 30) mostró la presencia de las formas inactivas y activas de MMP-2 y MMP-9, sin embargo, varió de acuerdo con la progresión de la cicatrización de la herida. En el caso de Pro-MMP-9 está presente bajo condiciones basales, sin embargo, después de realizada la lesión tisular se detectó una ligera actividad de la enzima a las 6 horas y posteriormente su aumento, con actividad máxima a las 24 horas (fase inflamatoria). Después de este tiempo la actividad disminuyó hasta alcanzar los niveles basales a los 21 días. En el caso particular de la forma activa de MMP-9, su comportamiento fue similar a la forma inactiva. Por otro lado, la enzima Pro-MMP-2 mostró una actividad constante hasta los 14 días, presentando una actividad máxima a los 14 días, que corresponde a la fase de remodelación.

Posteriormente regresó a sus condiciones basales a los 21 días. La actividad de la forma activa de MMP-2 mostró un comportamiento similar a su forma inactiva, con la diferencia de que a los 14 días se observó la mayor actividad.

Los zimogramas obtenidos de los animales administrados con 0.005 y 0.010 ppm de Cd por vía oral, no mostraron diferencias significativas en comparación con los resultados de los animales control. Sin embargo, en los animales administrados con 15 ppm de Cd por vía oral la actividad de las MMPs mostró diferencias, especialmente para la MMP-9 en donde se evidenció una máxima actividad a los 7 días, manteniéndose elevada hasta los 14 días. Para el caso de MMP-2, la actividad máxima de esta enzima se presentó hasta los 28 días, a diferencia del día 14 en los animales control.

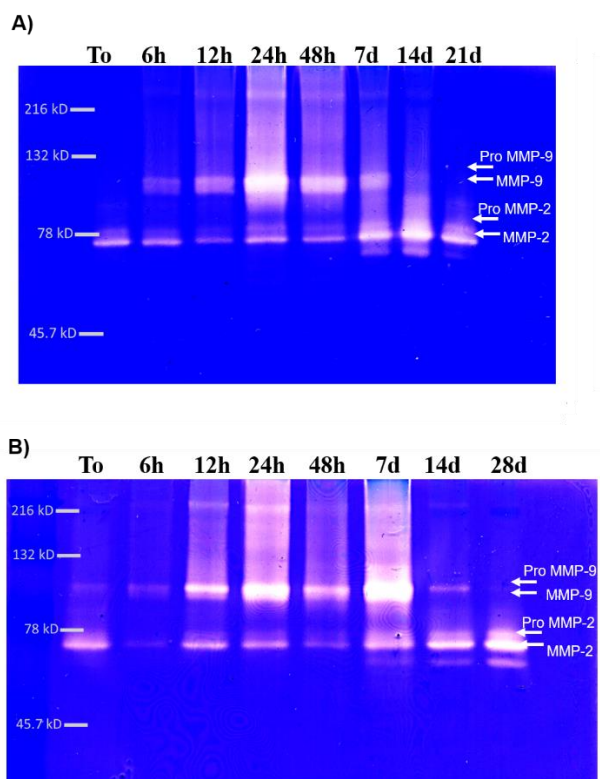


Figura 30. Zimogramas del tejido de la herida del A) grupo control y del B) grupo administrado con 15 ppm Cd vía oral a los diferentes tiempos.

En los grupos de animales administrados con 0.005 y 0.010 ppm de Cd por vía tópica (Figura 31), los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas respecto al grupo

de animales control, sin embargo, en el grupo de animales administrados con 15 ppm de Cd, el máximo de actividad de MMP-9 se presentó desde las 12 horas hasta los 7 días, mientras que para el caso de MMP-2 el comportamiento de la actividad tuvo el mismo comportamiento al observado en el grupo de animales administrado por vía oral con 15 ppm de Cd, sin diferencias notables entre las formas inactivas y activas de MMP-2 y MMP-9.

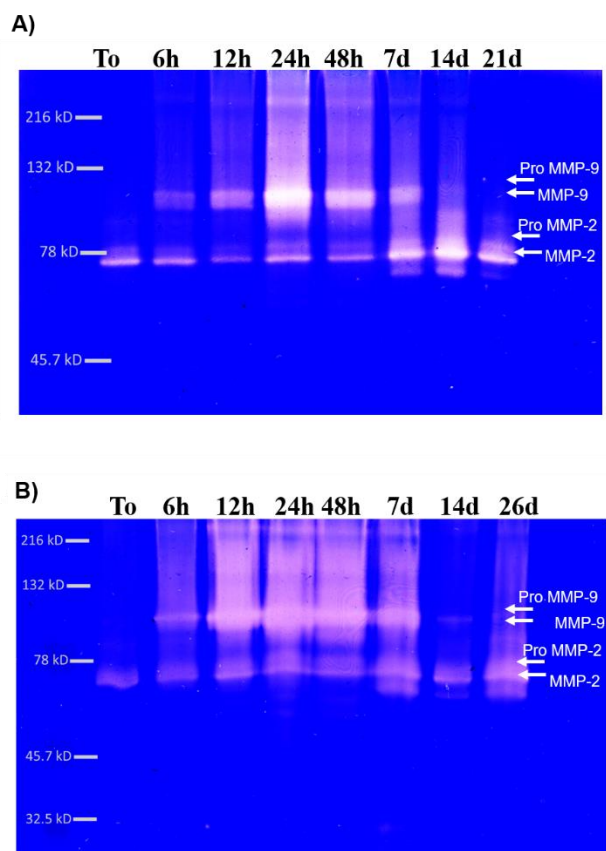


Figura 31. Zimogramas del tejido de la herida del A) grupo control y del B) grupo administrado con 15 ppm Cd vía tópica a los diferentes tiempos.

El análisis global de los zimogramas de las MMPs, tomando en cuenta todos los tiempos y tratamientos estudiados, brinda el panorama general del comportamiento de las gelatinasas a lo largo de la cicatrización. En los zimogramas de las figuras 30B y 31B podemos observar que los grupos administrados con 15 ppm de Cd por vía oral y tópica, la actividad de MMP-9 permanece durante tiempos más prolongados en comparación con el grupo de animales control,

mientras que MMP-2 prolonga su presencia hasta casi 7 días posteriores al tiempo final de la cicatrización en el grupo control.

Para analizar de una manera más adecuada el comportamiento de las gelatinasas se realizaron los estudios de zimografía por triplicado, y posteriormente las bandas de actividad de cada gelatinasa en los zimogramas se evaluó mediante el programa Image J.

Los resultados obtenidos para la Pro-MMP-9 en el grupo control (Figura 32A) mostraron dos puntos máximos, el primero tuvo lugar a las 24 horas, cuya fuente se le puede atribuir a los neutrófilos reclutados en el sitio de la lesión durante la fase de inflamación. El segundo punto máximo tuvo lugar a los 7 días, sin embargo, su liberación puede tener como origen a los fibroblastos presentes en la lesión, debemos recordar que la liberación de la forma inactiva de la MMP-9 depende de diferentes células a lo largo del desarrollo de las etapas del proceso de cicatrización.

Una vez que la Pro-MMP-9 se encuentra el sitio de la lesión, lo que sigue es su activación, como lo podemos observar en los resultados de la forma activa de la MMP-9 (Figura 32B) con un punto máximo de actividad a las 12 horas, que correspondería a la activación de la MMP-9 liberada por parte de los neutrófilos durante la inflamación.

En el caso de Pro MMP-2 y de MMP-2 (Figuras 32C y D), los animales control mostraron una máxima actividad a los 14 días para ambas formas de la MMP-2. La liberación de la Pro MMP-2 presente a lo largo de todo el proceso de cicatrización se debe a los fibroblastos residentes de la herida. Esta MMP es particularmente importante debido a que la resistencia de la cicatriz resultante depende de un correcto recambio de colágeno (22).

Los resultados de los 3 grupos administrados con Cd por vía oral (Figura 32), mostraron disminución en la actividad de la Pro-MMP-9 a las 24 horas (fase de inflamación) y a los 14 días (fase tardía de la proliferación y migración). Estas disminuciones pueden alterar la cicatrización de las heridas al inicio de la fase de remodelación. Sin embargo, la forma activa de MMP-9 no mostró diferencias entre los 3 grupos de animales expuestos a Cd y el grupo control en ninguno de los tiempos estudiados.

En el caso de la Pro-MMP-2, los 3 grupos de animales administrados por vía oral mostraron niveles disminuidos a los 7 y 14 días, especialmente en el grupo administrado con 15 ppm de Cd por vía oral, afectando la sustitución de colágeno. Resultados similares se observaron

para la forma activa de MMP-2, donde los 3 grupos de animales expuestos a Cd mostraron disminución de la actividad desde las 6 horas hasta los 14 días. Este resultado es particularmente importante porque una disminución de la forma activa durante gran parte del proceso de cicatrización afectaría el recambio de colágeno tipo III de la MEC.

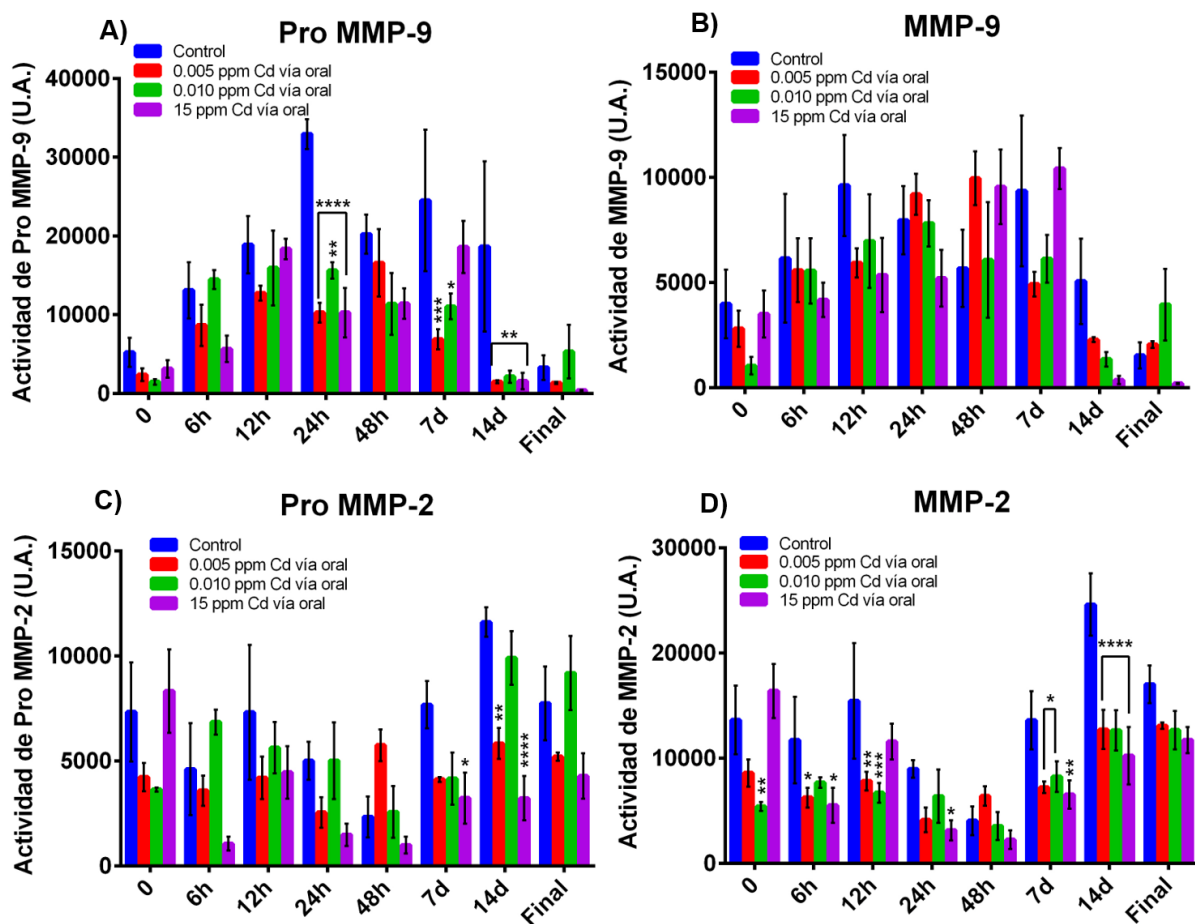


Figura 32. Densidad de las bandas correspondientes a la actividad enzimática de las formas A) Pro MMP-9, B) MMP-9 activa, C) Pro MMP-2 y D) MMP-2 activa en el grupo control y los administrados con Cd vía oral.

Para el caso de los grupos administrados por vía tópica (Figura 33A), también se observó una disminución de la actividad de Pro-MMP-9 en los 3 grupos a las 24 horas y a los 14 días, en cambio la forma activa de MMP-9 en el grupo expuesto a 15 ppm de Cd por vía tópica, mostró un aumento de actividad a las 12 horas. Lo anterior puede interpretarse como el aumento de la activación de la forma Pro, prolongando la fase inflamatoria hasta las 48 horas y afectando

la activación de la fase de proliferación. Tomando en cuenta las características de las heridas crónicas, se observa que el aumento de la forma activa de MMP-9 (Figura 33B) es una de ellas, y que la expresión de MMPs está dada por las vías de señalización de NF- κ B y Wnt (38), cuya activación se relaciona con el metabolismo de Zn y Ca durante la fase de inflamación.

Por otro lado, el análisis de la actividad de la Pro-MMP-2 (Figura 33C) en los 3 grupos de animales expuestos tópicamente a Cd no mostró diferencias significativas cuando se compararon con el grupo de animales control. No obstante, la forma activa de MMP-2 mostró un aumento a las 48 horas en el grupo de animales expuestos a 15 ppm de Cd por vía tópica, que posteriormente disminuyó a los 14 días, éste último dato nos hablaría de un daño durante el desarrollo de la fase de remodelación. Generalmente en las heridas crónicas se ha mencionado que los niveles de MMP-2 se encuentran elevados, sin embargo, en nuestro estudio encontramos lo opuesto, pero no se puede descartar la posibilidad de que la disminución de MMP-2 tenga efectos negativos sobre la fase de proliferación y remodelación debido al papel dual de las MMPs, como por ejemplo, se ha reportado que la CCL7, una quimiocina reclutadora de monocitos, se escinde al unirse al dominio hemopexina de MMP-2 impidiendo la unión de CCL7 a su receptor, CCR2 que está involucrado en la quimiotaxis de monocitos (123).

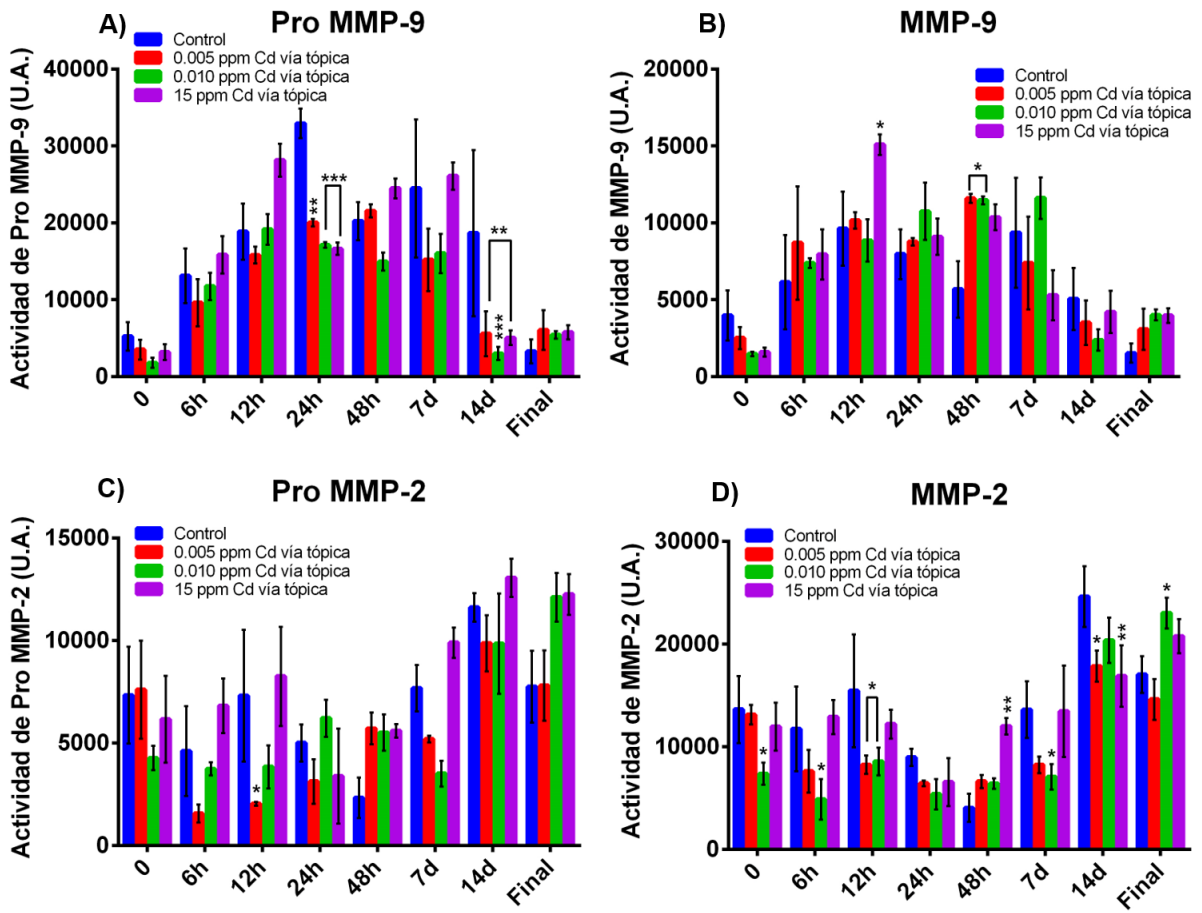


Figura 33. Densidad de las bandas correspondientes a la actividad enzimática de las formas A) Pro MMP-9, B) MMP-9 activa, C) Pro MMP-2 y D) MMP-2 activa en el grupo control y los administrados con Cd vía tópica.

Capítulo IV. Conclusión

El Cd administrado tanto por vía oral como tópica en ratas nude tiene efectos negativos en el proceso de cicatrización, así como en el tiempo requerido para completar el cierre de una herida, siendo más evidente a concentraciones mayores del metal (15 ppm de Cd).

La administración o exposición de Cd producen modificaciones en los niveles de Zn, Cu tisular durante la fase de inflamación y de Ca durante la fase tardía de proliferación durante el proceso de cicatrización.

Las heridas en los animales administrados o expuestos al metal presentaron modificaciones similares a los modelos de heridas crónicas, las cuales comparten características relacionadas a un aumento en la infiltración de células inflamatorias (PMN), disminución en la migración de células totipotenciales epidérmicas, engrosamiento, hiperproliferación y desorganización celular de la epidermis, dificultad para dar inicio a la fase de remodelación, así como un aumento en la actividad de MMP-9 y una disminución en la actividad de MMP-2.

Tomando en cuenta las similitudes que presentan nuestros modelos de estudio con los modelos de heridas crónicas y los resultados obtenidos, suponemos 3 mecanismos por los cuales la administración de Cd tiene efectos negativos en el proceso de cicatrización y que requieren estudios posteriores (Figura 33):

- 1) El Cd desplaza el Zn de las metaloproteínas, favoreciendo la presencia de niveles de Zn libre, afectando la señalización mediada por LPS/LTR4 (sensible a Zn), activando el factor NF- κ B que promueve la secreción de citocinas inflamatorias y de MMP-9 en neutrófilos durante la inflamación.
- 2) La disminución de Cu disminuye la función de factor transcripcional de Atox1 sobre la región sensible del promotor de HIF-1 α encargado de regular la expresión de VEGF.
- 3) El aumento de Ca promueve la activación de la señalización de β -catenina en las células totipotenciales de la epidermis permitiendo la proliferación celular.

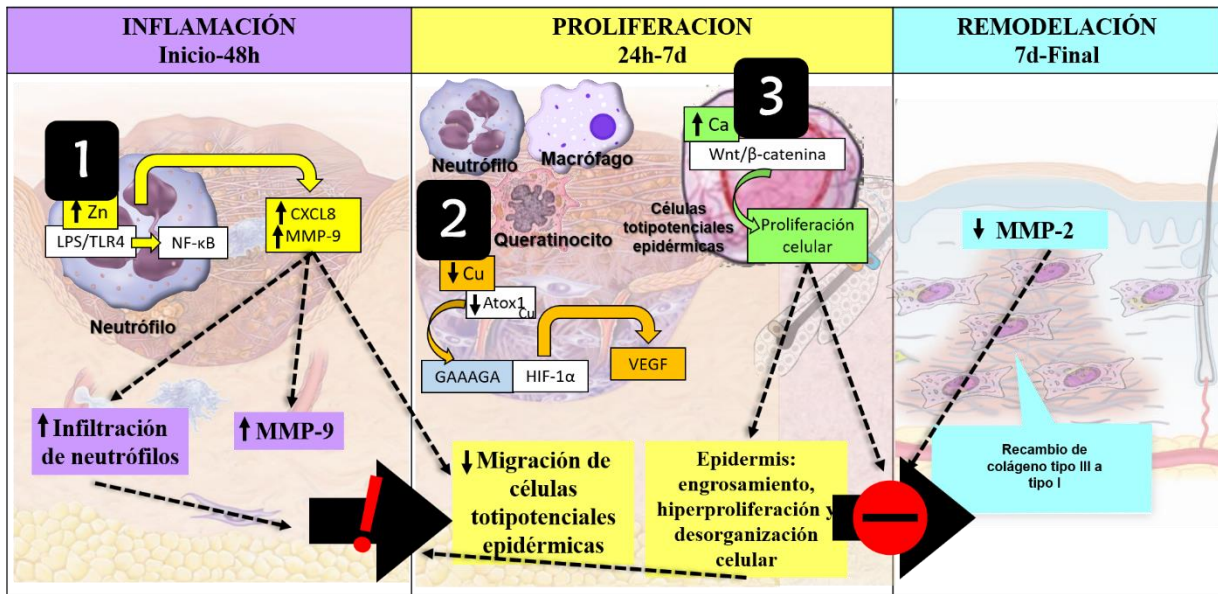


Figura 34. Mecanismos propuestos por los cuales la administración de Cd causa la formación de heridas con un comportamiento similar a las heridas crónicas durante el proceso de cicatrización.

Bibliografía

- (1) Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, JM. The skin: an indispensable barrier. *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* **2008**, *17*, 1063-1072.
- (2) Winslow, T. National Cancer Institute. <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7287> (Acceso 3 febrero 2020).
- (3) Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histología Básica*. 12ª edición. Buenos Aires, **2015**
- (4) Lumen Anatomy and Physiology I. <https://courses.lumenlearning.com/cuny-csi-ap-1/chapter/organ-level-skin-epidermis-and-dermis/> (Acceso 3 febrero 2020) Organ Level-Skin (Epidermis and Dermis).
- (5) Nowak, J. A.; Polak, L.; Pasolli, H. A.; Fuchs, E. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell stem cell.* **2008**, *3*, 33-43.
- (6) Harvey, C. Orthopaedic Nursing. *Wound Healing.* **2005**, *24*, 143-157.
- (7) Tortora, G.; Derrickson, B.; *Principios de Anatomía y Fisiología*. 13ª edición. Buenos aires, **2013**.
- (8) Mosesson, M. W.; Siebenlist, K. R.; Meh, D. A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *936*, 11-30.
- (9) Gonzalez, A. C.; Costa, T. F.; Andrade, Z.; Medrado, A. (2016). Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91*(5), 614-620.
- (10) Eming, S. A.; Martin, P.; Tomic-Canic, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 265.
- (11) Schultz, G.S.; Chin, G.A.; Moldawer, L.; et al. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [Online]; Fitridge, R.; Thompson, M. 23 Principles of Wound Healing. Adelaide. **2011**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534261/> (Acceso 3 febrero 2020).
- (12) Kanji, S.; Das, H. Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. *Mediators Inflammation.* **2017**, 5217967.
- (13) Adam, J.; Singer, M.D.; Richard, A.F.; Clark, M.D. Cutaneous Wound Healing. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 738-746.
- (14) Singer, A. J.; Clark, R. A. Cutaneous Wound Healing, *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 738-746.
- (15) Rochat, A.; Kobayashi, K.; Barrandon, Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell.* **1994**, *76*, 1063-1073.
- (16) Alonso, L.; Fuchs, E. The hair cycle. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 391-393.
- (17) Taylor, G.; Lehrer, M. S.; Jensen, P. J.; Sun, T. T.; Lavker, R. M. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.* **2000**, *102*, 451-461.
- (18) Mikako, S.; Riichiro, A.; Yasuyuki, F.; Satomi, A.; Daisuke, I.; Hiroshi, S. Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. *Int. J. Immunol.* **2008**, *180*, 2581-2587.
- (19) Zawacki B. E.; Jones R. J. Standard depth burns in the rat: the importance of the hair growth cycle. *Br. J. Plast. Surg.* **1967**, *20*, 347-354.

- (20) Ceradini, D.J.; Kulkarni, A.R.; Callaghan, M.J.; Tepper, O.M.; Bastidas, N.; Kleinman, M.E.; Capla, J.M.; Galiano, R.D.; Levine, J.P.; Gurtner, G.C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 858-864.
- (21) Rognoni, E.; Watt, F. M. Skin Cell Heterogeneity in Development, Wound Healing, and Cancer. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 709-722.
- (22) Gurtner, G. C.; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature*, **2008**, *453*, 314-321.
- (23) Sun, B.K.; Siplashvili, Z.; Khavari, P.A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science.* **2014**, *346*, 941-945.
- (24) Guo, S.; Dipietro, L. A. Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 219-229.
- (25) Anderson, K.; Hamm, R. L. Factors That Impair Wound Healing. *J. Amer. College Clin. Wound Specialists.* **2014**, *4*, 84-91.
- (26) Razzaghi, R.; Pidar, F.; Momen-Heravi, M.; Bahmani, F.; Akbari, H.; Asemi, Z. Magnesium supplementation and the effects on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biol. Trace. Elem. Res.* **2018**, *181*, 207-215.
- (27) Lansdown, A. B. Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions. *Crit. Rev. Toxicol.* **1995**, *25*, 397-462.
- (28) Cogger, V.; Million, N.; Rehbock, C.; Sures, B.; Nachev, M.; Barcikowski, S.; Wistuba, N.; Strau, S.; Vogt, P.M. Tissue Concentrations of Zinc, Iron, Copper, and Magnesium During the Phases of Full Thickness Wound Healing in a Rodent Model. *Biol Trace Elem Res.* **2019**, *191*, 167-176.
- (29) Lansdown, A. B.; Sampson, B.; Rowe, A. M. Sequential changes in trace metal, metallothionein and calmodulin concentrations in healing skin wounds. *J. Anat.* **1999**, *195*, 375-386.
- (30) Karecla, P.I.; Timpl, R.; Watt, F.M. Adhesion of human epidermal keratinocytes to laminin. *Cell. Adhes. Commun.* **2009**, *2*, 309-318.
- (31) Philips, N.; Hwang, H.; Chauhan, S.; Leonardi, D.; Gonzalez, S. Stimulation of cell proliferation and expression of matrixmetalloproteinase-1 and interleukin-8 genes in dermal fibroblasts by copper. *Connect Tissue Res.* **2010**, *51*, 224-229.
- (32) Lansdown, A. B. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen.* **2002**, *10*, 271-285.
- (33) Lin, P. H.; Sermersheim, M.; Li, H.; Lee, P.; Steinberg, S. M.; Ma, J. Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*, **2017**, *10*, 16.
- (34) Gupta, M.; Mahajan, V. K.; Mehta, K.S.; Chauhan, P.S. Zinc therapy in dermatology: A review. *Dermatol. Res. Pract.* **2014**, *2014*.
- (35) Lansdown, A.B.; Mirastschijski, U.; Stubbs, N.; Scanlon, E.; Agren, M. S. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair Regen.* **2007**, *15*, 2-16.
- (36) Kogan, S.; Sood, A.; Granick, M. S. Zinc and Wound Healing: A Review of Zinc Physiology and Clinical Applications. *Wounds.* **2017**, *29*, 102-106.

- (37) Cui, N.; Hu, M.; Khalil, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2017**, *147*, 1-73.
- (38) Caley, M. P.; Martins, V. L.; O'Toole, E. A. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv. Wound Care*, **2015**, *4*, 225-234.
- (39) Welgus, H.G.; Campbell, E.J.; Cury, J.D.; Eisen, A.Z.; Senior, R.M.; Wilhelm, S.M.; Goldberg, G.I. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J. Clin. Invest.* **1991**, *86*, 1496-1502.
- (40) Karelina, T.V.; Hruza, G.J.; Goldberg, G.I.; Eisen, A.Z. Localization of 92 kDa type IV collagenase in human skin tumors. Comparison with normal human fetal and adult skin. *J. Invest. Dermatol.* **1993**, *100*, 159-165.
- (41) Weeks, B.S.; Schnaper, H.W.; Handy, M.; Holloway, E.; Kleinman, H.K. Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase (gelatinase B). *J. Cell. Physiol.* **1993**, *157*, 644-649.
- (42) Opdenakker, G.; Van den Steen, P.E.; Dubois, B.; Nelissen, I.; Van Coillie, E.; Masure, S.; Proost, P.; Van Damme, J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukocyte Biol.* **2001**, *69*, 851-859.
- (43) Eisen, A. Z. Sarkar, S. K.; Neuman, K. C.; Goldberg, G. I. *Handbook of Proteolytic Enzymes* [Online] Rawlings, N. D.; Salvesen, G. 157 Matrix Metallopeptidase 9/Gelatinase B. Europa. **2013**. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00157-5> (Acceso 3 febrero 2020).
- (44) Isani, G.; y Carpenè, E. Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules*, **2014**, *4*, 435-457.
- (45) Lansdown, A. B. Metallothioneins: potential therapeutic aids for wound healing in the skin. *Wound Repair Regen.* **2002**, *10*, 130-132.
- (46) Carpenè, E.; Andreani, G.; Isani, G. Metallothionein functions and structural characteristics. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2007**, *21*, 35-39.
- (47) Ruttkay-Nedecky, B.; Nejdl, L.; Gumulec, J.; Zitka, O.; Masarik, M.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Adam, V.; Kizek, R. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6044-6066.
- (48) Waalkes, M. P.; Goering, P. L. Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*, 281-288.
- (49) Vašák, M. Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2005**, *19*, 13-17.
- (50) Clarkson, T. W.; Magos, L.; Myers, G. J. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1731-1737.
- (51) Bellinger, L.; Bolger, M.; Goyer, R.; Barraj, L.; Baines, J. *Who Food Additives Series 46: Cadmium*. [Online] http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46je11.htm#_46116000 (Acceso 2 abril 2020).
- (52) Patrick, L. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. *Altern. Med. Rev.* **2002**, *7*, 456-471.

- (53) Wang, B.; Shao, C.; Li, Y.; Tan, Y.; Cai, L. Cadmium and its epigenetic effects. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 2611-2620.
- (54) Olszowski, T.; Baranowska-Bosiacka, I.; Gutowska, I.; Chlubek, D. Pro-inflammatory properties of cadmium. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59*, 475-482.
- (55) Abdulla, M.; Chmielnicka, J. New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals. *Biol. Trace Elem. Res.* **1989**, *23*, 25-53.
- (56) Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1161-1208.
- (57) Treviño, S.; Andrade-García, A.; Herrera Camacho, I.; Leon-Chavez, A.; Aguilar-Alonso, P.; Flores, G.; Brambila, E. Chronic Cadmium Exposure Lead to Inhibition of Serum and Hepatic Alkaline Phosphatase Activity in Wistar Rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2015**, *29*, 587-594.
- (58) Qin, W.; Bazeille, N.; Henry, E.; Zhang, B.; Deprez, E.; Xi, X. G. Mechanistic insight into cadmium-induced inactivation of the Bloom protein. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 26225.
- (59) Malgieri, G.; Palmieri, M.; Esposito, S.; Maione, V.; Russo, L.; Baglivo, I.; de Paola, I.; Milardi, D.; Diana, D.; Zaccaro, L.; Pedone, P. V.; Fattorusso, R.; Isernia C. Zinc to cadmium replacement in the prokaryotic zinc-finger domain. *Metallomics.* **2014**, *6*, 96-104.
- (60) Malgieri, G.; Zaccaro, L.; Leone, M.; Bucci, E.; Esposito, S.; Baglivo, I.; Del Gatto, A.; Russo, L.; Scandurra, R.; Pedone, P.V.; Fattorusso, R.; Isernia, C. Zinc to cadmium replacement in the *A. thaliana* SUP37 Cys₂His₂ zinc finger induces structural rearrangements of typical DNA base determinant positions. *Biopolymers.* **2011**, *95*, 801-810.
- (61) Pabis, K.; Gundacker, C.; Giacconi, R.; Basso, A.; Costarelli, L.; Piacenza, F.; Strizzi, S.; Provincialo, M.; Malavolta, M. Zinc supplementation can reduce accumulation of cadmium on aged metallothionein transgenic mice. *Chemosphere.* **2018**, *211*, 855-860.
- (62) Lansdown, A. B.; Sampson, B.; Rowe, A. Experimental observations in the rat on the influence of cadmium on skin wound repair. *Int. J. Exp. Pathol.* **2001**, *82*, 35-41.
- (63) Capaldo, A.; Gay, F.; Scudiero, R.; Trinchella, F.; Caputo, I.; Lepretti, M.; Marabotti, A.; Esposito, C.; Laforgia, V. Histological changes, apoptosis and metallothionein levels in *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela) exposed to environmental cadmium concentrations. *Aquat. Toxicol.* **2016**, *173*, 63-73.
- (64) Tucovic, D.; Aleksandrov, A. P.; Mirkov, I.; Ninkov, M.; Kulas, J.; Zolotarevski, L.; Vukojevic, V.; Mutic, J.; Tatalovic, N.; Kataranovski, M. Oral cadmium exposure affects skin immune reactivity in rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *164*, 12-20.
- (65) Mei, H.; Yao, P.; Wang, S.; Li, N.; Zhu, T.; Chen, X.; Yang, M.; Zhuo, S.; Chen, S.; Wang, J. M.; Wang, H.; Xie, D.; Wu, Y.; Le, Y. Chronic Low-Dose Cadmium Exposure Impairs Cutaneous Wound Healing With Defective Early Inflammatory Responses After Skin Injury. *Toxicol. Sci.* **2017**, *159*, 327-338.
- (66) Lacorte, L. M.; Rinaldi, J. C.; Justulin, L. A.; Delella, F. D.; Moroz, A.; Felisbino, S. L. Cadmium exposure inhibits MMP2 and MMP9 activities in the prostate and testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *457*, 538-541.

- (67) NOM-127-SSA1-1994, "SALUD AMBIENTAL, AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO-LIMITES PERMISIBLES DE CALIDAD Y TRATAMIENTOS A QUE DEBE SOMETERSE EL AGUA PARA SU POTABILIZACION". <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html> (Acceso 3 febrero 2020).
- (68) NOM-118-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MATERIAS PRIMAS PARA ALIMENTOS, PRODUCTOS DE PERFUMERÍA Y BELLEZA. COLORANTES Y PIGMENTOS INORGÁNICOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/118ssa14.html> (Acceso 3 febrero 2020).
- (69) Zhao, D.; Wang, T.; Nahan, K.; Guo, X.; Zhang, Z.; Dong, Z.; Chen, S.; Chou, D. T.; Hong, D.; Kumta, P. N.; Heineman, W. R. In vivo characterization of magnesium alloy biodegradation using electrochemical H₂ monitoring, ICP-MS, and XPS. *Acta Biomater.* **2017**, *50*, 556-565.
- (70) Abbas, O.; Richards, J. E.; Yaar, R.; Mahalingam, M. Stem cell markers (cytokeratin 15, cytokeratin 19 and p63) in *in situ* and invasive cutaneous epithelial lesions. *Mod. Pathol.* **2011**, *24*, 90-97.
- (71) Michel, M.; Török, N.; Godbout, M. J.; Lussier, M.; Gaudreau, P.; Royal, A.; Germain, L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J. Cell Sci.* **1996**, *109*, 1017-1028.
- (72) Abcam [Online] <https://www.abcam.com/protocols/gelatin-zymography-protocol> (Acceso 3 febrero 2020).
- (73) Clark, I. M. *Methods in Molecular Biology, vol. 151: Matrix Metalloproteinase Protocols*. Humana Press Inc. Totowa. **2001**.
- (74) Lane, E. A.; Canty, M. J.; More, S. J. Cadmium exposure and consequence for the health and productivity of farmed ruminants. *Res. Vet. Sci.* **2015**, *101*, 132-139.
- (75) Ogawa, Y.; Kinoshita, M.; Shimada, S.; Kawamura, T. Zinc and Skin Disorders. *Nutrients*, **2018**, *10*, 199.
- (76) Prasad, A. S. Zinc is an antioxidant and anti-inflammatory agent: its role in human health. *Front. Nutr.* **2014**, *1*, 14.
- (77) Tabruyn, S.P.; Griffioen, A.W. A new role for NF-kappaB in angiogenesis inhibition. *Cell Death Differ.* **2007**, *14*, 1393-1397.
- (78) Haase, H.; Ober-Blobaum, J.L.; Engelhardt, G.; Hebel, S.; Heit, A.; Heine, H.; Rink, L. Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 6491-6502.
- (79) Ambrozova, N.; Ulrichova, J.; Galandakova, A. Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF-κB. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* **2017**, *161*, 1-13.
- (80) Liu, M.J.; Bao, S.; Galvez-Peralta, M.; Pyle, C.J.; Rudawsky, A.C.; Pavlovicz, R.E.; Killilea, D.W.; Li, C.; Nebert, D.W.; Wewers, M.D.; Knoell, D. L. ZIP8 regulates host defense through zinc-mediated inhibition of NF-kappaB. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 386-400.

- (81) Lutsenko, S.; Barnes, N. L.; Bartee, M. Y.; Dmitriev, O. Y. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev.* **2007**, *87*, 1011-1046.
- (82) Fukai, T.; Ushio-Fukai, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15*, 1583-1606.
- (83) Lu, P.; Takai, K.; Weaver, V. M.; Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **2011**, *3*.
- (84) Das, A.; Sudhahar, V.; Chen, G. F.; Kim, H. W.; Youn, S. W.; Finney, L.; Vogt, S.; Yang, J.; Kweon, J.; Surenkhuu, B.; Ushio-Fukai, M.; Fukai, T. Endothelial antioxidant-1: a key mediator of copper-dependent wound healing in vivo. *Scientific reports.* **2016**, *6*, 33783.
- (85) Navarro-Requena, C.; Pérez-Amodio, S.; Castaño, O.; Engel, E. Wound healing-promoting effects stimulated by extracellular calcium and calcium-releasing nanoparticles on dermal fibroblasts. *Nanotechnology.* **2018**, *29*.
- (86) Oda, Y.; Tu, C. L.; Menendez, A.; Nguyen, T.; Bikle, D. D. Vitamin D and calcium regulation of epidermal wound healing. *J. Steroid Biochem.* **2016**, *164*, 379-385.
- (87) Lange, T.S.; Bielinsky, A.K.; Kirchberg, K.; Bank, I.; Herrmann, K.; Krieg, T. Mg²⁺ and Ca²⁺ differentially regulate beta 1 integrin-mediated adhesion of dermal fibroblasts and keratinocytes to various extracellular matrix proteins. *Exp. Cell Res.* **1994**, *214*, 381-388.
- (88) Wayne, K. A study of the effect of magnesium hydroxide on the wound healing process in rats. *Am. J. Surg.* **1998**, *176*, 26-38.
- (89) Banai, S.; Haggroth, L.; Epstein, S. E.; Casscells, W. Influence of extracellular magnesium on capillary endothelial cell proliferation and migration. *Circ. Res.* **1990**, *63*, 645-650.
- (90) Krzyszczyk, P.; Schloss, R.; Palmer, A.; Berthiaume, F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 419.
- (91) Sindrilaru, A.; Peters, T.; Wieschalka, S.; Baican, C.; Baican, A.; Peter, H.; Hainzl, A.; Schatz, S.; Qi, Y.; Schlecht, A.; Weiss, J. M.; Wlaschek, M.; Sunderkötter, C.; Scharffetter-Kochanek, K. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 985-997.
- (92) Barrientos, S.; Stojadinovic, O.; Golinko, M. S.; Brem, H.; Tomic-Canic, M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 585-601.
- (93) Tarnuzzer, R.W.; Schultz, G.S. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen.* **1996**, *4*, 321-325.
- (94) Edwards, R.; Harding, K.G. Bacteria and wound healing. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2004**, *17*, 91-96.
- (95) Eming, S. A.; Martin, P.; Tomic-Canic, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 265.
- (96) Vincent, A. M.; Russell, J. W.; Low, P.; Feldman, E. L. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr. Rev.* **2004**, *25*, 612-628.

- (97) Sibbald, R.G.; Woo, K.Y. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2008**, *24*, 25-30.
- (98) Chan, L. K.; Withey, S.; Butler, P. E. Smoking and wound healing problems in reduction mammoplasty: is the introduction of urine nicotine testing justified? *Ann. Plast. Surg.* **2006**, *56*, 111-115.
- (99) Ahn, C.; Mulligan, P.; Salcido, R. S. Smoking the bane of wound healing: biomedical interventions and social influences. *Adv. Skin Wound Care.* **2008**, *21*, 227-238.
- (100) McMaster, S.K.; Paul-Clark, M. J.; Walters, M.; Fleet, M.; Anandarajah, J.; Sriskandan, S.; Mitchell J. A. Cigarette smoke inhibits macrophage sensing of Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide: relative roles of nicotine and oxidant stress. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 536-543.
- (101) Sorensen, L. T.; Karlsmark, T.; Gottrup, F. Abstinence from smoking reduces incisional wound infection: a randomized controlled trial. *Ann. Surg.* **2003**, *238*, 1-5.
- (102) Nuschke, A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis.* **2014**, *10*, 29-37.
- (103) Ellis, S.; Lin, E. J.; Tartar, D. Immunology of Wound Healing. *Curr. Dermatol. Rep.* **2018**, *7*, 350-358.
- (104) Calvi, E. N.; Nahas, F. X.; Barbosa, M. V.; Calil, J. A.; Ihara, S. S.; Silva, S.; Franco, M. F.; Ferreira, L. M. An experimental model for the study of collagen fibers in skeletal muscle. *Acta Cir. Bras.* **2012**, *27*, 681-686.
- (105) Gay, S.; Vijanto, J.; Raekallio, J.; Penttinen, R. Collagen types in early phases of wound healing in children. *Acta Chir. Scand.* **1978**, *144*, 205-211.
- (106) Pittman, K.; Kubes, P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J. Innate Immun.* **2013**, *5*, 315-323.
- (107) Baggiolini, M.; Loetscher, P.; Moser, B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int. J. Immunopharmacol.* **1995**, *17*, 103-108.
- (108) Martins-Green, M.; Petreaca, M.; Wang, L. Chemokines and their receptors are key players in the orchestra that regulates wound healing. *Adv. Wound Care.* **2013**, *2*, 327-347.
- (109) McDonald, B.; Pittman, K.; Menezes, G. B.; Hirota, S. A.; Slaba, I.; Waterhouse, C. C. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* **2010**, *330*, 362-366.
- (110) Kovtun, A.; Messerer, D.; Scharffetter-Kochanek, K.; Huber-Lang, M.; Ignatius, A. Neutrophils in Tissue Trauma of the Skin, Bone, and Lung: Two Sides of the Same Coin. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 8173983.
- (111) Simpson, D. M.; Ross, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J. Clin. Invest.* **1972**, *51*, 2009-2023.
- (112) Gong, Y.; Koh, D. R. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an *in vivo* corneal model. *Cell Tissue Res.* **2010**, *339*, 437-448.
- (113) Ardi, V. C.; Kupriyanova, T. A.; Deryugina, E. I.; Quigley, J. P. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 20262-20267.

- (114) Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Konowal, A.; Freed, P. W.; Westcott, J. Y.; Henson, P. M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 890-898.
- (115) Koh, T. J.; DiPietro, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.* **2011**, 13-23.
- (116) Hughes, J.; Johnson, R. J.; Mooney, A.; Hugo, C.; Gordon, K.; Savill, J. Neutrophil fate in experimental glomerular capillary injury in the rat. *Am. J. Pathol.* **1997**, *150*, 223-234.
- (117) Wetzler, C.; Kämpfer, H.; Stallmeyer, B.; Pfeilschifter, J.; Frank, S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115*, 245-253.
- (118) Foster, M.; Samman, S. Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease. *Nutrients.* **2012**, *4*, 676-694.
- (119) Lau, K.; Paus, R.; Tiede, S.; Day, P.; Bayat, A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol.* **2009**, *18*, 921-933.
- (120) Bose, A.; Teh, M. T.; Mackenzie, I. C.; Waseem, A. Keratin k15 as a biomarker of epidermal stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 19385-19398.
- (121) Koshikawa, N.; Giannelli, G.; Cirulli, V.; Miyazaki, K.; Quaranta, V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J. Cell Biol.* **2000**, *148*, 615-624.
- (122) Uccioli, L.; Izzo, V.; Meloni, M.; Vainieri, E.; Ruotolo, V.; Giurato, L. Non-healing foot ulcers in diabetic patients: general and local interfering conditions and management options with advanced wound dressings. *J. Wound Care.* **2014**, *24*, 35-42.
- (123) Westermann, D.; Savvatis, K.; Lindner, D.; Zietsch, C.; Becher, P. M.; Hammer, E.; Heimesaat, M. M.; Bereswill, S.; Völker, U.; Escher, F.; Riad, A.; Plendl, J.; Klingel, K.; Poller, W.; Schultheiss, H. P.; Tschöpe, C. Reduced degradation of the chemokine MCP-3 by matrix metalloproteinase-2 exacerbates myocardial inflammation in experimental viral cardiomyopathy. *Circulation.* **2011**, *124*, 2082-2093.

Anexos

Anexo 1

Tinción de Hematoxilina Eosina

1. Hematoxilina por 30 min
2. Enjuagar con agua corriente hasta retirar el colorante
3. Alcohol ácido, una inmersión
4. Enjuagar con agua corriente
5. Carbonato de litio al 1% (Hasta el vire)
6. Enjuagar con agua corriente
7. Eosina por 10 segundos
8. Enjuagar con agua corriente hasta retirar el colorante

Tinción tricrómica de Masson

1. Líquido de Boiun toda la noche a temperatura ambiente
2. Enjuagar con agua corriente hasta retirar el color amarillo
3. Enjuagar con agua destilada
4. Hematoxilina de Weigert por 10 min
5. Enjuagar con agua destilada por 5 minutos
6. Fucsina ácida/Escarlata de Biebrich por 15 minutos
7. Enjuagar con agua corriente hasta retirar el colorante
8. Enjuagar con agua destilada
9. Ácido fosfomolibdico/fosfotungstico por 15 minutos
10. Azul de anilina por 5 minutos
11. Enjuagar con agua destilada
12. Ácido acético al 1% por 1 minuto

Mieloperoxidasa

1. Solución de Diaminobencidina/peróxido por 2 minutos
2. Enjuagar con agua desionizada por 30 segundos

3. Solución de nitrato de cobre por 2 minutos
4. Enjuagar con agua desionizada por 30 segundos
5. Solución de Hematoxilina Gill No. 3 por 8 segundos
6. Enjuagar en 2 cambio de agua desionizada por 5 segundos
7. Solución Scott por 12 segundos
8. Aclar en 2 cambio de agua desionizada por 5 segundos
9. Solución de Gill modificada EA por 1 minuto

Anexo 2

Determinación de proteínas totales (Lowry y col.)

Reactivos:

- Albúmina bovina
- Reactivo de FOLIN
- Tartrato de sodio-potasio
- Sulfato de cobre
- Carbonato de sodio
- Hidróxido de sodio

Solución 1: Solución patrón de albúmina bovina 1.0 mg/ml.

Solución 2: Reactivo de FOLIN diluido 1:2 en agua destilada.

Solución 3: Solución alcalina.

A. Solución de tartrato sodio-potasio al 2% 1 ml.

B. Solución de sulfato de cobre al 1% 1 ml.

Diluir las soluciones A y B con una solución de carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N y llevar a un volumen final de 100 ml.

Elaboración de curva de calibración

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	Blanco
Solución 1	15 µl	30 µl	60 µl	120 µl	210 µl	300 µl	450 µl	-
Agua destilada	585 µl	570 µl	540 µl	480 µl	390 µl	300 µl	150 µl	600 µl
NaOH 0.1 N	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Solución 3	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml

Dejar en reposo y en oscuridad por 10 min.

Agregar 600 µl de la solución 2 en cada tubo, mezclar e incubar por 30 min. a 37° C.

Leer la absorbancia de las muestras a 500 nm contra el blanco de reactivo.

La concentración final de las muestras problema se obtiene por interpolación en la curva de calibración.

Anexo 3

Reactivos y buffer utilizados en zimografía

Reactivos:

1. Ácido acético glacial
2. Ácido clorhídrico
3. Acrilamida
4. Agua destilada para todos los buffers y soluciones
5. Azul de bromofenol
6. Bisacrilamida (N,N'-metilenebisacrilamida)
7. Cloruro de calcio
8. Coomassie Brilliant Blue R-250
9. Gelatina-Tipo A, de piel porcina, bloom, 175 (Sigma)
10. Glicerol
11. Glicina
12. Marcador de peso molecular (Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, Cat. 161-0324))
13. Metanol
14. Persulfato de amonio (APS)
15. SDS (duodecil sulfato de sodio)
16. TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina)
17. Tris [tris(hidroximetil)aminometano]
18. Triton X-100

Buffers:

1. Solución de acrilamida (Concentración total del monómero 30%)
 - 29.2% acrilamida
 - 0.8% bisacrilamida
2. Buffer de muestra 2X (Laemmli)
 - 125 mM Tris HCl, pH 6.8

- 4% SDS
 - 20% glicerol
 - 0.04% azul de bromofenol
3. Buffer de corrimiento 5X electrode, pH 8.3
- Tris 15 g/l
 - Glicina 72 g/l
 - SDS 5 g/l
- Diluir 60 ml de 5X electrode con 240 ml de agua destilada.
4. Buffer de lavado
- 2.5% Triton X-100
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 5 mM CaCl₂
5. Buffer de incubación
- 1% Triton X-100
 - Tris HCl 50 mM, pH 7.5
 - 5 mM CaCl₂
6. Buffer de tinción
- Metanol 40%
 - Ácido acético 10%
 - Agua destilada 50%
 - Coomassie blue R-250 0.1%
7. Solución de destinción
- Metanol 40%
 - Ácido acético 10%
 - Agua destilada 50%