

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TÁLLERI”



“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE PÉPTIDOS DE COLÁGENO DE ANCHOVETA SOBRE EL MECANISMO DE CICATRIZACIÓN TISULAR EN ANIMALES OVARIECTOMIZADOS”

Paola Stephanie Olavegoya Espichán

Tesis para Optar el Título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Asesora: Dra. Cynthia Gonzales Castañeda

Lima-Perú

2017

Índice

RESUMEN	4
ABSTRACT.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. MARCO TEORICO	10
Problema de investigación	19
Justificación.....	20
III. HIPOTESIS.....	21
IV. OBJETIVO GENERAL	22
Objetivos específicos	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Animales.....	23
5.2 Ovariectomía.....	25
5.3 Realización de laceraciones cutáneas.....	25
5.3.1 Incisión	26
5.3.2 Escisión.....	26
5.4 Tratamientos.....	27
5.4.1 Péptidos de colágeno de anchoveta	27
5.4.2 Estradiol	28
5.5 Administración de tratamientos.....	29
5.6 Evaluación macroscópica... ..	29
5.6.1 Medición macroscópica de incisiones	29
5.6.2 Medición macroscópica de escisiones.....	30
5.7 Recolección de muestras	30
5.8 Análisis histológico.....	32
5.8.1 Procesamiento de muestras... ..	32
5.8.2 Tinción de muestras... ..	32
5.8.3 Análisis de grosor de herida.....	32
5.8.4 Análisis de hiperplasia epidérmica.....	33
5.8.5 Análisis del patrón inflamatorio.....	33
5.8.6 Análisis de la orientación de las fibras de colágeno	34
5.9 Medición de niveles de Hidroxiprolina... ..	34
5.9.1 Procedimiento.....	34

5.9.2	Desarrollo de color y medida.....	34
5.9.3	Curva de calibració.....	35
5.9.4	Método de cálculo y formula.....	35
5.10	Análisis estadístico.....	36
VI.	RESULTADOS.....	37
6.1	Análisis macroscópico de incisiones	37
6.2	Análisis microscópico de incisiones	41
6.3	Análisis macroscópico de escisiones.....	50
6.4	Análisis microscópico de escisiones.....	53
6.5	Orientación de fibras de colágeno.....	63
6.6	Contenido de hidroxiprolina	67
VII.	DISCUSIÓN	69
VIII.	CONCLUSIONES.....	76
IX.	RECOMENDACIONES.....	76
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

Resumen

La reparación tisular cutánea es una respuesta compleja ante una lesión y consta de 3 fases: inflamación, proliferación y remodelación. El estrógeno, principal hormona circulante femenina, tienen un gran efecto sobre la reparación tisular cutánea, debido a que modula la respuesta inflamatoria, acelera la reepitelización, inducen la formación del tejido granuloso y modifican la proteólisis, por lo cual la falta de estrógenos, que se da en las mujeres posmenopáusicas, se considera responsable de una mala cicatrización tisular. La terapia de reemplazo de hormonas conlleva una serie de efectos indeseables, si bien los beneficios suelen superar los riesgos, los resultados no son regulares, y el tratamiento no es recomendable para mujeres mayores a los 60 años.

Varias investigaciones realizadas en los últimos años se han enfocado en la producción de péptidos funcionales de colágeno para uso oral. Queda determinar si el uso de péptidos hidrolizados de colágeno, posee un efecto sobre la reparación tisular. Por esta razón, el objetivo de este estudio es determinar el efecto de la administración oral de péptidos hidrolizados de colágeno de escamas de anchoveta sobre diferentes parámetros de la reparación tisular en un modelo de ratas hembras ovariectomizadas.

Para este estudio se utilizaron 96 ratas hembras de 12 semanas de edad de la cepa Holtzman. Las ratas se distribuyeron aleatoriamente en 8 grupos, 2 SHAM, 2 controles ovariectomizados y 4 ovariectomizados tratados con estradiol, y 3 diferentes dosis de péptidos hidrolizados de colágeno (OVX+PC1, OVX+PC2, y OVX+PC3). Se realizaron dos tipos de laceraciones (incisión y escisión) para evaluar la cicatrización tisular. Se tomaron fotos los días 0, 3, 5, 7, 10 y 14 post-laceración para realizar un análisis macroscópico; después de 7 u 14 días los animales fueron sacrificados y se recolectó la piel del área dorsal para los análisis histológicos y proteicos.

El estudio demostró que la administración oral de péptidos hidrolizados de colágeno aceleró la reparación tisular en ratas hembras ovariectomizadas, disminuyó la inflamación, mejoró la deposición y organización de fibras de colágeno, así como se dio un aumento de las mismas dándole una mayor fuerza al cierre de herida. Por otro lado, se demostró que

para el tratamiento de incisiones la mejor dosis fue de 4000 mg.kg^{-1} de péptidos hidrolizados de colágeno (OVX+PC3) mientras que para el modelo de escisión fueron los tratamientos con 2000 mg.kg^{-1} y 4000 mg.kg^{-1} de péptidos hidrolizados de colágeno (OVX+PC2 y OVX+PC3). Estos tratamientos fueron incluso mejores que el uso de estrógeno, mostrando un patrón de reparación similar al SHAM.

En conclusión, el uso oral de péptidos hidrolizados de colágeno resulta ser un tratamiento beneficioso para la reparación tisular en un modelo de ovariectomía.

Abstract

Cutaneous wound healing is a complex response to injury and consists of 3 phases: inflammation, proliferation and remodeling. Estrogens, the main female circulating hormone, have a great effect on cutaneous tissue repair, because they modulate the inflammatory response, accelerate re-epithelialization, induce the formation of granular tissue and modify the proteolysis, so the lack of estrogen, which occurs in postmenopausal women, is considered responsible for poor tissue healing. Hormone replacement therapy carries a number of undesirable effects, although the benefits often outweigh the risks, the results are not regular, and treatment is not recommended for women over 60.

Several investigations carried out in recent years have focused on the production of functional collagen peptides for oral use. It remains to be determined whether the use of hydrolyzed collagen peptides of anchovy has an effect on tissue repair. For this reason, the aim of this study is to determine the effect of oral administration of hydrolyzed collagen peptides from anchovy scales on different parameters of tissue repair in a model of ovariectomized female rats.

For this study 96-week-old female rats of the Holtzman strain were used. Rats were randomly assigned to 8 groups, 2 SHAMs, 2 ovariectomized controls and 4 ovariectomized treated with estradiol and 3 different doses of hydrolyzed collagen peptides (OVX+PC1, OVX+PC2, y OVX+PC3). Two types of lacerations (incision and excision) were performed to evaluate wound healing. Photographs were taken on days 0, 3, 5, 7, 10 and 14 post-laceration to perform a macroscopic analysis. After 7 or 14 days the animals were humanly killed and the skin was collected from the dorsal area for histological and protein analysis.

The study demonstrated that oral administration of hydrolyzed collagen peptides accelerated tissue repair in ovariectomized female rats, decreased inflammation, improved deposition and orientation of collagen fibers, and increased collagen fibers,

giving greater strength to the wound closure. On the other hand, it was demonstrated that for the treatment of incisions the best dose was 4000 mg.kg⁻¹ of hydrolyzed collagen peptides (OVX + PC3) whereas for the excision model the treatments with 2000 mg.kg⁻¹ and 4000 mg.kg⁻¹ of Hydrolyzed collagen peptides (OVX + PC2 and OVX+PC3). These treatments were even better than when estrogen was administered, showing a healing pattern similar to the SHAM.

In conclusion, the oral use of hydrolyzed collagen peptides proves to be a beneficial treatment for wound healing in a model of ovariectomy.

I. Introducción

La reparación tisular cutánea es una respuesta compleja ante una lesión y consta de 3 fases: inflamación, proliferación y remodelación (Reinke et al 2012). La primera fase, inflamación, es importante ya que se encarga de eliminar los agentes extraños que podrían ingresar al organismo durante la lesión (Mukai et al 2014). Así mismo, esta fase se produce en paralelo con la hemostasia, la cual es la encargada de generar vasoconstricción y formar el tapón plaquetario para evitar que se siga generando un sangrado (Atala et al 2010).

La fase proliferativa se encarga de revestir la zona lesionada, a esto también se le conoce como reepitelización (Sinno et al 2013). En esta fase, las células principales son los queratinocitos, ya que son considerados como mediador en la síntesis de colágeno, fibronectina y otras sustancias básicas necesarias para la cicatrización (Madden et al 1971) y por ende, participan en la formación de la nueva matriz extracelular (MEC) (Barker et al 2011).

La fase final es conocida como la fase de la remodelación. Esta fase está caracterizada por la transición del tejido granuloso, formado durante la fase proliferativa, a la formación de la cicatriz madura. Este tejido granuloso está caracterizado por una alta densidad de fibroblastos, granulocitos, macrófagos, capilares y colágeno poco organizado (Gurtner et al 2008).

Uno de los cambios importantes que se da en la fase de la remodelación es la del colágeno, en donde el colágeno tipo 3 (producido en la fase proliferativa) será sustituido por el colágeno más fuerte, es decir, el tipo 1 (Reinke et al 2012). El colágeno es la principal proteína estructural fibrosa insoluble que se encuentra en la matriz extracelular de la piel junto con la elastina y el ácido hialurónico (Sibilla et al 2015). Así mismo, es la proteína más abundante en los mamíferos llegando a constituir entre el 25% y el 35% del contenido proteico animal (Ricard-Blum et al 2011). En el cuerpo humano es el

principal constituyente de muchos tejidos como la piel la cual posee el 74% de esta proteína

El estrógeno, principal hormona circulante femenina, tiene un gran efecto sobre la reparación tisular cutánea (Thornton et al 2002), debido a que modulan la respuesta inflamatoria, acelera la reepitelización, inducen la formación del tejido granuloso y modifican la proteólisis (Emmerson et al 2012) en las células de la piel, sobre todo en los queratinocitos. Así mismo, la ausencia de niveles de estrógenos en mujeres posmenopáusicas está asociada con una reducción del grosor de la piel en un 1% por año (Brincat et al 1987a).

La menopausia es un proceso natural que se da en las mujeres y está relacionado con la pérdida de la función ovárica (Von Mach-Szczyposki et al 2016), en donde la producción de estrógenos disminuye significativamente. La falta de estrógeno en las mujeres posmenopáusicas se considera responsable de una serie de eventos relacionadas con el envejecimiento, incluida la mala cicatrización de heridas (Archer et al 2012). Además, estos efectos también pueden incluir la aparición de arrugas, sequedad, atrofia, laxitud y atrofia vulvar (Hall et al 2005).

Con el fin de solucionar estos problemas, actualmente se proponen diferentes tratamientos como la administración de terapia hormonal de reemplazo (HRT, por sus siglas en inglés) o el uso de moduladores de receptores de estrógenos (SERMs). Sin embargo, ambas soluciones poseen desventajas (Gennari et al 2010). Los principales riesgos del tratamiento con HRT son la enfermedad trombo embólica (VTE por sus siglas en inglés), ataques cardíacos, cáncer de mama, cáncer endometrial y problemas en la vesícula biliar. Estas son las razones por la cual diversos estudios, incluyendo la iniciativa de la salud de la mujer (WHI) y el estudio de millón de mujeres (MWS) han expresado su preocupación y controversia sobre el uso del HRT (Beral et al 2003).

Si bien los beneficios suelen superar los riesgos, los resultados no son regulares, y el tratamiento no es recomendable para mujeres mayores a los 60 años. Y en el caso que se

presenten síntomas de menopausia prematura o temprana, el límite del tratamiento se reduce a un máximo de 51 años (Rossouw et al 2002). Por otro lado, la posible duración del tratamiento, que conlleva a su vez al incremento del nivel de los riesgos previamente mencionados, hace que el uso del HRT no sea la solución más efectiva a largo plazo, lo que hace necesario la búsqueda de mejores alternativas.

En los últimos años se ha investigado la producción de péptidos funcionales de colágeno mediante hidrólisis enzimática, enfocándose en su consumo oral, los cuales han demostrado una excelente absorción y metabolismo de esta proteína. Así mismo, presentan propiedades antiinflamatorias (Zhang et al 2007), actividad protectora de la piel, contra el daño causado por la radiación ultravioleta (Hou et al 2009), actividad antimicrobiana (Gómez-Guillen et al 2010), capacidad antioxidante (Lin et al 2012), capacidad antitumoral (Liang et al 2010) y capacidad de estimular la cicatrización de heridas y la angiogénesis (Zhang et al., 2011a; Zhang et al, 2011b). Ante esta situación se propone el uso de péptidos de colágeno de escamas de Anchoqueta como una alternativa viable para el tratamiento de la reparación tisular cutánea en ratas hembra ovariectomizadas.

II. Marco teórico

Piel

La piel es el sistema de órganos más grande del cuerpo. Es la barrera principal que no solo nos protege del entorno sino también desempeña un papel fundamental en la protección contra las fuerzas mecánicas y las infecciones, desequilibrio de líquidos, y la desregulación térmica (Sorg et al 2007). Así mismo, la piel es un tejido heterogéneo que posee otra importante función, ser un órgano endocrino (Thornton et al 2002).

La piel se compone de tres capas superpuestas: (1) la capa superficial conocida como epidermis, la cual funciona como una barrera al medio externo, (2) la capa más densa, conocida como dermis, la cual se compone de tejido conectivo y además proporciona a la piel sus propiedades mecánicas y por último, (3) la hipodermis, la cual está formada por tejido adiposo.

La epidermis está formada por células denominadas queratinocitos, debido a la capacidad de estas células de sintetizar queratina, por lo cual la epidermis tendrá un epitelio queratinizado estratificado el cual se intercala con folículos pilosos y glándulas sebáceas y sudoríparas (Martin et al 1997, Watt et al 2011). Seguidamente viene la dermis, la cual posee dos subdivisiones: dermis papilar superior y dermis reticular inferior, las cuales se distinguen dependiendo de la densidad de sus fibras de colágeno. Esta capa está además compuesta por fibroblastos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y monocitos. Los fibroblastos serán los encargados de sintetizar y liberar precursores de colágeno, elastina y proteoglicanos para construir la matriz extracelular. Por último, la hipodermis o también conocida como tejido subcutáneo, está formado de tejido conectivo laxo y es donde los lipocitos sintetizan y almacenan grasa (Watt et al 2011; Xue et al 2015).

Cuando se genera un daño a nivel de este órgano se iniciará un proceso llamado reparación tisular, en el cual, se restaurarán la barrera y las propiedades mecánicas de la piel mediante las acciones de numerosos tipos celulares que experimentarán proliferación, diferenciación, migración y apoptosis para reconstruir el tejido dañado.

Reparación tisular

La reparación tisular es una respuesta compleja ante una lesión y está cuidadosamente regulada a nivel temporal y espacial (Mukai et al 2014). El modelo clásico de reparación tisular está dado en tres etapas principales: inflamación, proliferación y remodelación.

(Mukai et al 2014, Atala. et al 2010, Reinke et al 2012, Zhou et al 2016). La desregulación de cualquiera de estas fases da como resultado una alteración en la cicatrización, teniendo como resultado la aparición de úlceras crónicas no-cicatrizantes, acumulación de tejido fibrotico excesivo, o el desarrollo de queloides (Mustoe et al 2006).

La fase inflamatoria es de esencial importancia, ya que se produce en paralelo con la hemostasia (Atala et al 2010) y se describe como la etapa temprana de cicatrización (Reinke et al 2012). La hemostasia se caracteriza por realizar vasoconstricción y coagulación (Tsourdi et al 2013). La fase inflamatoria es considerada un periodo crítico en la reparación tisular cutánea, ya que es esencial para eliminar bacterias y crear un entorno propicio para las siguientes fases (Mukai et al 2014). Así mismo, implica la activación del sistema inmune innato, de los neutrófilos y macrófagos los cuales migrarán rápidamente a la piel lesionada (Eming et al 2014).

Esta primera fase tarda hasta 7 días y es mediada a través de los leucocitos, especialmente por los neutrófilos, que transmigran junto con una creciente gradiente de quimioquinas hasta su llegada al sitio de la lesión (Sinno et al 2013). Uno de los factores claves en la transición de la fase de inflamación a la fase de proliferación es la aparición de los macrófagos (Sindrilaru et al 2013); estos se forman a partir de monocitos estimulados por fragmentos de proteína de la matriz extracelular, factor de crecimiento β transformante (TGF- β) y proteína quimio-atrayente de monocitos (Leibovich et al 1975). Los macrófagos realizan fagocitosis directa de bacterias y materiales extraños; sin embargo, también secretan numerosas enzimas y citoquinas, colagenasas que limpian la herida, interleucinas y factor de necrosis tumoral (TNF) que estimulan fibroblastos y promueven la angiogénesis, así como también el TGF que estimula los queratinocitos (Brown et al 1999). Los macrófagos también segregan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que inician la formación de tejido de granulación y por lo tanto inician la transición a la fase proliferativa y la regeneración de los tejidos (Clark et al 1996).

La prolongación de la fase inflamatoria es perjudicial y puede dar lugar a la diferenciación y activación desregulada de los queratinocitos, lo que impide el progreso a través de las etapas normales de cicatrización de heridas (Mustoe et al 2006). Por otro lado, la inflamación severa también se ha asociado con un exceso de tejido fibrótico dando como resultado fibrosis (Xue et al 2015).

Una vez que la inflamación empieza a disminuir, la fase proliferativa se convierte en el enfoque principal con la finalidad de desarrollar la nueva matriz extracelular en la zona lesionada. A esto se le conoce como re-epitelización. La fase proliferativa dura aproximadamente de 3 a 10 días y tiene como objetivo restaurar la red vascular, también conocida como angiogénesis, generar el tejido granuloso, y depositar el colágeno (Sinno et al 2013, Hunt et al 2000).

La reepitelización requiere de la migración y proliferación de los queratinocitos que se encuentran en los extremos de la laceración, sobre la superficie no dañada, con el objetivo de restaurar la estructura y función de la zona afectada. Los queratinocitos comienzan a proliferar aproximadamente 3 días después de la lesión (Jacinto et al 2001). La reepitelización puede ser estimulada por una variedad de señales relacionadas con la herida, por ejemplo, óxido nítrico, que es principalmente sintetizado por los macrófagos (Witte et al 2002). Por otro lado, durante la fase proliferativa, es también necesario restablecer la red de vasos sanguíneos, ya que tanto los nutrientes como el oxígeno son necesarios durante la reparación tisular. Este proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos es conocido como angiogénesis, y está iniciado por factores de crecimiento tales como el VEGF, (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) o la Serina proteasa trombina en las heridas, que activan las células endoteliales de los vasos existentes (Li et al 2013).

Los vasos sanguíneos recién formados facilitan el ingreso de macrófagos y fibroblastos a la zona de laceración (Sinno et al 2013). Estos macrófagos seguirán suministrando factores

de crecimiento los cuales estimularán la angiogénesis y la formación de la cicatriz. A pesar de la importante participación de los queratinocitos y macrófagos durante la fase proliferativa, para que se realice la formación de la nueva matriz extracelular (MEC) se requiere de la presencia de otro grupo celular denominado fibroblastos. Los fibroblastos migran y se proliferan para formar el tejido granuloso, el cual está caracterizado por contener una alta densidad de fibroblastos, granulocitos, macrófagos, capilares y colágeno tipo 3 (Gurtner et al 2008). Además, los fibroblastos participan en la síntesis de colágeno tipo 3, fibronectina y otras sustancias básicas necesarias para la cicatrización (Madden et al 1971). De esta manera, los fibroblastos representan la base para la nueva matriz del tejido conectivo, el cual permitirá un adecuado cierre de la herida y la restauración de la fuerza mecánica (Barker et al 2011).

La formación de la MEC representa un paso importante ya que proporciona una estructura para la adhesión celular, así como también regula y organiza el crecimiento, movimiento y la diferenciación de las células que se encuentra en su interior (Barker et al 2011, Eckes et al 2010). Al final de la fase proliferativa, el número de fibroblastos maduros comenzará a disminuir conforme estos se vayan diferenciando a miofibroblastos (Madden et al 1971, Hinz et al 2007).

La tercera y última fase de la reparación tisular es conocida como la fase de la remodelación. Esta fase está caracterizada por la transición del tejido granuloso a la formación del tejido cicatrizante. Durante la maduración de la herida los componentes de la MEC sufren ciertos cambios. Uno de estos cambios es que el colágeno tipo 3 (producido en la fase proliferativa) será sustituido por el colágeno más fuerte, el tipo 1 (Reinke et al 2012). Este tipo de colágeno tiene orientación paralela por lo cual será diferente al colágeno que está como entretejido en una dermis sana (Gurtner et al 2000). Otro cambio es ocasionado por los miofibroblastos, los cuales causan contracciones en la herida gracias a sus múltiples adhesiones al colágeno, lo que permite disminuir la superficie de la herida en desarrollo (Sorg et al 2007). Esta última fase de la reparación tisular es un trabajo

continuo y dinámico llevado a cabo por diferentes y numerosos factores de crecimiento, así como las diversas células que han participado en las tres fases de la reparación tisular con el fin de proporcionar una remodelación continua y eficiente.

La reparación tisular cutánea requiere de efectos coordinados de varios tipos de células, incluyendo queratinocitos (Hopkinson et al 2014), fibroblastos (Wojtowicz et al 2014), células inmunitarias, y fibroblastos. Una alteración en cualquiera de las fases de la reparación conduce a la formación de heridas no-cicatrizantes y/o a la formación de excesivo tejido fibrótico, lo cual puede conllevar a la formación de queloides o cicatrices hipertróficas. Es por ello que se requiere de un control de las tres fases para permitir una rápida regeneración de la piel dañada y de esta manera restaurar la estructura y función de la piel (Landen et al 2016).

Estrógenos y su efecto en la reparación tisular cutánea

Los estrógenos son esteroides C-18 caracterizados por la presencia de un anillo aromatizado, un grupo hidroxilo fenólico en C-3, y por un grupo hidroxilo (estradiol) o un grupo cetona (estrona) en C-17 (Carr et al 1998). Son hormonas biológicamente activas que se derivan del colesterol y son liberados por la corteza suprarrenal, los testículos, el ovario y la placenta, tanto en humanos como en animales (Tresguerres, 1999). Los estrógenos destacan por su importancia tanto en ciclos menstruales como en ciclos estrales, por lo cual se consideran como hormonas sexuales femeninas primarias (Farzaneh et al 2016).

Para poder ejercer sus efectos biológicos, esta hormona se difunde fácilmente a través de la membrana celular y, dentro de la célula, se une y activa a los receptores de estrógenos (ER) (Farzaneh et al 2016). Existen 2 receptores de estrógenos: ER α y ER β , miembros de la superfamilia de los receptores nucleares de los factores de transcripción (Jia et al 2015).

Los estrógenos tales como el estradiol, la estrona y el estriol son hormonas predominantemente femeninas, las cuales son importantes para mantener la salud de los tejidos reproductores, glándulas mamarias, la piel y el cerebro (Ying et al 2002). Además, son importantes para el funcionamiento de muchas estructuras en la epidermis y la dermis incluyendo la vasculatura, los folículos pilosos, las glándulas sebáceas, glándulas ecrinas y melanocitos (Thornton et al 2002). Por otro lado, juegan un rol importante en promover el proceso de reparación tisular modulando la respuesta inflamatoria, acelerando la re-epitelización, induciendo la formación del tejido granuloso y modificando la proteólisis (Zhou et al 2016). Los estrógenos están asociados a la síntesis de colágeno, aumentando el grosor de la piel y el contenido de agua dérmica (por medio de la producción del ácido hialurónico), por lo que se asocia estos efectos con su rol en la cicatrización de heridas (Shah et al 2001).

Deficiencia de estrógenos en la reparación tisular

La caída de los niveles de estrógeno en las mujeres durante la etapa post-menopáusica trae consigo una serie de cambios y problemas tanto psicológicos como fisiológicos. Uno de estos cambios se produce a nivel de la piel. La privación de estrógenos en las mujeres posmenopáusicas se considera responsable de una serie de problemas relacionadas con el envejecimiento, afectando también la cicatrización de heridas (Vlasta Perželová et al 2016). La deficiencia de estrógeno trae como consecuencia una disminución en la síntesis del colágeno lo cual conduce a una atrofia de la piel (Brincat et al 1987b), reducción de la elasticidad (Sumino et al 2004) y la reducción del contenido de agua lo que causa un aumento de la sequedad de la piel (Shah et al 2001, Bouloc et al 2017). Así mismo, también se ha demostrado que la cicatrización de heridas se reduce, debido a que la falta de estrógenos induce a un aumento de las células inflamatorias (Millington et al 2006, Videira et al 2003).

Colágeno

El colágeno es la principal proteína estructural fibrosa insoluble que se encuentra en la matriz extracelular de la piel junto con la elastina y el ácido hialurónico (Sibilla et al 2015). Además, el colágeno se encuentra en diferentes tejidos conectivos presentes en los animales, principalmente en tejidos fibrosos como tendones y ligamentos, córnea, cartílago, huesos, vasos sanguíneos, en el intestino y en los discos vertebrales (Sibilla et al 2015, Sandhu et al 2012). Esta proteína constituye la mayor parte del soporte estructural del cuerpo y es la principal proteína del tejido conectivo (Deshmukh et al 2016).

La familia del colágeno está formada por 28 proteínas diferentes (Heino et al 2007), que representan entre el 25% y el 35% de la masa total de proteínas de los mamíferos y desempeñan un papel central en la estructura de varios tejidos, como la piel y los huesos dando rigidez e integridad (Ricard-Blum et al 2011).

Basándose en su estructura y organización tridimensional, la familia de proteínas de colágeno puede agruparse en colágenos formadores de fibrillas, colágenos asociados a fibrillas (FACIT), colágenos formadores de red, fibrillas de anclaje, colágenos transmembrana (MACIT) y colágenos de membrana basal (Kadler et al 1996, Gelse et al 2003). Una fibrilla de colágeno está formada de múltiples triple-hélice, y múltiples fibrillas se unen para formar una fibra de colágeno (Fig. 1.1). Generalmente las fibrillas de colágeno están hechas de diferentes tipos de colágeno: colágeno I y III en la piel; Colágeno II y III en cartílago (Richard- Blum et al 2011). La diversidad de la familia del colágeno (colágeno I, II, III) está determinada principalmente por la existencia de varias cadenas α con diferentes números de aminoácidos.

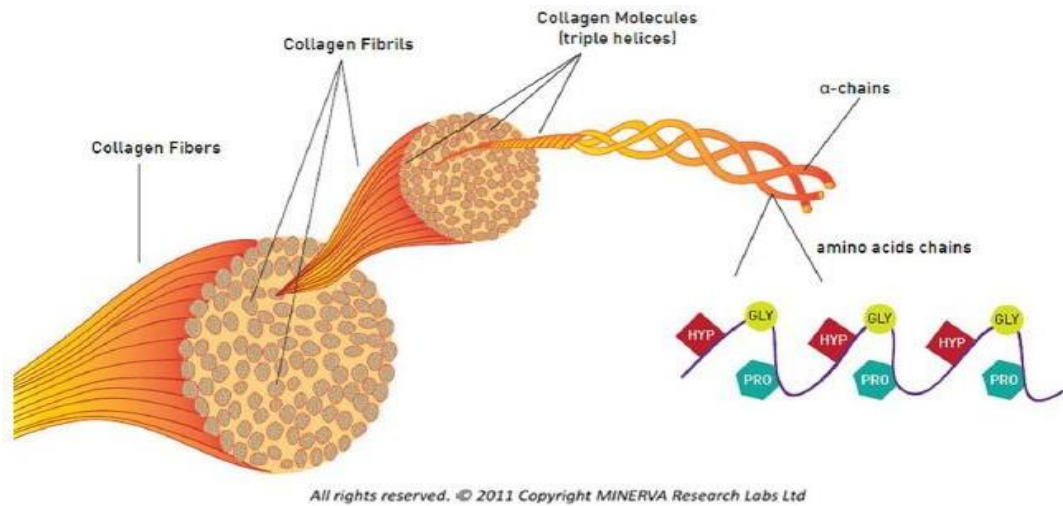


Figura 1.1 Estructura de las fibras de colágeno (Sibilla et al 2015)

El colágeno es sintetizado principalmente por las células mesenquimales y sus derivados, tales como fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos y otras células tales como células epiteliales, células endoteliales, células musculares y células de Schwann (Nanci 2008). El colágeno es producido principalmente por fibroblastos en los tejidos conectivos (Wojtowicz et al 2014). Los diferentes tipos de colágeno y las estructuras que forman tienen el propósito de ayudar a los tejidos a resistir el estiramiento. Los estímulos físicos están directamente relacionados con las interacciones entre el colágeno y los fibroblastos, dando lugar a la activación de fibroblastos para producir colágeno (Sibilla et al 2015).

Colágeno Hidrolizado

El colágeno hidrolizado se compone de péptidos pequeños de bajo peso molecular (0,3 - 8 kDa), producidos a partir de colágeno nativo que se encuentra en los huesos, la piel y el tejido conectivo de los mamíferos. Al tener bajo peso molecular, el colágeno hidrolizado es fácilmente digerible, absorbido y distribuido en el cuerpo humano. Cuando se administra por vía oral, el colágeno hidrolizado llega al intestino delgado donde se absorbe en el torrente sanguíneo, tanto en forma de pequeños péptidos de colágeno

como en forma de aminoácidos libres. A través de la red de vasos sanguíneos, estos péptidos de colágeno y aminoácidos libres se distribuyen por todo el cuerpo humano, en particular en la dermis, donde se ha demostrado que pueden permanecer hasta 14 días (Naylor et al 2011).

En la dermis, el colágeno hidrolizado tiene un mecanismo de doble acción: primero, los aminoácidos libres proporcionan bloques de construcción para la formación de fibras de colágeno y elastina; segundo, los oligopéptidos de colágeno actúan como ligando, los cuales se unen a los receptores presentes en la membrana de los fibroblastos y estimulan la producción de nuevo colágeno, elastina y ácido hialurónico (Sibilla et al 2015).

El colágeno hidrolizado está enriquecido en aminoácidos específicos: glicina, prolina e hidroxiprolina. Cada aminoácido tiene una función particular. Por ejemplo, hidroxiprolina se absorbe tanto en aminoácidos (forma libre) como en forma peptídica. Pro-Hidroxiprolina o poli-hidroxiprolina es el principal péptido encontrado en el plasma humano después de la ingestión oral de cualquier colágeno hidrolizado (Watanabe-Kamiyama et al 2010).

Gracias a su rápida absorción y su acción directa en la dermis, este puede ser utilizado como un tratamiento eficiente para la reparación tisular.

Pregunta de Investigación

Los estrógenos son importantes para el funcionamiento de muchas estructuras en la epidermis y la dermis incluyendo la vasculatura, los folículos pilosos, las glándulas sebáceas, glándulas ecrinas y melanocitos (Thornton et al 2002). Al tener una deficiencia de estrógenos, esto generará cambios a nivel de la piel, disminuyendo su humedad,

elasticidad y grosor (Brincat M, 2004) así como incrementando el tiempo de cicatrización de las heridas.

Con el fin de solucionar estos problemas, actualmente se proponen diferentes tratamientos como la administración de una terapia hormonal de reemplazo o, más recientemente, el uso de moduladores de los receptores de estrógenos (SERMs). Sin embargo, ambas soluciones poseen desventajas. Los principales riesgos del tratamiento con terapia de reemplazo hormonal son la enfermedad tromboembólica (VTE por sus siglas en inglés), ataques cardíacos, cáncer de mama, cáncer endometrial y problemas en la vesícula biliar (Beral et al 2003). Además el uso de terapia de reemplazo hormonal (HRT) en la cicatrización de heridas es complejo. Estudios con HRT en poblaciones con deficiencia de estrógeno sugieren que el contenido de humedad, el grosor, el envejecimiento propiedades y curación de heridas puede mejorar, sin embargo, gran parte de la evidencia es polémica. A la luz de los datos recientes sobre el uso de HRT, su uso debe ser cuidadosamente evaluado por los médicos y sus pacientes (Hall et al 2005).

Frente a esta situación se propone el tratamiento oral de péptidos de colágeno hidrolizado de escamas de anchoveta, ya que representaría una alternativa viable para el tratamiento de la reparación tisular sin las desventajas generadas por los medicamentos.

Justificación

Se ha demostrado en numerosos estudios que el colágeno de mamíferos ha sido ampliamente utilizado para la cicatrización de heridas de la piel. Sin embargo, el colágeno de mamíferos todavía presenta un riesgo de transmitir enfermedades animales, como la encefalopatía espongiiforme bovina y la fiebre aftosa (Matsumoto et al 2011). Además, la aplicación de colágeno de mamíferos está restringida por razones religiosas (Duan et al 2009).

Recientemente, el colágeno marino ha atraído gradualmente la atención debido a su abundancia y bajo costo. En el 2008 se utilizó el colágeno de las escamas de pescado

(*Lates calcarifer*) y se demostró que tenían suficiente resistencia a la tracción (2 MegaPascales(MPa)) para su uso como material en la reparación tisular (Sankar et al 2008). Además, el colágeno de los peces compuesto con elastina o extractos de plantas mostró una buena biocompatibilidad con células de la piel (Muthukumar et al 2013, Muthukumar et al 2014).

La anchoveta es un recurso extensamente explotado en nuestro país; solamente entre los meses de mayo y junio del año 2011 se pescaron más de 2,6 millones de toneladas (fuente IMARPE). El incremento de la producción de harina de pescado para la producción de nutracéuticos, tales como los péptidos de colágeno, beneficiaría considerablemente a la población.

Los péptidos hidrolizados de colágeno deberían constituir un tratamiento inocuo y eficaz para revertir los efectos generados sobre la reparación tisular ante una deficiencia de estrógenos en el periodo de la post-menopausia. Es por ello que el desarrollo de péptidos de colágeno a partir de escamas de anchoveta, a través de la empresa TASA (Tecnológica de alimentos S.A), tiene la finalidad de elaborar un producto que cumpla con las características químicas y funcionales requeridas por el mercado permitiendo a su vez que la población se beneficie de una manera directa de la explotación de este recurso natural rescatando un recurso actualmente desaprovechado y dándole un valor agregado.

III. Hipótesis

El suplemento de la dieta con dosis diarias de 1g/kg, 2g/kg, 4g/kg de péptidos hidrolizados de colágeno de escamas de anchoveta revierte los efectos generados sobre la reparación tisular ante una deficiencia de estrógenos inducida por ovariectomía en ratas hembra.

IV. Objetivo general:

Determinar el efecto de la administración oral de péptidos hidrolizados de colágeno de escamas de anchoveta sobre diferentes parámetros de la reparación tisular en un modelo de ratas hembras ovariectomizadas.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto dosis-respuesta de la administración oral de péptidos hidrolizado de colágeno de escamas de anchoveta sobre la reparación tisular cutánea en ratas hembra intactas y ovariectomizadas que recibieron los diferentes tratamientos orales administrados (vehículo, estradiol, dosis 1 de péptido de colágeno, dosis 2 de péptido de colágeno y dosis 3 de péptido de colágeno).
- Comparar el efecto de la administración oral de las 3 dosis de péptidos de colágeno de anchoveta sobre la tasa de cierre de heridas en ratas hembras ovariectomizadas.
- Comparar el efecto de la administración oral de las 3 dosis de péptidos de colágeno de anchoveta sobre el grosor de herida en ratas hembras ovariectomizadas.
- Comparar el efecto de administración oral de las 3 dosis de péptidos de colágeno de anchoveta sobre la hiperplasia epidérmica en ratas hembras ovariectomizadas
- Comparar el efecto de administración oral de las 3 dosis de péptidos de colágeno de anchoveta sobre el patrón inflamatorio, a través de conteo de neutrófilos y macrófagos, en ratas hembras ovariectomizadas.
- Determinar la orientación de las fibras de colágeno en la zona lacerada de ratas hembras intactas y ovariectomizadas que recibieron los diferentes tratamientos orales administrados.

- Determinar los niveles de hidroxiprolina en la zona lacerada de ratas hembras intactas y ovariectomizadas que recibieron los diferentes tratamientos orales administrados.

V. Materiales y métodos

5.1 Animales

Los animales fueron obtenidos del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se utilizaron 96 ratas hembra de la cepa Holtzman de 12 semanas de edad con un peso de 250 gr a 300 gr aproximadamente. Se dividieron aleatoriamente en 8 grupos de los cuales se subdividieron en 16 subgrupos con 6 animales en cada subgrupo de acuerdo a la siguiente tabla:

	Grupo de evaluación	Tratamiento administrado	Día de evaluación
1	Sham – control no lacerado	Agua (vehículo)	Día 7 (n=6)
			Día 14 (n=6)
2	Sham – laceración dorsal (SHAM + VH)	Agua (vehículo)	Día 7 (n=6)
			Día 14 (n=6)
3	OVX - control no lacerado	Agua (vehículo)	Día 7 (n=6)
			Día 14 (n=6)
4	OVX – laceración dorsal	Agua	Día 7 (n=6)

	(OVX + VH)	(vehículo)	Día 14 (n=6)
5	OVX - laceración dorsal (OVX + E2)	Estradiol (control positivo)	Día 7 (n=6)
			Día 14 (n=6)
6	OVX - laceración dorsal (OVX + PC1)	Dosis 1 de péptido de colágeno (PC1)	Día 7 (n=6)
			Día 14 (n=6)
7	OVX - laceración dorsal (OVX + PC2)	Dosis 2 de péptido de colágeno (PC2)	Día 7 (n=6)
			Día 14 (n=6)
8	OVX - laceración dorsal (OVX + PC3)	Dosis 3 de péptido de colágeno (PC3)	Día 7 (n=6)
			Día 14 (n=6)

Antes de iniciar el protocolo experimental, los animales fueron aclimatados durante 7 días bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura. Se respetó el ciclo de 12 horas luz/oscuridad. Los animales tuvieron acceso a alimentación balanceada y agua *ad libitum*. Las jaulas utilizadas tuvieron una dimensión de 45 cm de largo x 20cm alto x 23 cm ancho.

Consideraciones éticas

Los procedimientos se realizaron de acuerdo a las condiciones científicas, técnicas y administrativas para la investigación, y los principios éticos de la experimentación animal del International Council for Laboratory Animal Science 1985 (ICLAS).

Este estudio ha sido aprobado por el comité de ética animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI: 100296).

5.2 Ovariectomía

Para inducir la deficiencia de estrógenos, los animales fueron ovariectomizados a las 13 semanas de edad. Para la cirugía se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (35 mg/Kg) diluido en 0.5 ml de agua destilada y se procedió a depilar un área de 10 cm² en la zona dorsal, la cual luego fue desinfectada con alcohol iodado y agua destilada. Una vez comprobado el efecto de la anestesia, se realizó una incisión dorsal, se expusieron los ovarios a la cavidad abdominal, y se ligó la parte superior del oviducto para extraer los ovarios. En el caso del grupo sham, los ovarios fueron expuestos a la cavidad abdominal y luego fueron regresados a su posición original sin ser extirpados, con la finalidad de someter al animal al mismo nivel de estrés que el resto y evitar variables confusoras.

Para mantener la hemostasis, se ligó la parte superior del oviducto con seda negra (TAGUM, TAGUMEDICA S.A). Las capas de músculo y piel fueron suturadas con seda negra. Las suturas se trataron con el antibiótico Multimycin® en crema (Farminindustria S.A.) que contiene neomicina, polimixina B y bacitracina, hasta que terminen de cicatrizar. Las laceraciones fueron monitoreadas para evitar infecciones.

El tiempo de recuperación post – ovariectomía fue de 4 semanas. Este tiempo permite que los animales se recuperen y que los niveles basales de estrógeno disminuyan de forma eficiente.

5.3 Realización de laceraciones cutáneas

Después de 4 semanas de recuperación post-ovariectomía, los animales (17 semanas de edad) fueron anestesiados por medio de una inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (Halatal, 35 mg /Kg) diluido en 0.5 mL de agua destilada. Una vez anestesiados, se procedió a depilar la zona dorsal de las ratas y luego se delimitó el sitio donde fue

realizada la laceración. El área quirúrgica fue desinfectada con etanol 70% v/v (Et OH). Cada animal recibió 4 laceraciones, 2 incisiones y 2 escisiones.

5.3.1 Incisión

Dos incisiones lineales de 1.5 cm de largo fueron realizadas a través de la piel hasta el panículo carnoso, en cada dorso del animal (Figura 5.3.1). Las laceraciones fueron dejadas a cicatrizar mediante intención secundaria.



Figura 5.3.1: Modelo de incisión

5.3.2 Escisión

Dos secciones circulares de piel (1cm de diámetro) fueron extirpadas al nivel del panículo carnoso, uno en cada dorso del animal (figura 5.3.2). Las laceraciones fueron dejadas a cicatrizar mediante intención secundaria sin .

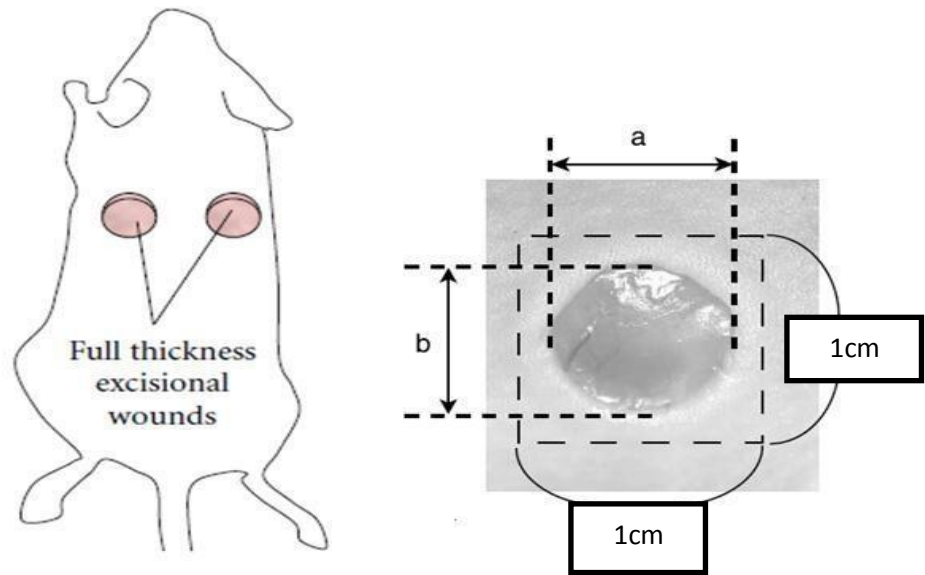


Figura 5.3.2: Modelo escisión

Los animales fueron regresados a sus jaulas y examinados hasta que se recuperaron de la anestesia. Las laceraciones fueron monitoreadas diariamente.

5.4 Tratamientos

5.4.1 Péptidos de colágeno de anchoveta

Como materia prima se empleó escamas de anchoveta, las cuales fueron recolectadas y lavadas repetidamente luego de lo cual fueron hidrolizadas empleando una enzima endopéptidasa comercial durante 1 hora.

El hidrolizado resultante fue inactivado, filtrado, centrifugado, esterilizado, secado y conservado en bolsas selladas al vacío.

Las dosis administradas fueron calculadas en base al factor de corrección () para cada especie, el cual considera el área superficial del cuerpo y su peso promedio.

La dosis animal equivalente fue calculada empleando la siguiente formula:

$$\left(\quad \right) \left(\quad \right) \text{—————}$$

Dónde:

DRH = Dosis recomendada para humanos = 166.66 mg.kg⁻¹

k_m humanos = 37 tomando como referencia un peso de 60 (Nair & Jacob, 2016)

k_m ratas = 6 tomando como referencia un peso de entre 0.08 y 0.27 kg (Nair & Jacob, 2016)

Aplicando la fórmula obtenemos como resultado una dosis animal equivalente diaria de 1027 mg. kg⁻¹. En función a este resultado y a estudios previos realizados con péptidos de colágeno se determinaron las 3 dosis evaluadas en el estudio que corresponden a 1000 mg. kg⁻¹, 2000 mg. kg⁻¹ y 4000 mg. kg⁻¹.

5.4.2 Estradiol

La dosis se tomó en función a estudios previos con resultados óptimos en los mismos parámetros con Progynova® 1mg (valerato de estradiol) (Bayer Schering Pharma S.A.). La dosis diaria de Estradiol fue de 0.04 mg/kg.

5.5.2 Administración de tratamientos

Los tratamientos fueron administrados de manera oral mediante una sonda orogástrica (2 milímetros), una vez al día, durante 7 y 14 días (dependiendo del grupo), comenzando a partir de la generación de la laceración.

5.6 Evaluación macroscópica

Las imágenes digitales de cada herida de piel dorsal fueron obtenidas utilizando una distancia focal, apertura y tiempo de exposición estandarizada, usando una cámara Nikon D5000, inmediatamente después de realizar la incisión inicial y a los días 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 14 post-lesión.

5.6.1 Medición macroscópica de incisiones

El área de las incisiones fue medida dentro de los márgenes de la herida y el área de píxeles fue calculado utilizando Adobe Photoshop CS6 (Figura. 5.6.1).

Se calculó el porcentaje de cierre de herida (%) con la siguiente fórmula:

$$\text{Área} = \text{píxeles} / \text{resolución}^2$$

Dónde:

AD0: Área de la herida al día 0

AD3, 5,7, 9, 11, 13,14: Área de la herida en día 3, día 5, día 7, día 9, día 11, día 13 o día 14

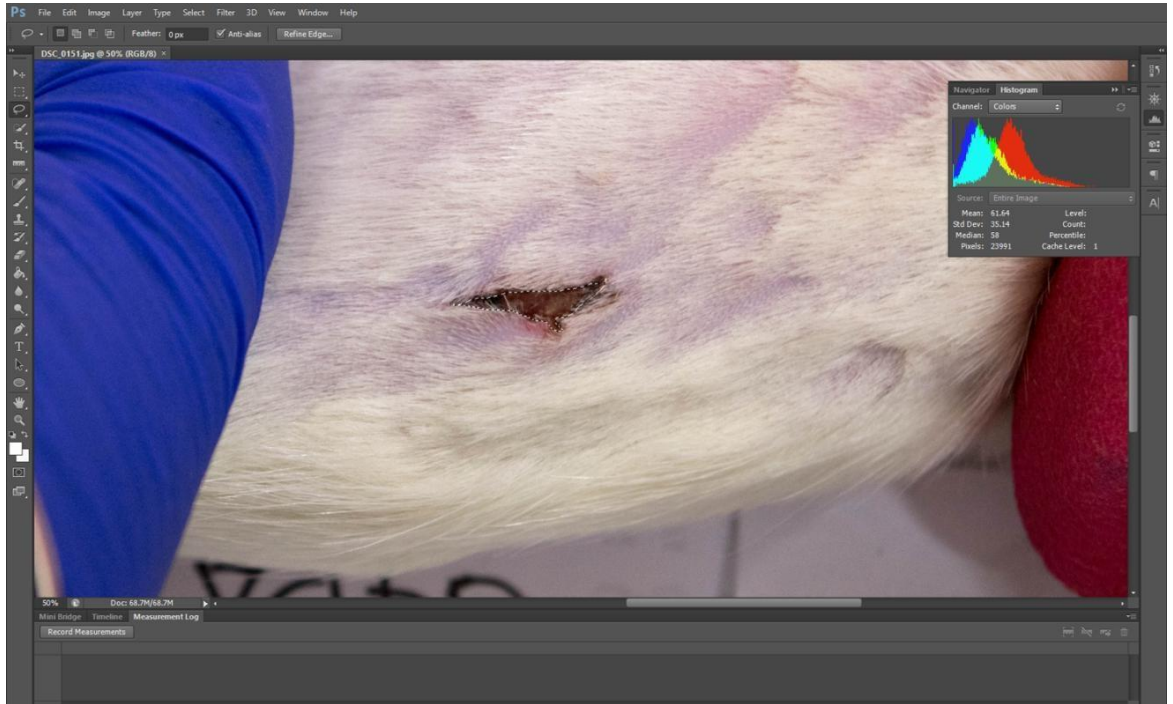


Figura 5.6.1 Medición de área de incisiones utilizando el programa Adobe Photoshop CS6

5.6.2 Medición macroscópica de escisiones

El área de las escisiones fue medida dentro de los márgenes de la herida y el área de pixeles fue calculado utilizando Adobe Photoshop CS6. (Figura. 5.6.2)

Se calculó el porcentaje de cierre de herida (%) con la siguiente fórmula:

$$\text{Área} = \text{pixeles} / \text{resolución}^2$$

Dónde:

AD0: Área de la herida al día 0

AD3, 5,7, 9, 11, 13,14: Área de la herida en día 3, día 5, día 7, día 9, día 11, día 13 o día 14

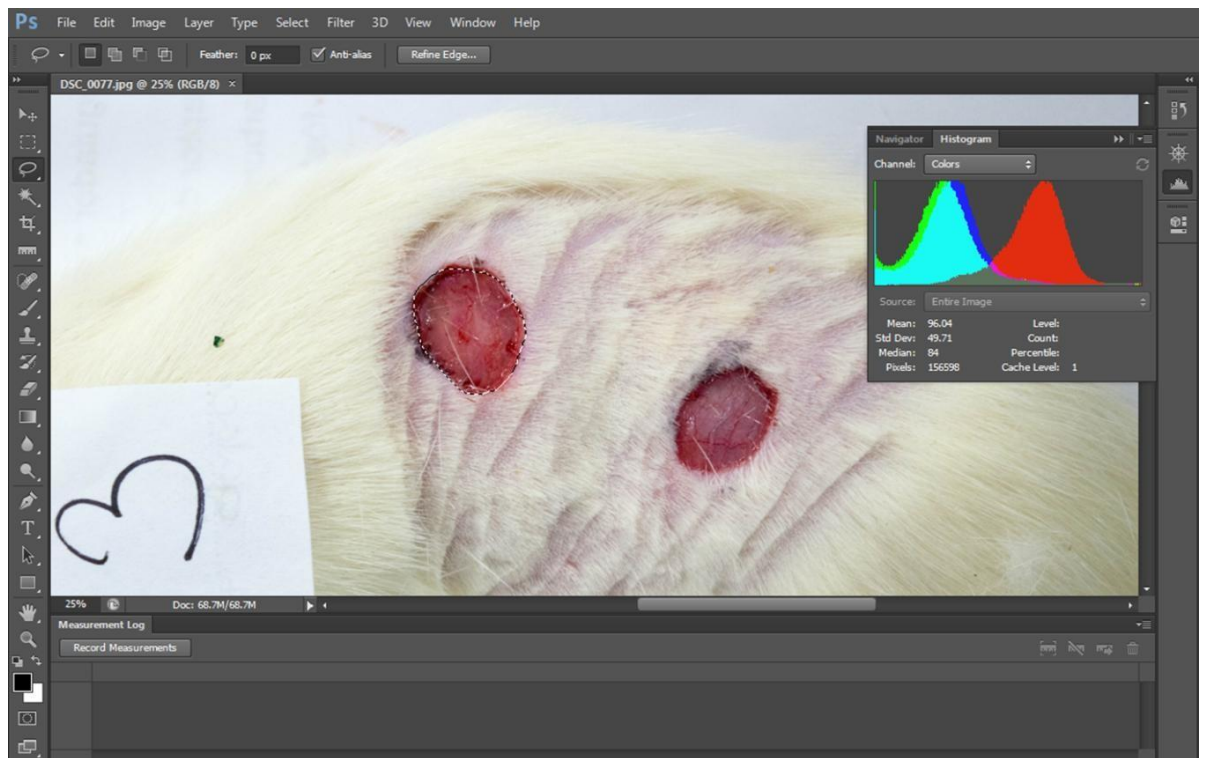


Figura 5.6.2 Medición de área de escisiones utilizando el programa Adobe Photoshop CS6

5.7 Recolección de muestras

Después de 7 o 14 días de tratamiento, dependiendo del grupo, los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂. Se extirpó y disectó las muestras de las laceraciones

cutáneas, las cuales estaban constituidas por la totalidad de la cicatriz de la herida con un borde de 5 mm aproximadamente.

Las muestras de incisiones y escisiones fueron colectadas y divididas en dos, una parte fue fijada en formol bufferado al 10% para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímicos, mientras que la otra parte fue almacenada en aluminio a una temperatura de -20°C para el posterior análisis proteico.

5.8 Análisis histológico

5.8.1 Procesamiento de muestras

Las muestras fueron colectadas y fijadas en formol bufferado al 10%. Estas fueron colocadas en cintas de tejido y se procesaron a través de varios pasos de deshidratación con etanol graduado. A continuación, el etanol fue reemplazado por histoleno para limpiar la muestra, y el bloque de tejido se infiltró con una cera de parafina mediante procedimientos estándar. Los tejidos embebidos en parafina se seccionaron a un espesor de 5 μ m utilizando un micrótomo (Leica RM2135) y se montaron en portaobjetos de vidrio.

5.8.2 Tinción de muestras

Los portaobjetos que contenían las áreas laceradas se colocaron en una estufa a 63°C por una hora para fundir la parafina. Luego, las secciones fueron desparafinizadas con Xileno, rehidratadas con una inmersión secuencial de etanol y fueron lavadas con agua. Las secciones fueron teñidas con eosina & hematoxilina o con tinción tricromía de Masson.

5.8.3 Análisis del grosor de la herida

El grosor de la herida se midió mediante microscopía óptica a 2.5x (microscopio Leica DM) y fue calculado a través de la medición de la distancia entre los dos márgenes de la dermis de tejido sano en la unión dermo-epidérmica.

Se analizaron 3 campos de cada corte histológico utilizando el programa Leica Application Suite (versión 4.8.0).

5.8.4 Análisis de la hiperplasia epidérmica

La hiperplasia epidérmica fue determinada calculando la distancia promedio entre la capa granular de la epidermis y la unión epidérmica-dérmica de cada herida. Se analizaron tres campos de cada corte histológico, y se realizaron 10 mediciones por cada campo a un aumento de 10x (Microscopio Leica DM).

Las mediciones fueron obtenidas mediante el programa Leica Application Suite (versión 4.8.0).

5.8.5 Análisis del patrón inflamatorio

El patrón inflamatorio se analizó mediante el conteo de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. La cuantificación se realizó en secciones aleatorias dentro del área de laceración, con el microscopio Leica DM a un aumento de 40x. Se evaluaron dos campos por corte histológico mediante la herramienta “conteo” del programa Leica Application Suite (versión 4.8.0).

5.8.6 Análisis de la orientación de fibras de colágeno

La orientación de las fibras de colágeno fue evaluada desde los niveles dérmicos papilares superiores hasta los niveles reticulares profundos de la herida. Esta orientación fue analizada utilizando el siguiente sistema de puntuación (Ashcroft et al 1997a):

1 = fibras en forma de canasta normal

2 = fibras en forma de canasta > fibras paralelas

3 = fibras paralelas > fibras en forma de canasta

4 = fibras paralelas

5.9 Medición de niveles de hidroxiprolina

5.9.1 Procedimiento:

Las muestras de piel se conservaron en frío para homogenizar y pesar en celdas de cuarzo del microondas. Se agregó 1.5 ml de ácido clorhídrico 6N (0.1% de fenol) y 0.5 de tritón 1%; después se colocó a hidrolizar en el digestor microondas. Los viales fueron sonificados utilizando un sonificador con baño maria a una temperatura de 60°C hasta completar la disolución. Posteriormente se trasvasaron a las fioles correspondientes, se enjuagaron los viales con HCL 0.1 N y se enrazaron con HCL 0.1N. Finalmente se agitó enérgicamente y se filtró utilizando una jeringa con filtro PTFE 0.2 um, en viales ámbar de 2mL.

5.9.2 Desarrollo de color y medida

Se pipeteó y se agregó agua destilada para completar 2mL. Paralelamente se corrió la muestra control (2ml de agua). Se añadió 1ml de solución Oxidante a cada tubo y

se agitó en un vórtex por 10 seg. Se dejó en reposo por 20 minutos a temperatura ambiente.

A cada tubo se le añadió 1mL del reactivo color, este se mezcló en un vórtex por 10 segundos. Se colocó en baño maría a 60 ± 2 °C por 15 minutos exactos. Finalmente, se dejó enfriar bajo agua de caño por aproximadamente 3 minutos. Se secaron los tubos y se midió la absorbancia de las soluciones vs la muestra blanco a 562 nm.

5.9.3 Curva de calibración

Se realizó la curva de calibración para cada serie de medidas. Se transfirió 2 ml de cada solución estándar de trabajo. Se ploteó en la curva estándar la absorbancia en el eje Y versus cantidad de hidroxiprolina (μg) en el eje X (0.6; 1.2; 2.4; 3.6; 4.8; 6.0 μg).

5.9.4 Método de Cálculo y Fórmula

$$\text{Hidroxiprolina } \left(\frac{\text{g}}{100\text{g de muestra}} \right) = \frac{(h \times 0.0025)}{(m \times V)}$$

Dónde: h : μg de hidroxiprolina en 2 ml, leídos en la curva de calibración

m: Peso de muestra en(g)

V: Volumen en mL del filtrado tomados para reacción, para el paso de hidroxiprolina

5.10 Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos recogidos se sometieron a un análisis estadístico estándar utilizando el paquete de software estadístico SPSS. Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante ANOVA de una vía con un test post-hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas con un $p < 0.05$.

VI. Resultados

6.1 Análisis macroscópico de incisiones:

La evaluación de incisiones se realizó en los días 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13,14 post lesión. En la figura 6.1 se observa la progresión del cierre de herida en el grupo SHAM y en el grupo ovariectomizado (OVX+VH). Se puede apreciar que en el grupo SHAM, a partir del día 7 ya no se observa la presencia de costra, y al día 9 post-laceración la herida se encuentra cerrada. Por otro lado, en el grupo OVX+VH, la laceración se encuentra aún abierta al día 9 post-laceración. Si bien para el día 11 la herida se encuentra cerrada, aún son notables los bordes de la laceración.

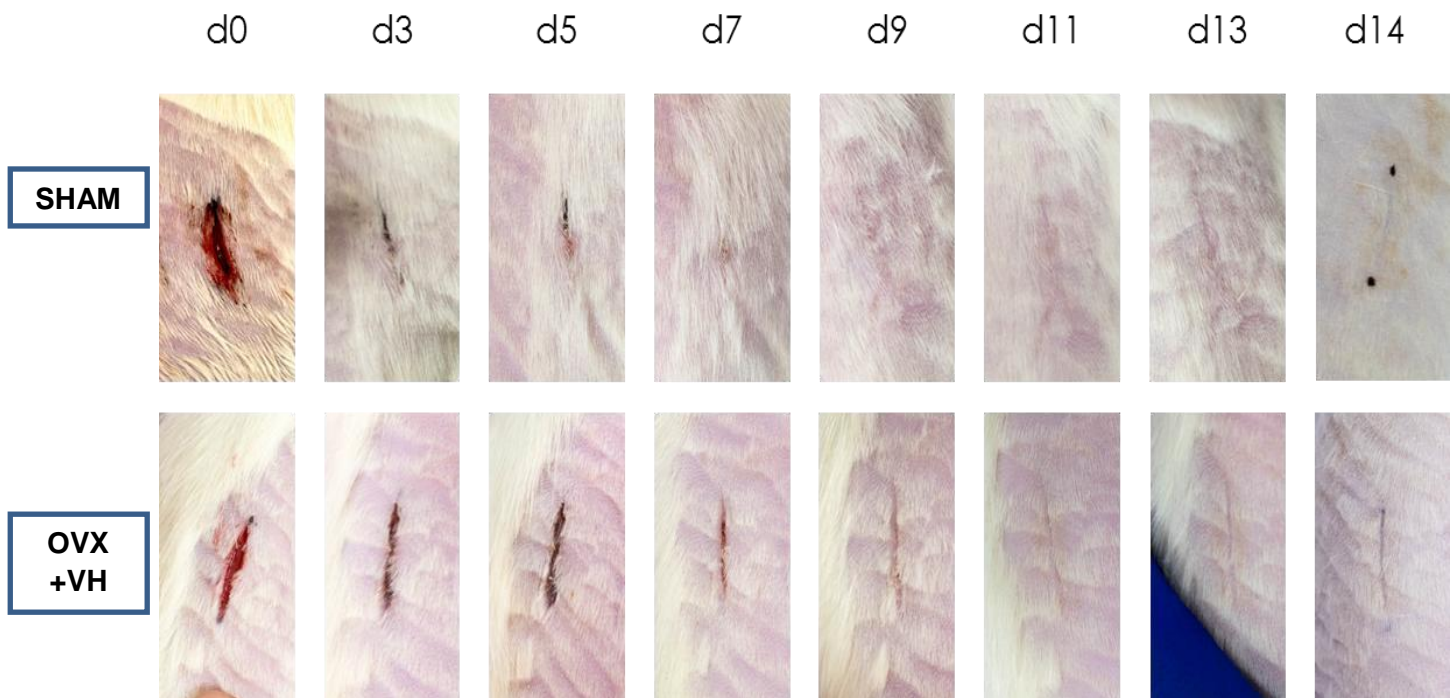


Figura 6.1 Macrofotografías de las laceraciones realizadas en los grupos SHAM Y OVX+VH. Progresión de laceraciones evaluadas al día 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 14 post-laceración.

Cuando los animales ovariectomizados son tratados con estrógeno, se observa que las laceraciones tienen un comportamiento similar al observado al grupo OVX+VH (Figura 6.2). Por otro lado, la administración de las tres dosis de colágeno demuestra tener un patrón de cicatrización más uniforme comparado al tratamiento con el control positivo (OVX+E2). Comparando las tres dosis de colágeno administrada, se puede observar que el cierre de la herida se da en el día 9 post-laceración en los grupos OVX+PC1 y OVX+PC3, y en el día 7 en el grupo OVX+PC2.

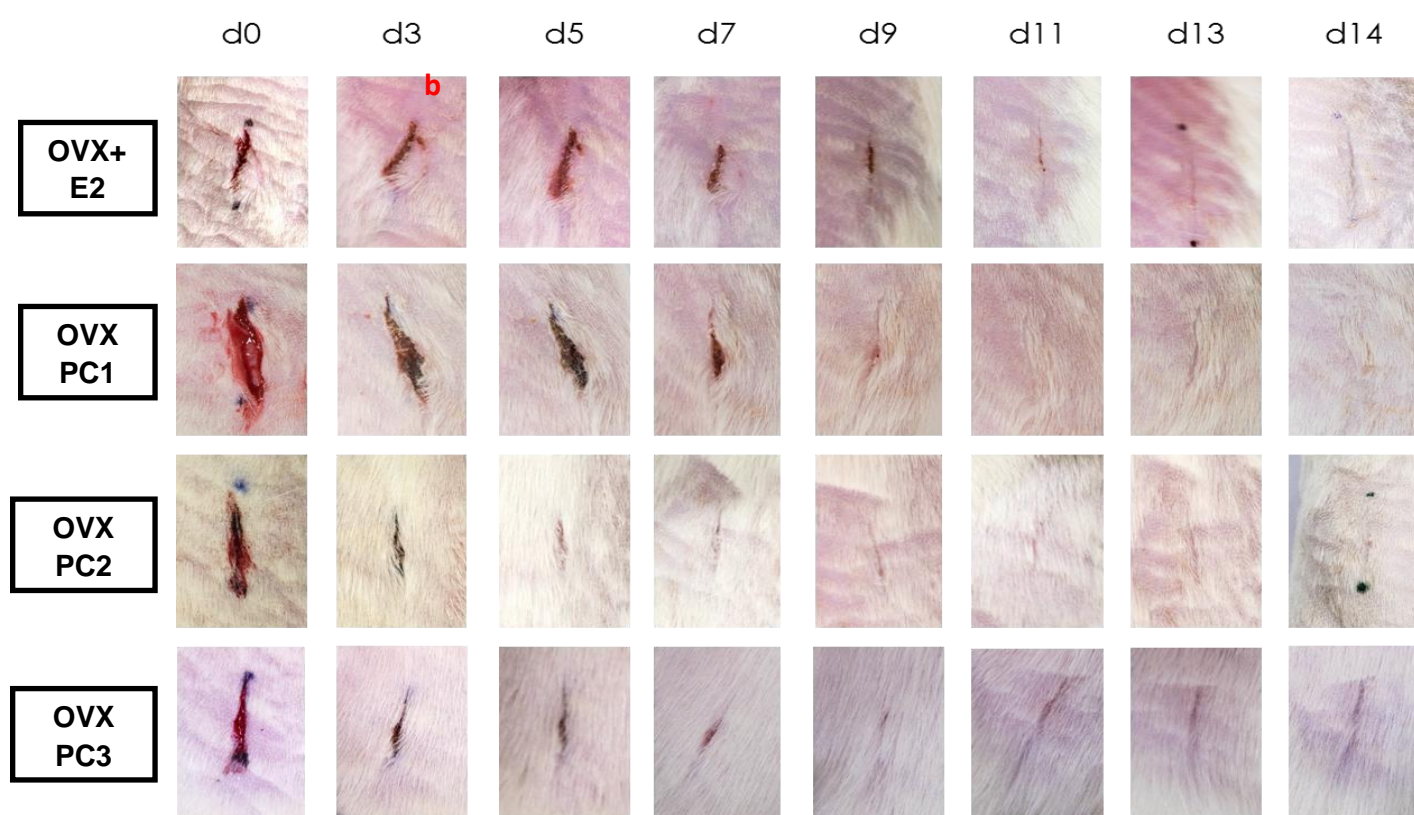


Figura 6.2. Macrofotografías de las laceraciones realizadas en los animales ovariectomizados tratados con estradiol (OVX+E2) y las tres dosis de colágeno (OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3). Progresión de laceraciones evaluadas al día 0, 3, 5, 7, 9, 11 y 14 post-lesión.

Estas observaciones fueron confirmadas en el análisis cuantitativo de la tasa de cierre de heridas (figura 6.3). Al día 3 post-laceración, el grupo SHAM logra una tasa de cierre de herida cercana al 50% ($47.7 \pm 6.2\%$), el cual se mantiene constante al día 5 post-laceración, y aumenta significativamente al día 7 ($p < 0.05$) y día 9 ($p < 0.05$) post-laceración, donde esta cierra completamente. En cambio, en el grupo OVX+VH el área de las heridas son similares en los días 3 ($33.4 \pm 4.9\%$) y 5 ($42.6 \pm 3.2\%$) post-laceración, y recién a partir del día 7 la tasa de cierre de heridas aumenta significativamente ($p < 0.05$) logrando una tasa de cierre de herida superior al 50%. Sin embargo, la laceración cierra completamente recién al día 11 post-laceración. Comparando entre ambos grupos, el área de la herida es mucho menor en el grupo SHAM a los días 3, 5, 7 y 9 post-laceración ($p < 0.005$). No se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos a partir del día 11 post-laceración.

La administración de estrógeno a los animales ovariectomizados (OVX+E2) demuestran un patrón similar al observado en el grupo OVX+VH, donde recién al día 7 post-laceración la tasa de cierre de heridas aumenta significativamente ($p < 0.05$) logrando una tasa superior al 50% ($55.9 \pm 5.7\%$). De la misma manera, recién al día 11 post-laceración la laceración cierre completamente. No se encuentran diferencias significativas entre el grupo OVX+E2 y OVX+VH.

La administración de la primera dosis de colágeno (PC1) muestra una tasa de cierre de heridas similar al observado en el grupo OVX+VH en los días 3 y 5 post-laceración. Sin embargo, logra un aumento de la tasa de cierre de heridas superior al 50% al día 7 post-laceración ($p < 0.005$ respecto al OVX+VH) con un subsecuente aumento al día 9 post-laceración ($p < 0.005$ respecto al OVX+VH), donde la laceración cierra por completo. La administración de PC2 muestra una tasa de cierre de heridas similar al OVX+VH al día 3 post-laceración. Sin embargo, al día 5 post-laceración aumenta la tasa de cierre de heridas logrando una tasa superior al 50% ($p < 0.05$), la cual se mantiene similar al día 7 post-laceración, aumentando nuevamente al día 9, donde las laceraciones cierran por completo. Comparado al OVX+VH se observa que la administración de PC2 presenta una

menor área de heridas en los días 5 y 9 post-laceración ($p < 0.05$). La administración de PC3 muestra una tasa de cierre de heridas superior al 50% desde el día 3 post-laceración, el cual se mantiene constante al día 5, con un posterior aumento al día 7 y 9 post-laceración ($p < 0.05$). Las laceraciones se consideran completamente cerradas a partir del día 9 post-laceración. Comparado al grupo OVX+VH, se observa que la administración de PC3 presenta una menor área de heridas en los días 3, 5, 7 y 9 post-laceración ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas en la tasa de cierre de heridas entre el grupo SHAM y las tres dosis de colágeno administradas.

Al comparar la eficacia de las tres dosis de colágeno administradas se observa que no existen diferencias significativas entre PC1 y PC2. Sin embargo, la administración de PC3 presentó una menor área de herida comparado a PC1 en los días 3 ($p < 0.05$) y 5 ($p < 0.01$) post-laceración, y comparado a PC2 en los días 3 ($p < 0.001$) y 7 ($p < 0.005$) post-laceración.

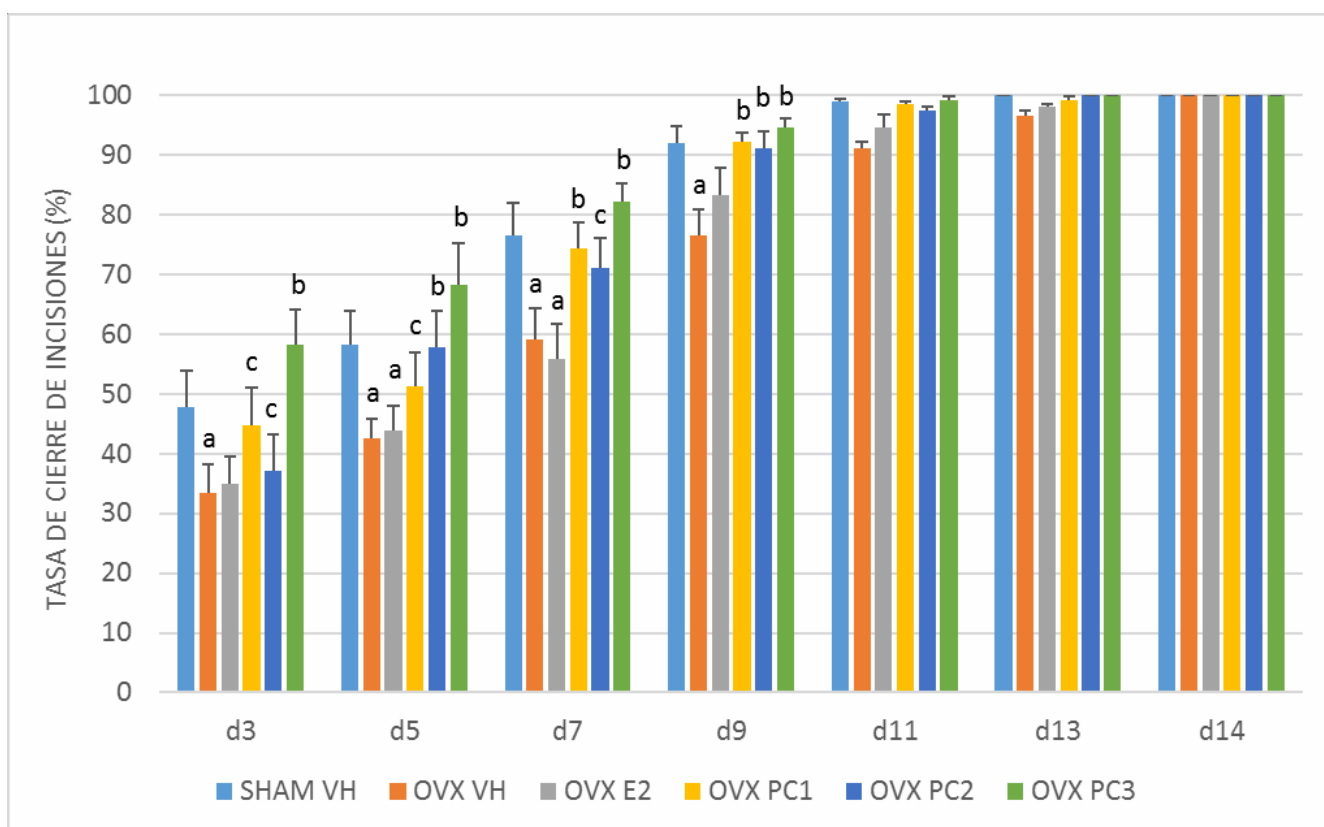


Figura 6.3 Evaluación de la tasa de cierre de heridas (incisiones) en los días 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 14 post-laceración. Tasa de cierre de heridas al día 0 equivale al 0%. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.005$ respecto al grupo SHAM; b, $p < 0.005$ respecto al grupo OVX+VH; c, $p < 0.005$ respecto al grupo OVX+PC3.

6.2 Análisis microscópico de incisiones:

Las laceraciones fueron analizadas de forma microscópica a los días 7 y 14 post-laceración. La medición del grosor de herida nos permite evaluar el cierre de la laceración de forma macroscópica, donde una herida con un grosor menor a 2000 μm es considerada como cerrada. Al día 7 post-laceración se observa que el grupo SHAM presenta un grosor menor a 2000 μm ($1751.9 \pm 176 \mu\text{m}$) mientras que el grupo OVX+VH presenta un grosor de $2120.5 \pm 212.4 \mu\text{m}$. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos. Por otro lado, los grupos ovariectomizados tratados con estradiol, PC1, PC2 y PC3 presentan un menor grosor de herida comparado con el grupo OVX+VH ($p < 0.05$). Al día 14 post-laceración, todos los grupos disminuyen el grosor de herida ($p < 0.01$). Nuevamente, los grupos tratados con E2, PC1, PC2 y PC3 presentan un menor grosor de herida en comparación del OVX+VH ($p < 0.05$).

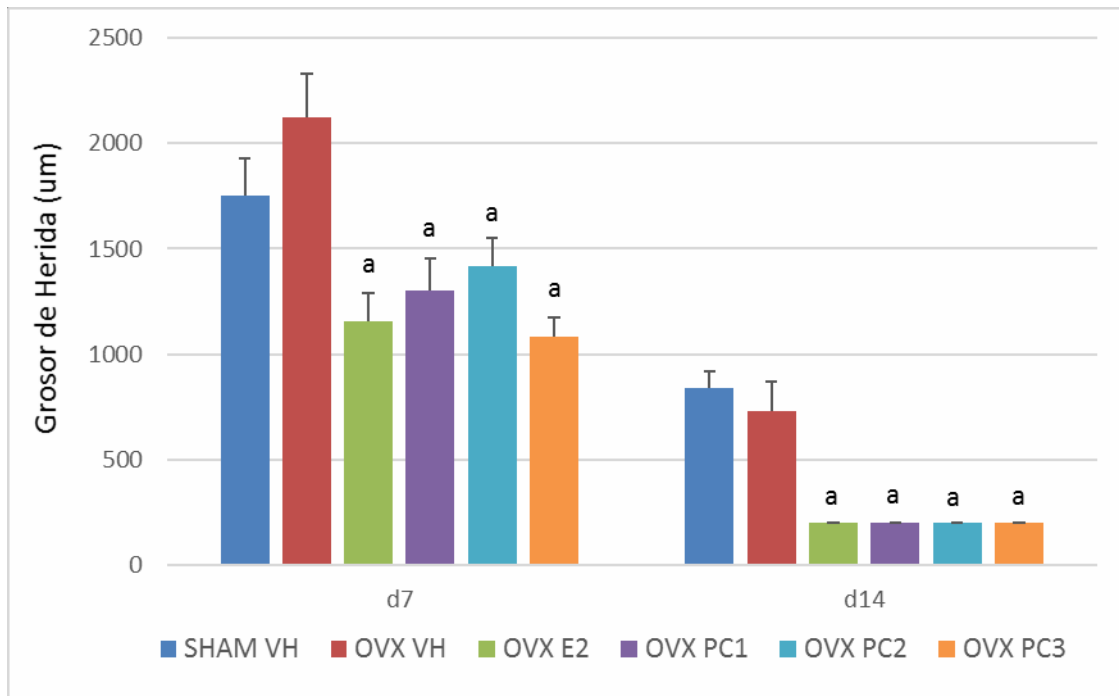
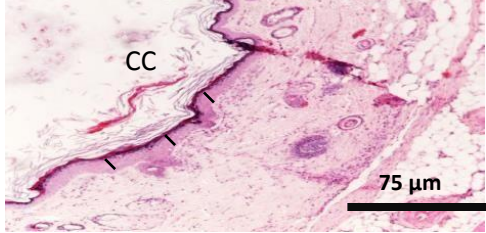
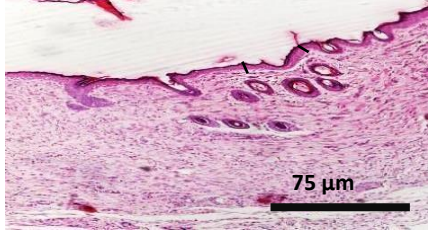

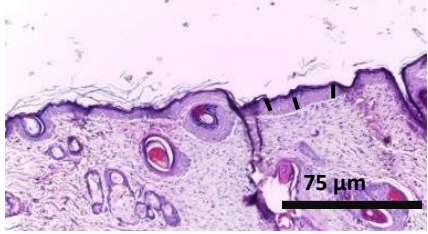
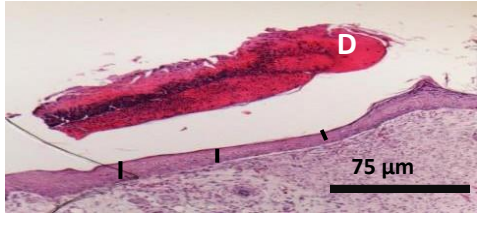
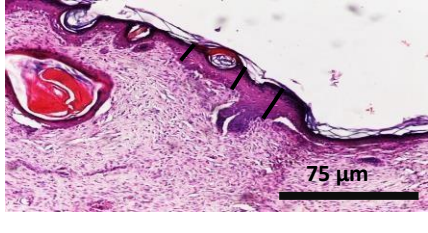
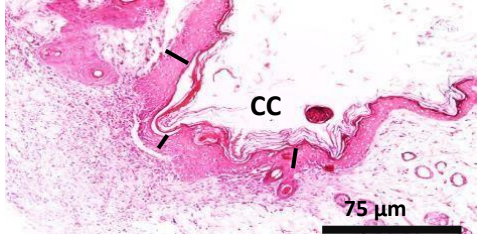
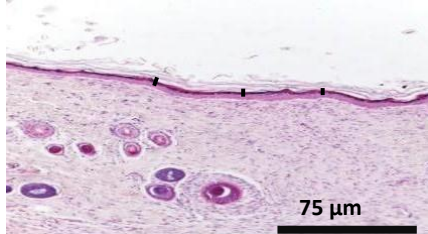
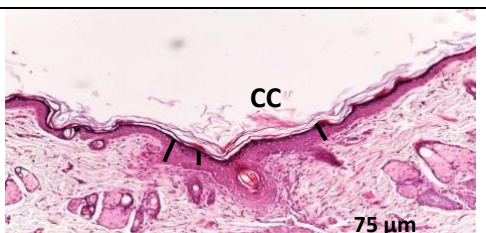
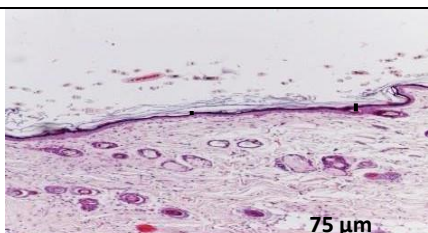


Figura 6.4 Análisis microscópico del grosor de herida (incisiones) al día 7 y 14 post-lesión.

Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.05$ respecto a OVX+VH.

La evaluación microscópica del grosor epidérmico en la zona de incisión se puede observar en la figura 6.5. Al día 7 post-laceración, comparando al grupo SHAM vs OVX+VH se observa que el grupo OVX+VH presenta un notable incremento del grosor epidérmico. Se puede observar además la presencia de debris en los grupos OVX+VH y OVX+E2, mientras que los grupos tratados con las tres dosis de colágeno ya muestran un desarrollo de la capa córnea (CC), similar al observado en el grupo SHAM. Al día 14 post-laceración se observa en todos los grupos una notable recuperación del grosor de la epidermis. Entre los grupos de tratamiento, las laceraciones tratadas con las tres dosis de colágeno (OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3) presentaron un menor grosor epidérmico respecto a las laceraciones tratadas con vehículo (OVX+VH).

GROSOR EPIDÉRMICO		
	DÍA 7	DÍA 14
SHAM		
OVX+VH		
OVX+E2		
OVX+PC1		
OVX+PC2		

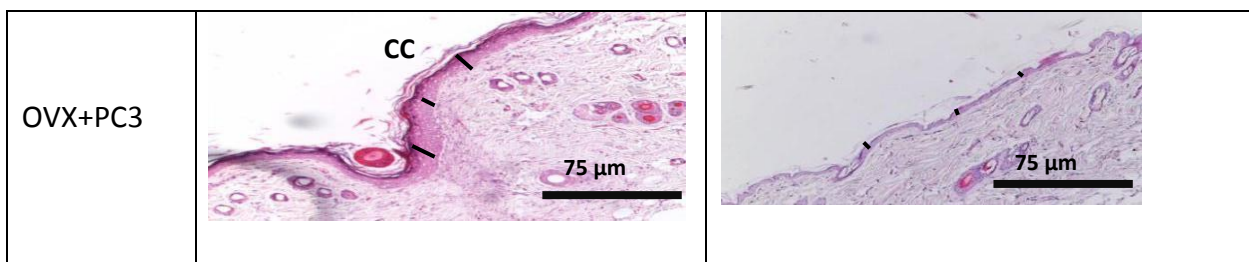


Figura 6.5 Microfotografías representativas de las laceraciones al día 7 y 14 post-laceración. Observado a un aumento de 10x, tinción eosina & hematoxilina. Las líneas negras indican el grosor de la epidermis (hiperplasia epidérmica). D, debris; CC, capa córnea.

El análisis cuantitativo del grosor de la epidermis indica que todos los grupos presentan un aumento del grosor epidérmico producto de la laceración, comparado con el grosor normal de la piel ($p < 0.001$; grosor de epidermis no lacerada, 21.08 μm para animales SHAM y 37.7 μm para animales ovariectomizados). Al día 7 post-laceración, se observó que el grupo SHAM presentó un menor grosor epidérmico en comparación con el grupo OVX+VH ($p < 0.001$). El tratamiento de los animales ovariectomizados con estradiol y las tres dosis de colágeno disminuyen significativamente el grosor epidérmico en comparación al vehículo ($p < 0.001$). Esta restauración del grosor epidérmico fue incluso más eficiente que la observada en el grupo SHAM ($p < 0.005$, Figura 6.6). No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con estradiol y las tres dosis de colágeno administradas.

Al día 14 post-laceración, todas las laceraciones disminuyeron el grosor epidérmico ($p < 0.001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento.

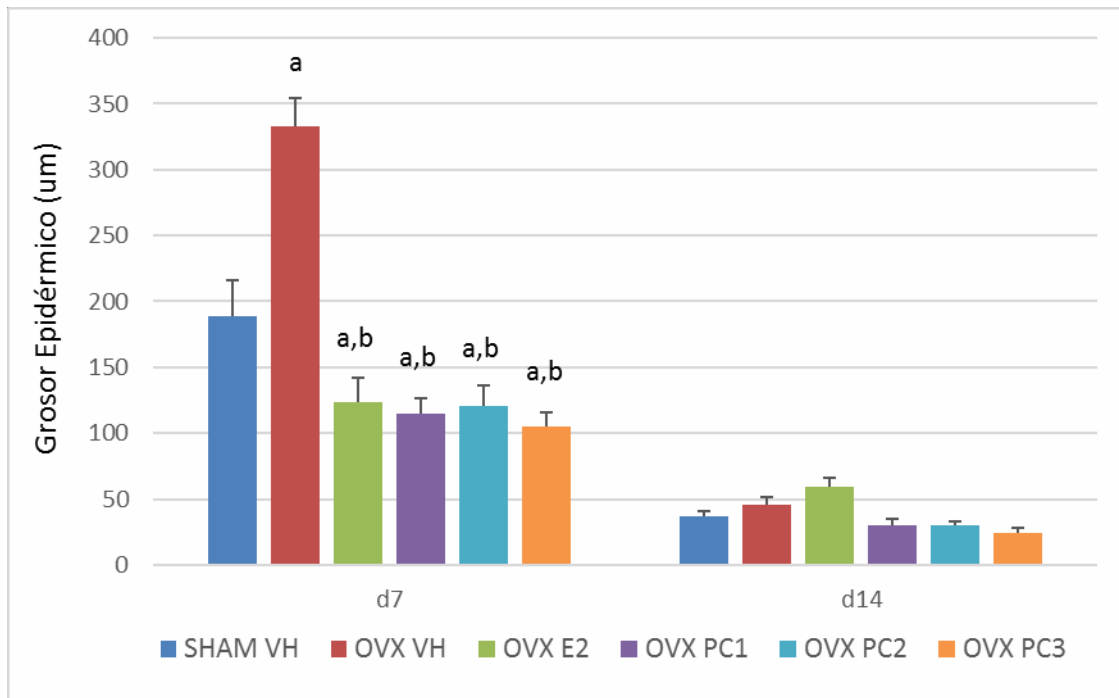
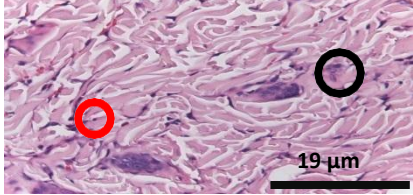
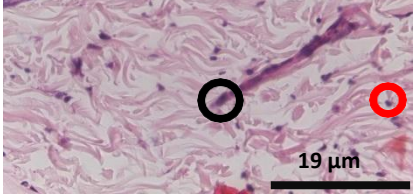
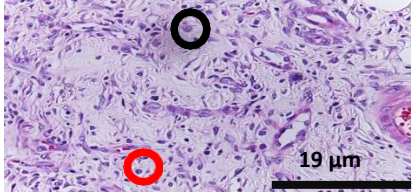
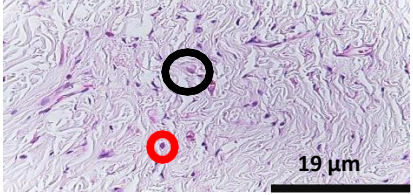
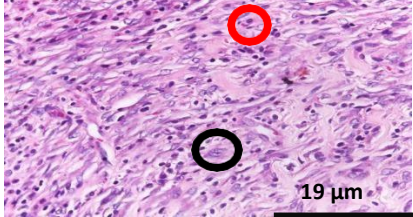
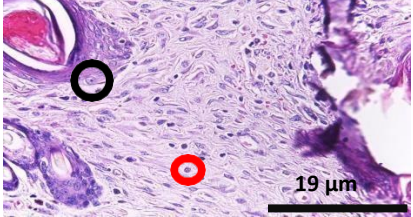
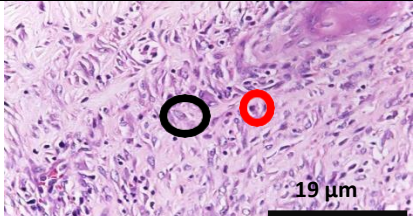
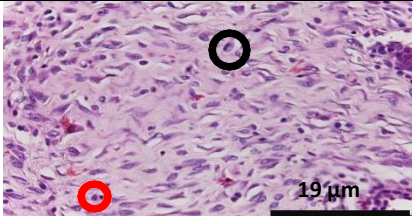
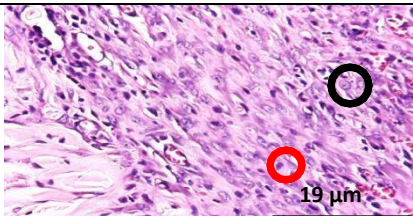
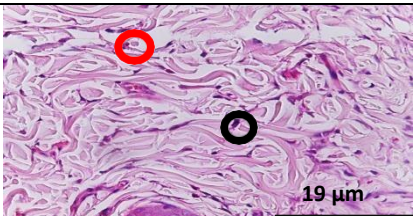


Figura 6.6 Análisis microscópico del grosor epidérmico de la zona de laceración (incisiones) al día 7 y 14 post-lesión. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.005$ respecto al SHAM+VH; b, $p < 0.001$ respecto al OVX+VH.

Las microfotografías del conteo de células inflamatorias (Figura 6.7) muestran que la laceración de la piel incrementa el número de neutrófilos y macrófagos en la zona de laceración. Al día 7 post-lesión todos los tratamientos muestran una mayor cantidad de células inflamatorias al ser comparadas con piel sana (no lacerada). Al día 14 post-lesión se observa una disminución del número de células inflamatorias en comparación al día 7.

CELULAS INFLAMATORIAS		
	DÍA 7	DÍA 14
PIEL SANA		
SHAM		
OVX+VH		
OVX+E2		
OVX+PC1		

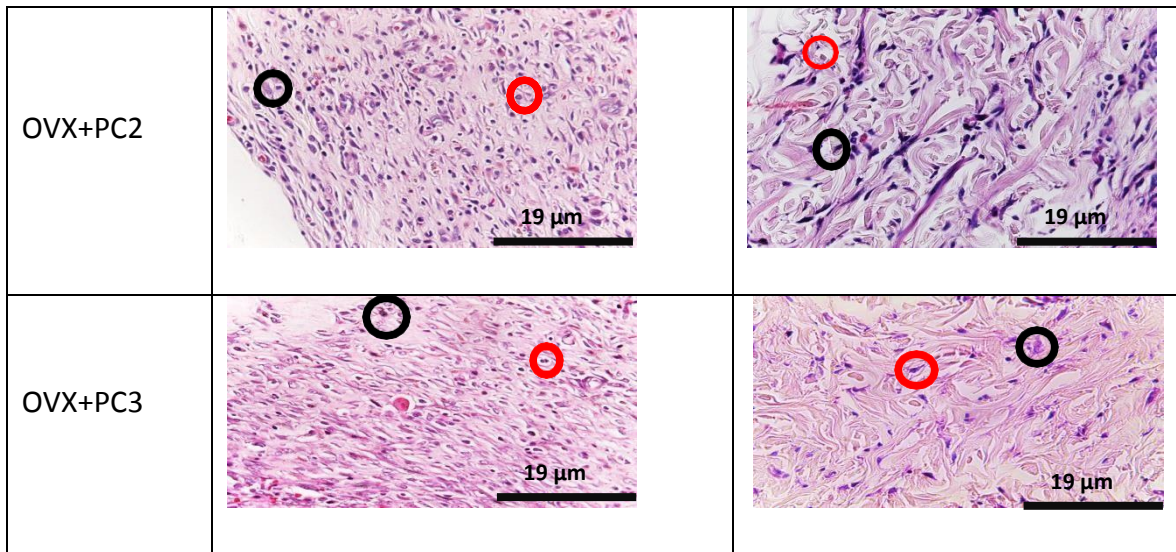


Figura 6.7 Microfotografías representativas de células inflamatorias al día 7 y 14 post laceración. Observado a un aumento de 40x, tinción eosina & hematoxilina. Los círculos negros representan los macrófagos, los círculos rojos representan a los neutrófilos.

El análisis cuantitativo de las células inflamatorias demostró que la laceración de la piel incrementó el número de neutrófilos en la zona lacerada en todos los grupos (comparado a valor de neutrófilos en piel no lacerada, 3.67 ± 0.51 para animales intactos y 10 ± 0.75 para animales ovariectomizados). Al día 7 post-laceración, todos los grupos de evaluación presentaron valores incrementados de neutrófilos en comparación con piel no-lacerada ($p < 0.05$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Al día 14 post-laceración, el grupo SHAM fue similar a los valores basales de neutrófilos en la zona de laceración. El resto de grupos ovariectomizados mantuvo aún valores elevados de neutrófilos ($p > 0.05$) sin diferencias significativas entre ellos (Figura 6.8).

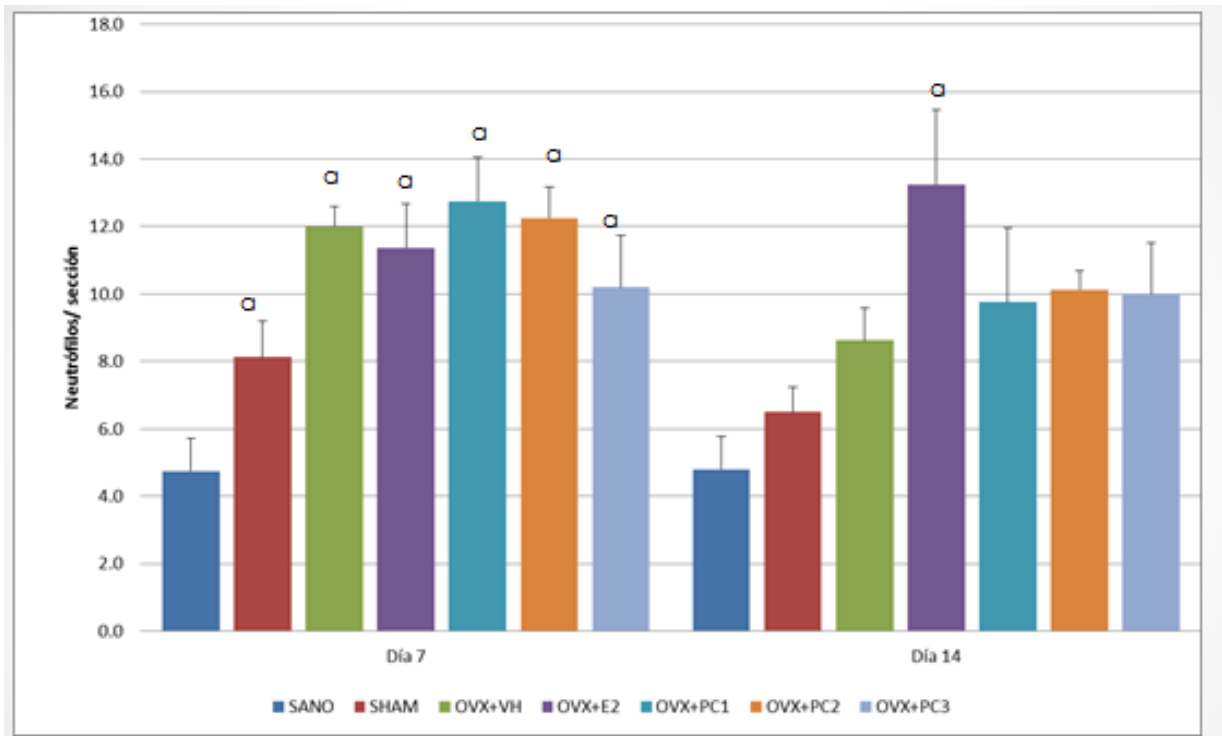


Figura 6.8 Conteo de neutrófilos en la zona de laceración al día 7 y 14 post-lesión. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.05$ respecto a Sano

La laceración de la piel incrementó el número de macrófagos en la zona lacerada en todos los grupos (comparado a valor de macrófagos en piel no lacerada, 5.41 ± 0.86 para animales intactos y 13.5 ± 0.52 para animales ovariectomizados). Al día 7 post-laceración, todos los grupos de evaluación presentaron valores incrementados de macrófagos en comparación con piel no-lacerada ($p < 0.005$). No se encontraron diferencias significativas

entre el SHAM y el OVX+VH. Sin embargo, el número de macrófagos fue significativamente menor en los animales ovariectomizados cuando estos recibieron tratamiento con estradiol ($p < 0.001$), PC1 ($p < 0.005$), PC2 ($p < 0.005$) y PC3 ($p < 0.05$). Al día 14, los grupos SHAM y OVX+VH disminuyeron el número de macrófagos en la zona de laceración ($p < 0.01$). No se encontraron diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento. Sin embargo, el número de macrófagos retornó a valores basales en los grupos SHAM y OVX+PC3 (Figura 6.9).

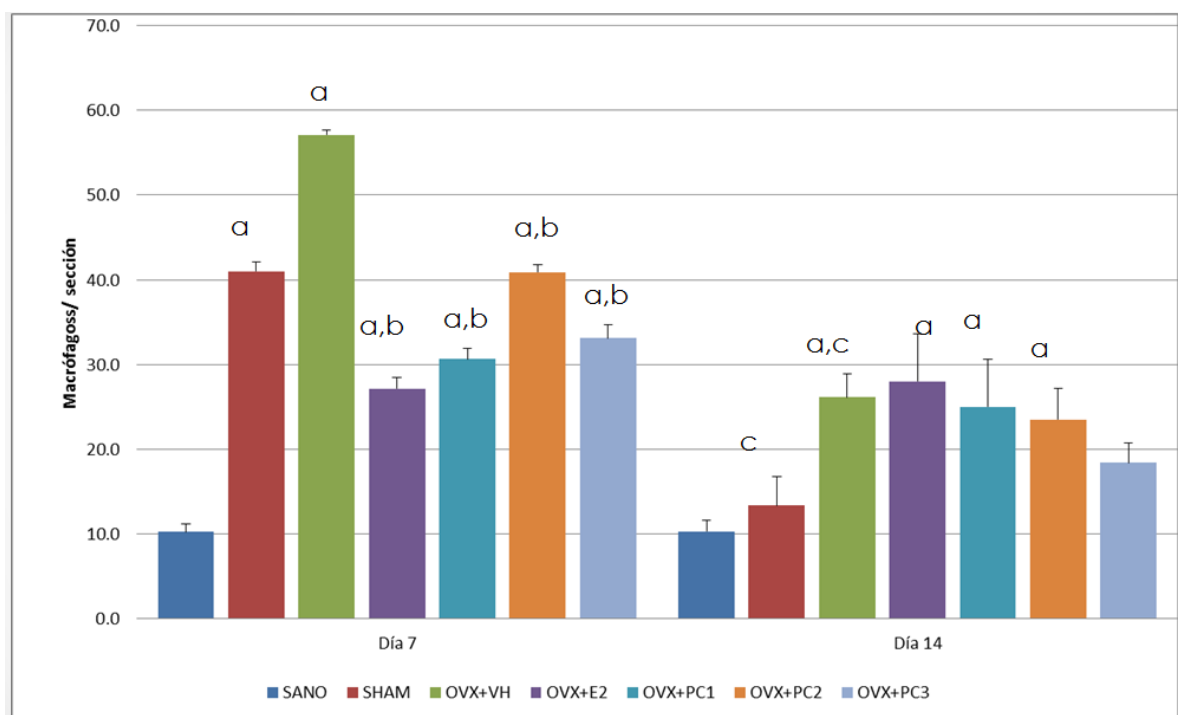


Figura 6.9 Conteo de macrófagos en la zona de laceración al día 7 y 14 post-lesión. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.05$ respecto a sano; b : $p < 0.05$ respecto a OVX+VH y c, $p < 0.05$ respecto al mismo tratamiento al día 7

6.3 Análisis macroscópico de escisiones:

Al igual que en la evaluación de las incisiones, la progresión del cierre de heridas en las escisiones se realizó en los días 0, 5, 7, 9, 11 y 14 post lesión. En las macrofotografías (Figura 6.10) se observa la progresión del cierre de herida en el grupo de animales intactos (SHAM) y en el grupo ovariectomizado (OVX+VH). Al día 11 el grupo SHAM muestra un mayor cierre de herida que el grupo OVX+VH, quien aún muestra la presencia de costra sobre la herida. Al día 14 post-laceración se observa que el grupo SHAM presenta una cicatriz casi imperceptible, mientras el grupo OVX+VH aún cuenta con la presencia de costra.

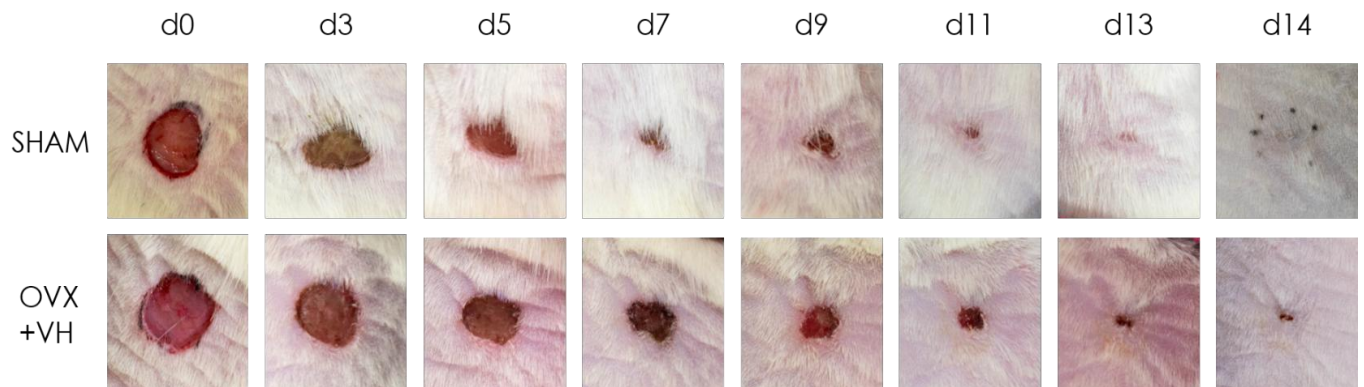


Figura 6.10 Macrofotografías de las heridas de los grupos SHAM y OVX+VH. Progresión de heridas evaluadas al día 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 14 post-laceración.

La figura 6.11 muestra la progresión del cierre de heridas en los diferentes grupos ovariectomizados que recibieron tratamiento. Se puede observar que los diferentes tratamientos aceleran el cierre de las heridas comparado con el grupo que solo recibió vehículo. Al día 11 post-laceración, se observa que los grupos que recibieron los tratamientos con el péptido de colágeno, PC2 y PC3 muestran una menor área de herida en comparación con los otros tratamientos. Finalmente, para el día 14 post-laceración, se

observa que, si bien todas las heridas se encuentran cerradas en su totalidad, los tratamientos con PC2 y PC3 presentan una cicatriz casi imperceptible.

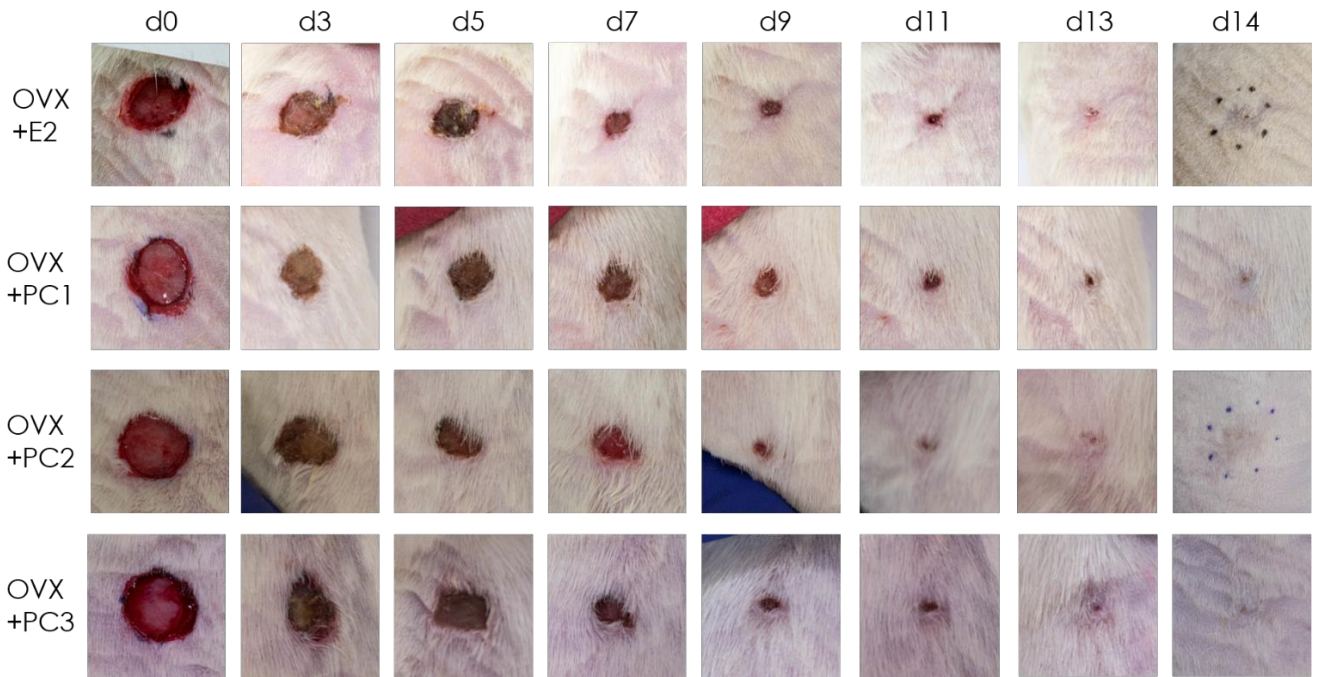


Figura 6.11 Macrofotografías de las heridas de los grupos OVX+E2, OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3. Progresión de heridas evaluadas al día 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 14 post-laceración.

El análisis cuantitativo de las escisiones, calculado a través de la tasa de cierre de heridas demostró que al día 3 el grupo SHAM presentó una tasa de cierre de heridas cercana al 50% ($49.4 \pm 4.3\%$), en comparación del grupo OVX+VH el cual fue significativamente menor ($36.5 \pm 6.1\%$, $p < 0.05$). El grupo SHAM mantuvo una tasa similar al día 5 post-laceración, con un posterior aumento significativo al día 5, 7, 9 y 11 post-laceración ($p < 0.01$). Por otro lado, el grupo OVX+VH aumentó significativamente la tasa de cierre de heridas del día 3 al día 5, superando el 50%, y un posterior aumento al día 7 y 9 post-laceración. En ambos grupos, la herida se consideró cerrada en el día 11 post-laceración (Figura 6.12).

La administración de los diferentes tratamientos a los animales ovariectomizados no produjo ningún efecto al día 3 post-laceración, con excepción del grupo OVX+PC3. Este grupo tuvo valores similares al SHAM, los cuales se mantuvieron constantes al día 5 post-laceración y con un aumento significativo a los días 5, 7 y 9 post-laceración ($p < 0.001$). Al comparar los diferentes grupos tratamiento se observó que al día 3 post-laceración no se encontraron diferencias significativas entre el OVX+VH y los tratamientos con E2, PC1, PC2 o PC3. Sin embargo, se observó que tanto OVX+PC2 y OVX+PC3 mostraron una mayor tasa de cierre de heridas comparado con PC1 ($p < 0.001$). Al día 5 post-laceración, el tratamiento con PC2 fue aquel que logró una mayor tasa de cierre de heridas en comparación de OVX+PC1 ($p < 0.001$) y OVX+PC3 ($p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas posteriores a este punto.

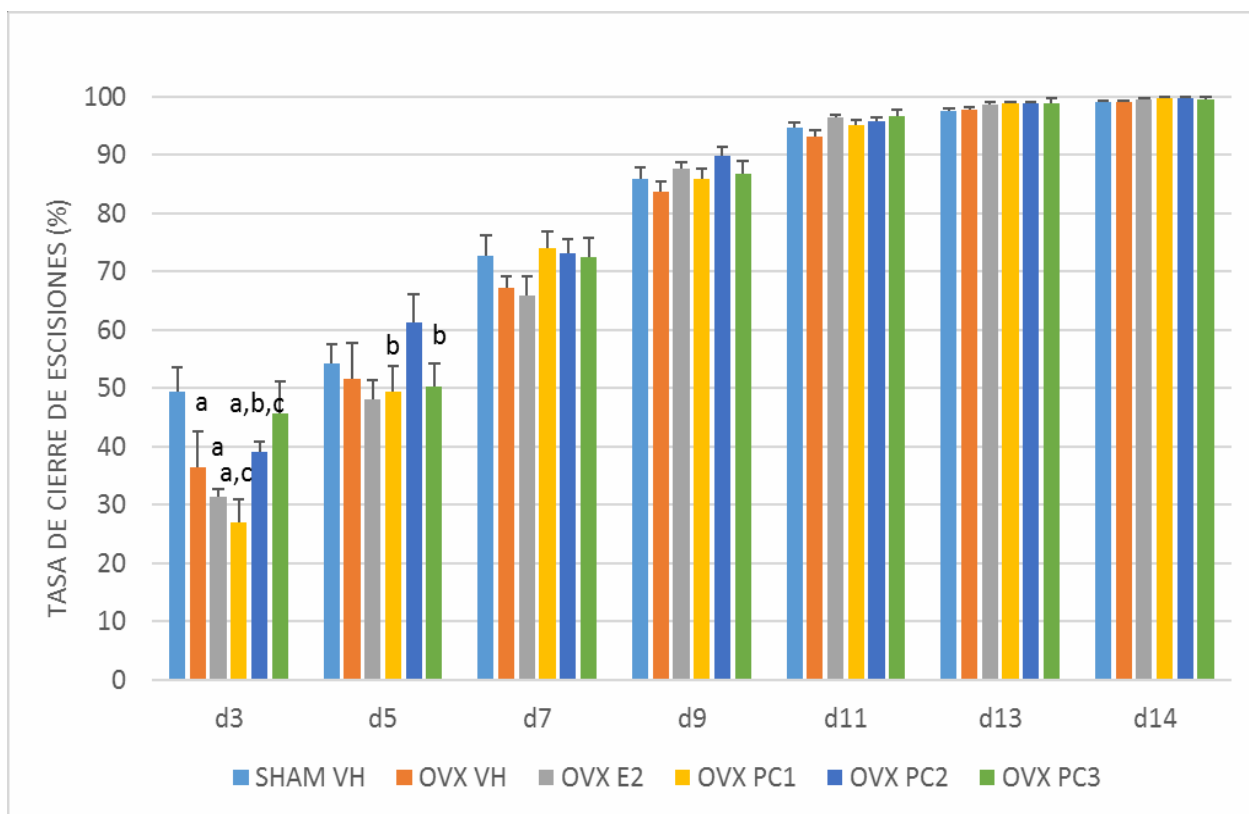


Figura 6.12 Evaluación de la tasa de cierre de heridas (escisiones) en los días 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 14 post-laceración. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH,

ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.05$ respecto a SHAM; b, $p < 0.05$ respecto a PC2; c, $p < 0.001$ respecto a PC3.

6.4 Análisis microscópico de escisiones

El análisis histológico de las laceraciones fue realizado al día 7 y 14 post-lesión. Las microfotografías de las laceraciones (Figura 6.13) muestran que el grupo SHAM presenta un menor grosor de herida al día 7 post-laceración en comparación del grupo OVX+VH. El tratamiento de los animales ovariectomizados con estradiol no mostró un efecto en el grosor de la laceración al día 7 post-laceración. El tratamiento con las tres dosis de colágeno redujo el grosor de herida respecto a las laceraciones. Sin embargo, en este punto todas las laceraciones aún se encuentran en fase proliferativa, con una formación incompleta del tejido granuloso. Al día 14 post-laceración, el grosor de la herida del grupo OVX+VH fue similar al grupo SHAM. Entre los grupos ovariectomizados, el tratamiento con PC3 mostró tener un menor grosor de herida.

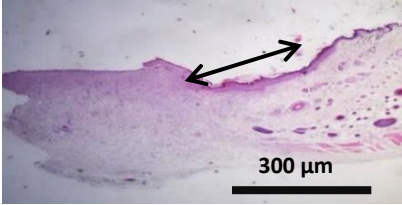
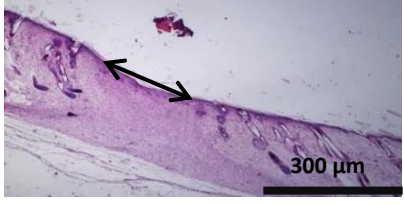
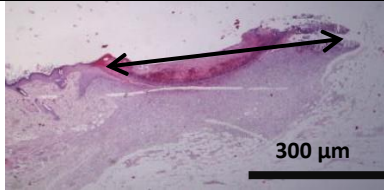
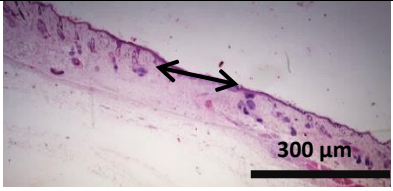
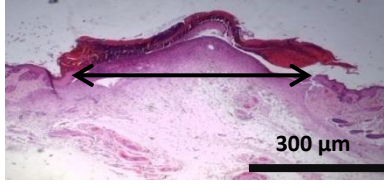
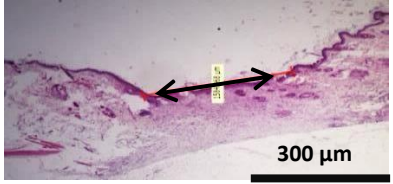


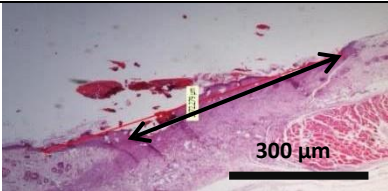
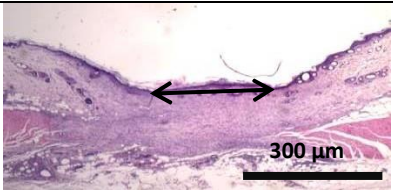
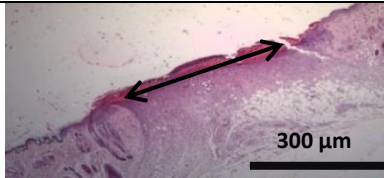
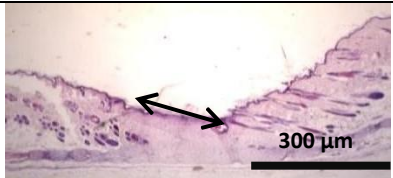
Grosor de herida		
	Día 7	Día 14
SHAM		
OVX+VH		
OVX+E2		
OVX+PC1		
OVX+PC2		
OVX+PC3		

Figura 6.13 Microfotografías representativas de las heridas al día 7 y 14 post-laceración.

Observado a un aumento de 40x, tinción eosina & hematoxilina. Las flechas negras delimitan el grosor de la herida

El análisis del grosor de herida se realizó los días 7 y 14 post-laceración (Figura 6.14). Al día 7 se puede observar que, similar a lo observado en el análisis macroscópico, el grupo SHAM posee un menor grosor de herida en comparación al grupo OVX+VH ($p < 0.005$). Entre los grupos ovariectomizados se puede observar que los grupos OVX+PC1 y OVX+PC2 presentaron un menor de grosor de herida comparado al OVX+E2 ($p < 0.005$).

Al día 14 post-laceración, los grupos OVX+VH, OVX+E2, OVX+PC2 y OVX+PC3 disminuyeron el grosor de herida en comparación al día 7 ($p < 0.001$). El grosor del grupo SHAM y OVX+PC1 se mantuvo constante. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos ovariectomizados. Sin embargo, los grupos OVX+PC2 y OVX+PC3 presentaron un menor grosor de herida comparado al SHAM ($p < 0.005$).

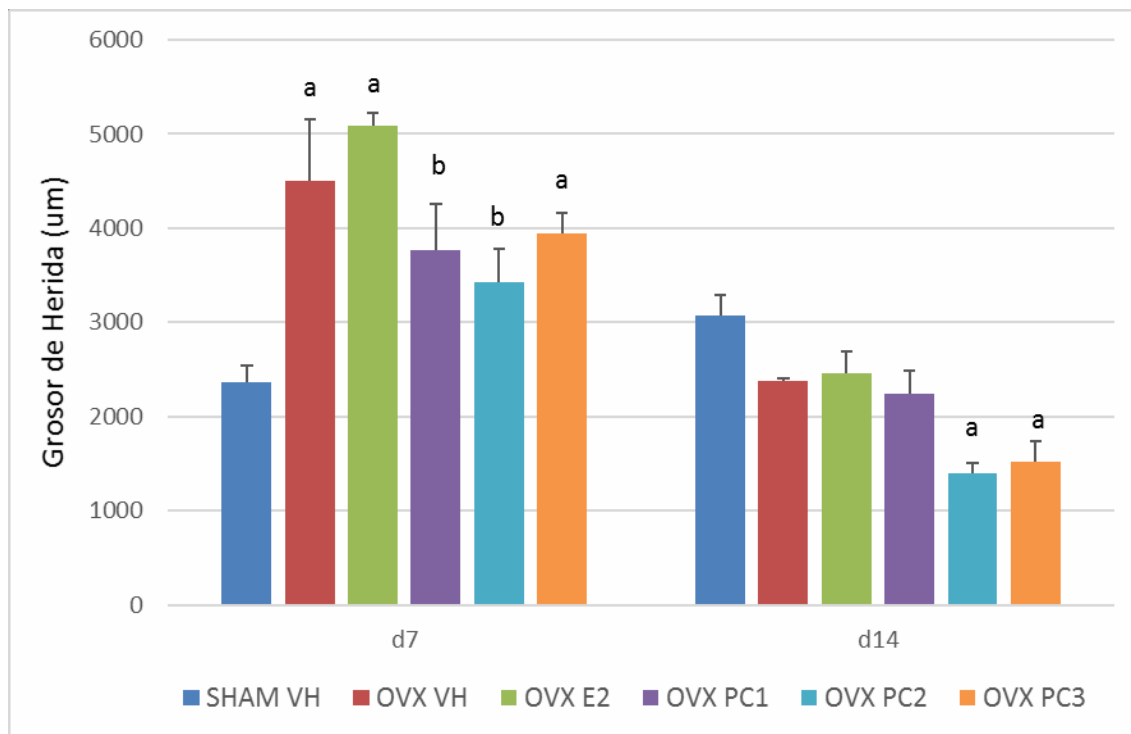


Figura 6.14 Análisis microscópico del grosor de herida al día 7 y 14 post-lesión. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.05$ respecto al grupo SHAM; b, $p < 0.05$ respecto al grupo OVX+E2.

En la figura 6.15 se presentan las imágenes histológicas donde se puede observar el grosor epidérmico de las laceraciones realizadas al día 7 y 14 post-lesión. Al día 7 las laceraciones tratadas con los tratamientos de colágeno (OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3) demostraron tener un menor grosor epidérmico respecto a las laceraciones tratadas con estradiol (OVX+E2) vía oral. Al día 14 los grupos OVX+E2, OVX+PC1 y OVX+PC2 mostraron tener una disminución del grosor epidérmico comparado con el día 7, sin embargo el grupo OVX+PC3 es el que tuvo un menor grosor epidérmico al igual que el grupo SHAM.

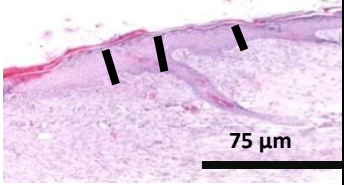
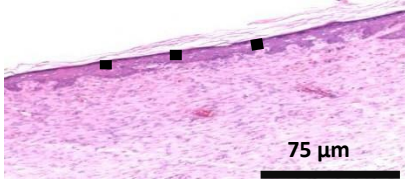
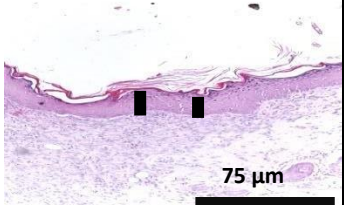
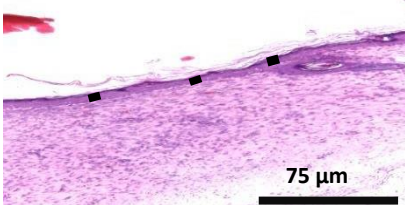
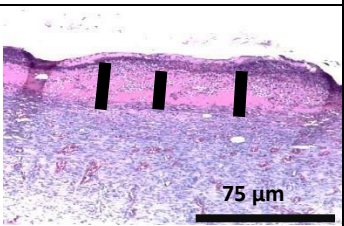
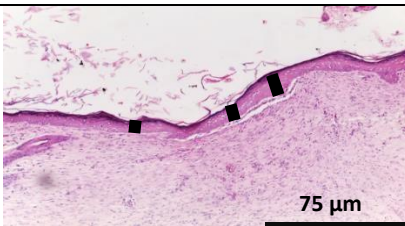
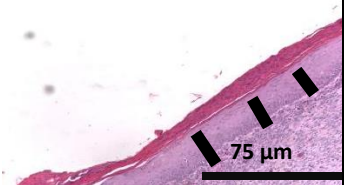
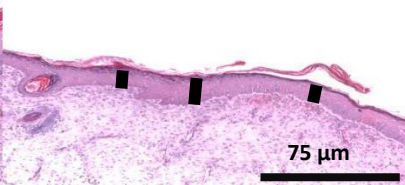
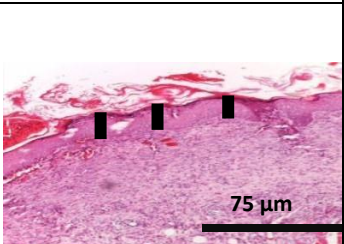
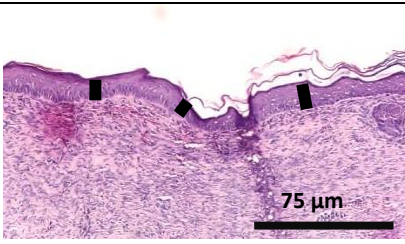
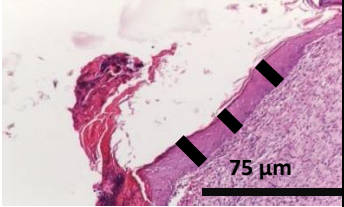
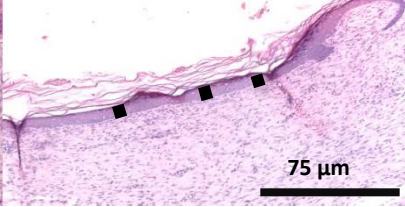
Hiperplasia epidérmica		
	Día 7	Día 14
Grupo SHAM		
Grupo OVX+VH		
Grupo OVX+E2		
Grupo OVX+PC1		
Grupo OVX+PC2		
Grupo OVX+PC3		

Figura 6.15 Microfotografías representativas de la zona de laceración al día 7 y 14 post-laceración. Observado a un aumento de 40x, tinción eosina & hematoxilina. Las líneas negras indican el grosor de la epidermis (hiperplasia epidérmica).

El análisis cuantitativo del grosor epidérmico mostró que al día 7 post-laceración no se observaron diferencias significativas entre los grupos SHAM y OVX+VH (Figura 6.16). Sin embargo, las heridas tratadas con estradiol (OVX+E2) presentaron un mayor grosor epidérmico en comparación con el grupo SHAM ($p < 0.001$), OVX+VH ($p < 0.001$), OVX+PC1 ($p < 0.001$), OVX+PC2 ($p < 0.001$) y OVX+PC3 ($p < 0.001$). Entre las tres dosis de colágeno administradas, los grupos OVX+PC2 y OVX+PC3 mostraron un menor grosor epidérmico en comparación con el grupo OVX+VH ($p < 0.001$), OVX+E2 ($p < 0.001$), OVX+PC1 ($p < 0.01$) e incluso menor al grosor epidérmico del grupo SHAM ($p < 0.001$).

En el día 14 post-laceración, todos los tratamientos disminuyeron el grosor epidérmico significativamente ($p < 0.001$) a excepción del grupo OVX+PC3. En este punto, los grupos OVX+PC2 y OVX+PC3 siguieron presentando un menor grosor epidérmico en comparación con el grupo OVX+PC1 ($p < 0.05$).

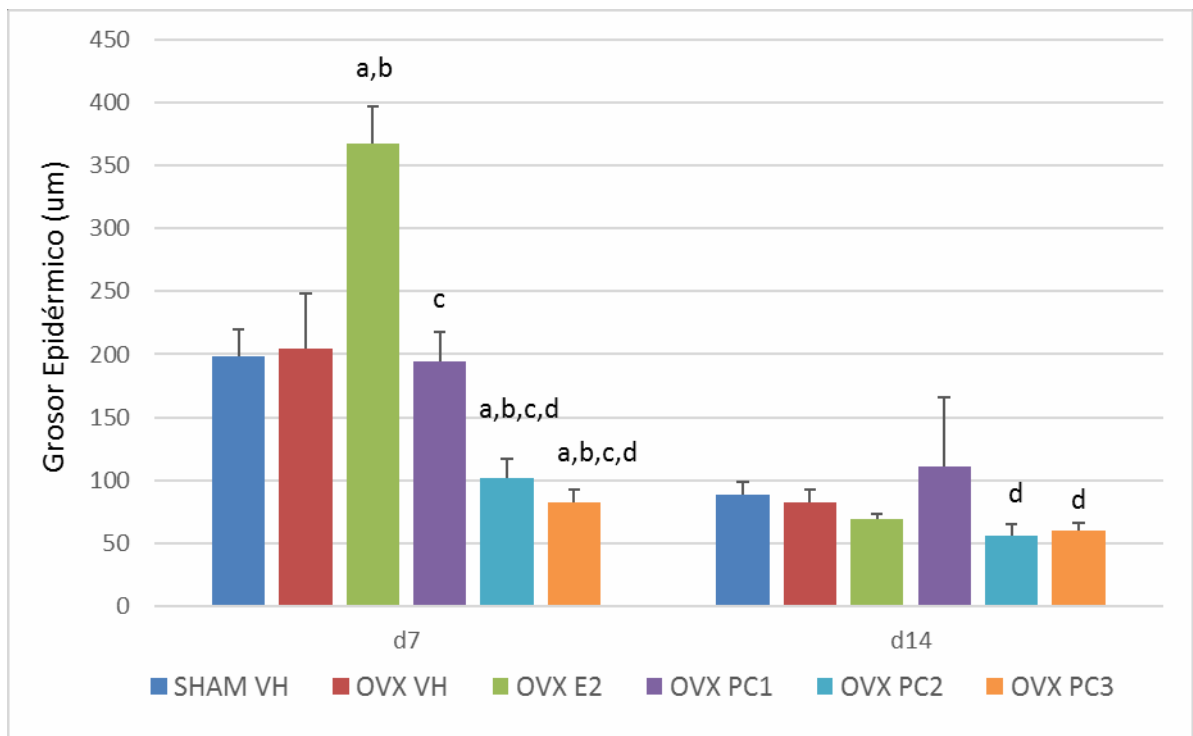


Figura 6.16 Análisis epidérmico del grosor epidérmico al día 7 y 14 post-lesión. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.001$ respecto al grupo SHAM; b, $p < 0.001$ respecto al grupo OVX+VH; c, $p < 0.001$ respecto al grupo OVX+E2; d, $p < 0.05$ respecto al grupo OVX+PC1.

El análisis cuantitativo de las células inflamatorias demostró que, similar a lo observado con las incisiones, el número de neutrófilos en la zona lacerada se encontró incrementado al día 7 post-laceración en todos los grupos (comparado a valor de neutrófilos en piel no lacerada, 3.67 ± 0.51 para animales intactos y 10 ± 0.75 para animales ovx). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo SHAM y OVX+VH. Comparando los grupos de tratamiento, se observó que el grupo OVX+PC1 presentó una menor cantidad

de neutrófilos en la zona de laceración en comparación del grupo OVX+PC2 ($p<0.05$). Ninguno de estos grupos tuvo una diferencia significativa con el grupo SHAM o el grupo OVX+VH (Figura 6.16). Al día 14, el grupo OVX+PC2 disminuyó significativamente el número de neutrófilos, en comparación con el día 7 ($p<0.05$). El resto de grupos mantuvo un número constante de neutrófilos en la zona lacerada. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento (Figura 6.17).

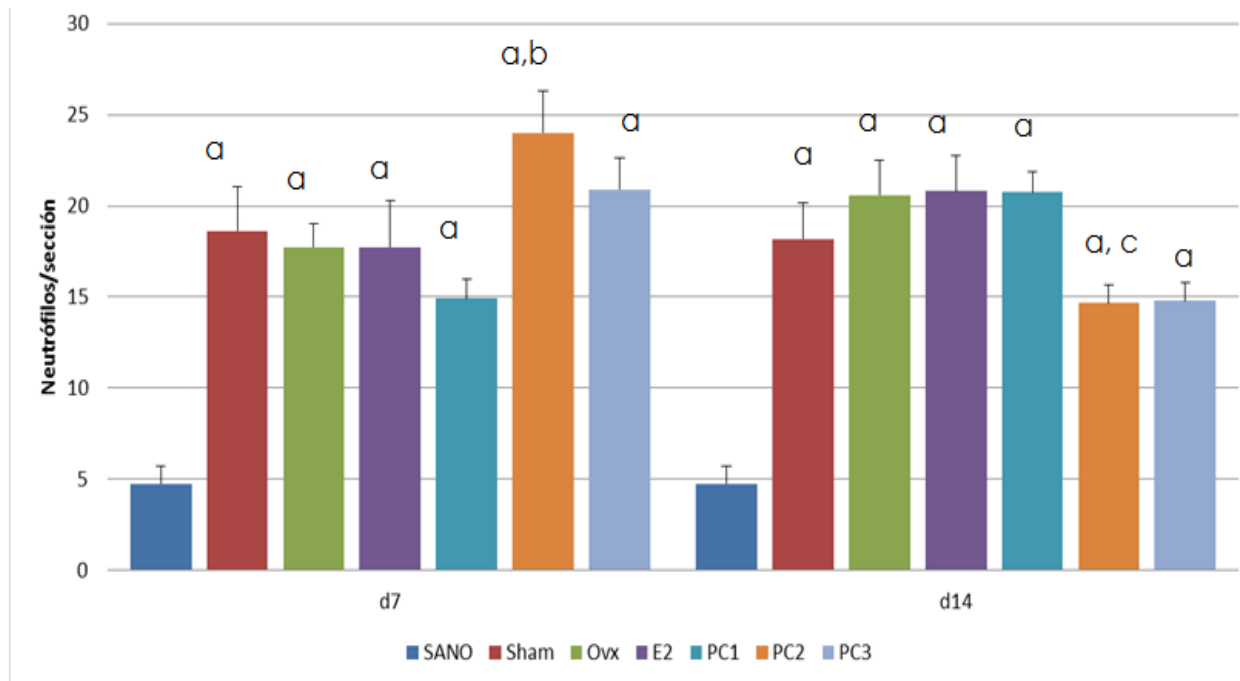


Figura 6.17 Conteo de neutrófilos por sección en el área de laceración al día 7 y 14 post-lesión. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p<0.05$ respecto a Sano; b, $p<0.05$ respecto al grupo PC1 y c, $p<0.05$ respecto al mismo tratamiento en día 7.

La laceración de la piel incrementó el número de macrófagos en la zona lacerada en todos los grupos (comparado a valor de macrófagos en piel no lacerada, 5.41 ± 0.86 para animales intactos y 13.5 ± 0.52 para animales ovx). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo SHAM y el grupo OVX+VH al día 7 post-laceración. Sin embargo, entre los grupos ovariectomizados se observó que el grupo OVX+VH presentó un mayor número de macrófagos en la zona lacerada en comparación al tratamiento con E2 ($p < 0.05$), PC1 ($p < 0.005$) y PC3 ($p < 0.001$). Además, el grupo OVX+PC3 presentó un menor número de macrófagos comparado al SHAM ($p < 0.05$). Al día 14 post-laceración, los grupos SHAM, OVX+VH y OVX+PC2 disminuyeron significativamente ($p < 0.005$) el número de macrófagos en comparación con el día 7. Sin embargo, en este punto no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento (Figura 6.18).

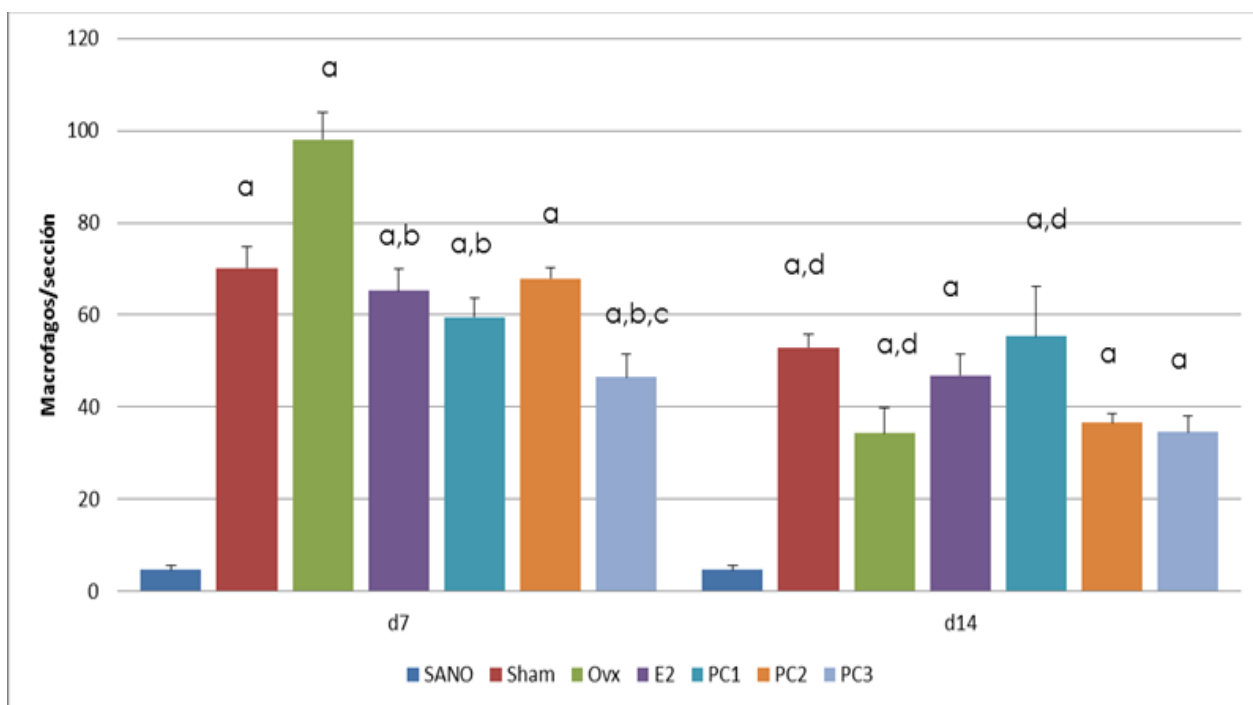
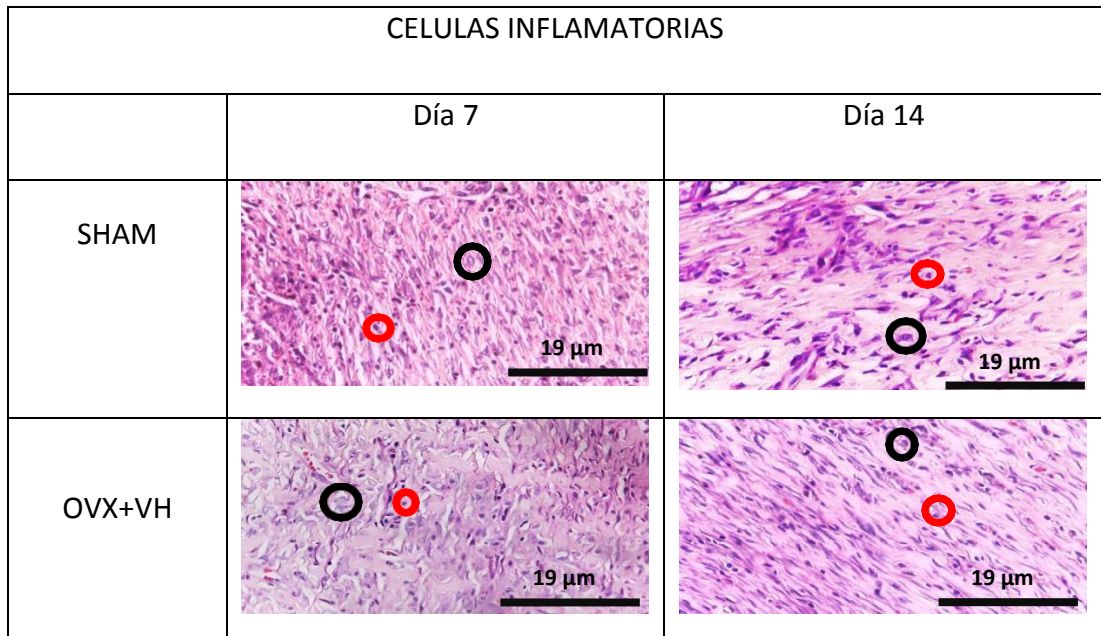


Figura 6.18 Conteo de macrófagos por sección en la zona de laceración al día 7 y 14 post-lesión. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con

vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.05$ respecto al grupo sano; b, $p < 0.05$ respecto al grupo SHAM; c, $p < 0.05$ respecto al grupo OVX+VH y d, $P < 0.05$ respecto al mismo tratamiento en día 7.

La figura 6.19 señala las microfotografías de la infiltración de células inflamatorias en la zona de laceración. Se puede observar que al día 7 post lesión todos los tratamientos muestran una mayor cantidad de células inflamatorias; sin embargo, el grupo OVX+PC3 muestra visiblemente una menor cantidad de inflamación en comparación con los otros tratamientos.



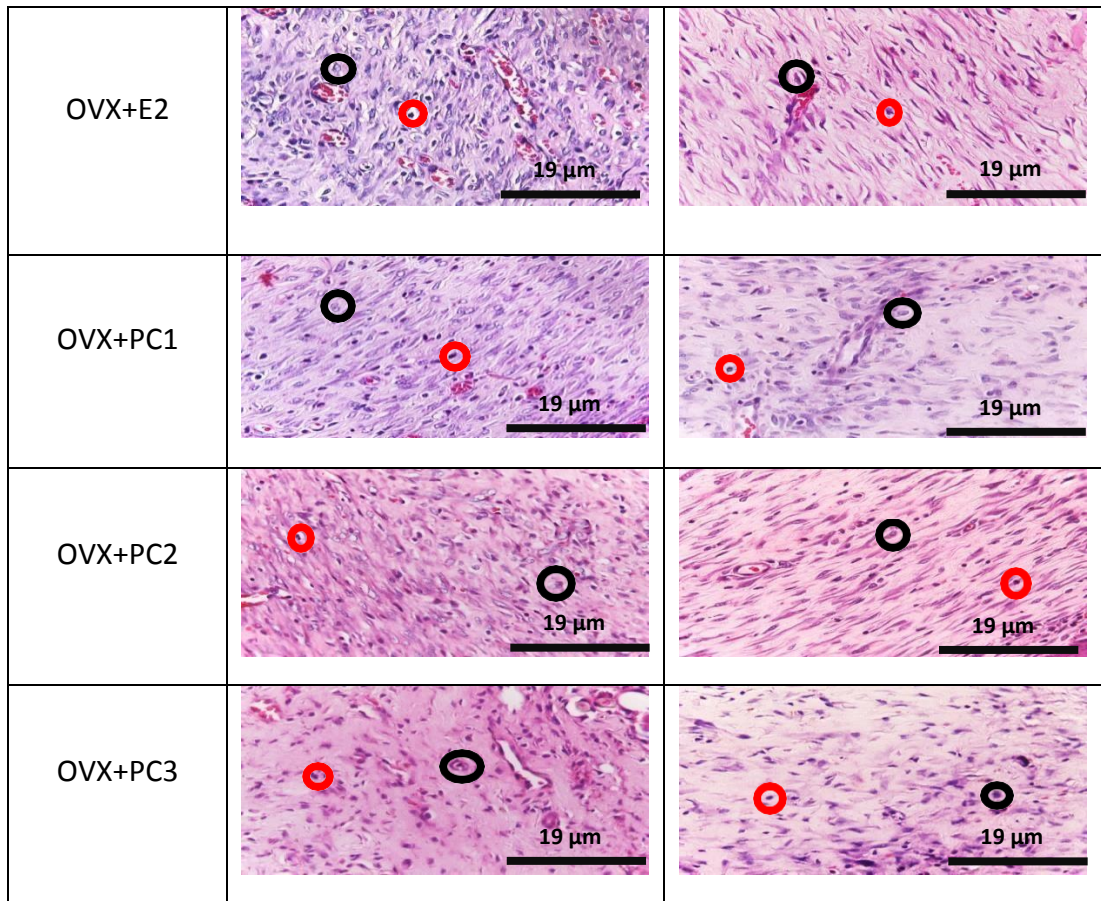


Figura 6.19 Microfotografías representativas de la infiltración de células inflamatorias al día 7 y 14 post-laceración. Observado a un aumento de 40x, tinción eosina & hematoxilina. Los círculos negros representan los macrófagos, los círculos rojos representan a los neutrófilos.

6.4 Orientación de fibras de colágeno:

La figura 6.20 muestra la orientación de las fibras de colágeno de piel sana (no lacerada) en animales SHAM y ovariectomizados. Se puede apreciar que, en ambos casos, la orientación de estas fibras es en forma de onda o de red.

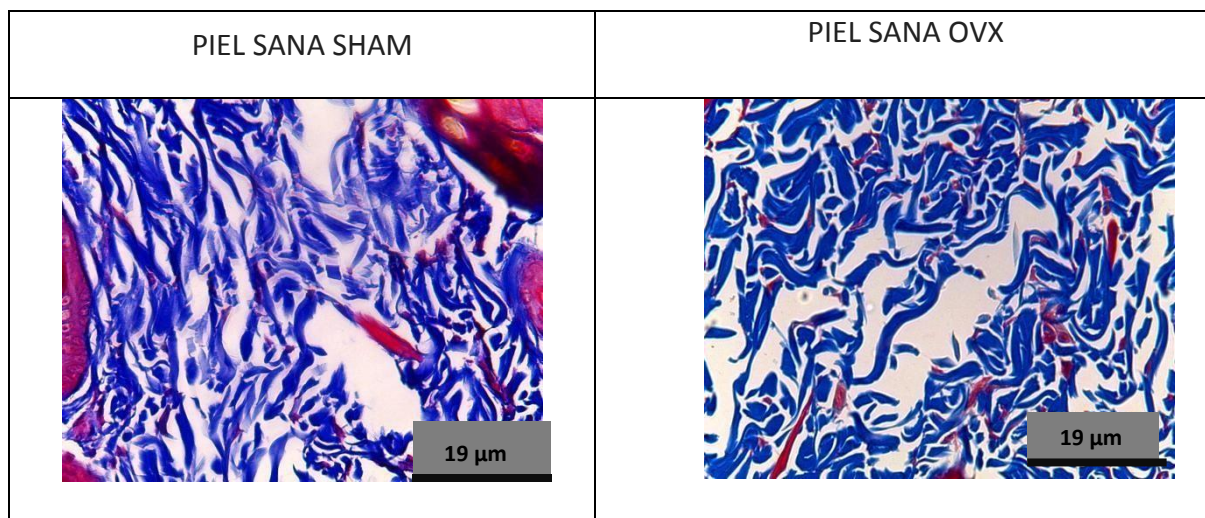


Figura 6.20 Microfotografías de piel sana (no lacerada) en animales SHAM y OVX.

Observado a una magnificación de 40x. Tinción tricromía de Masson.

Las laceraciones generaron una alteración en la distribución y alteración de las fibras de colágeno. Sin embargo, se observa que al día 7 post-laceración el grupo SHAM comienza a reorganizar sus fibras de colágeno en forma de red (Figura 6.21). El grupo OVX+E2 al igual que el grupo OVX+VH el posee una orientación paralela de fibras de colágeno tipo 1 en comparación con los tratamientos de colágeno.

Al día 14 el grupo SHAM posee una mayor densidad de fibras y se sigue manteniendo la orientación en forma de Red, mientras que en el grupo OVX+VH muestra un aumento de fibras con orientación paralela. El grupo OVX+E2 al igual que el grupo OVX+VH muestra un aumento de fibras y fibras paralelas. Los grupos tratamiento de colágeno OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3 muestran tener una mayor densidad de fibras de colágeno y una orientación en forma de red.

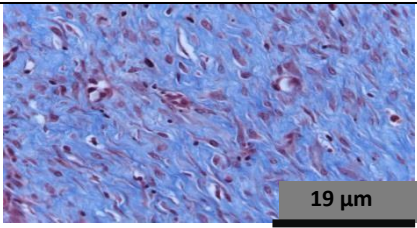
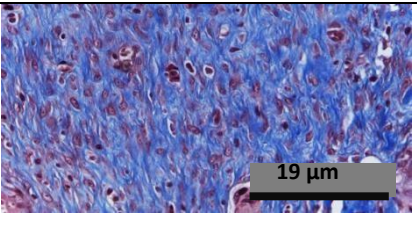
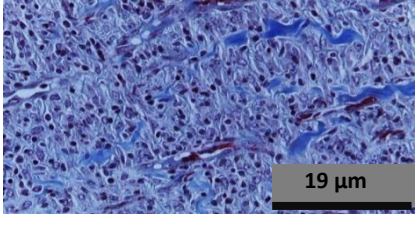
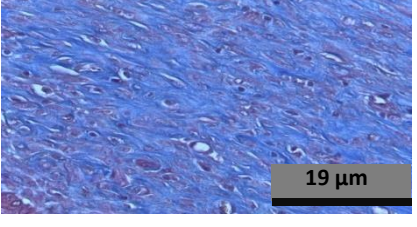
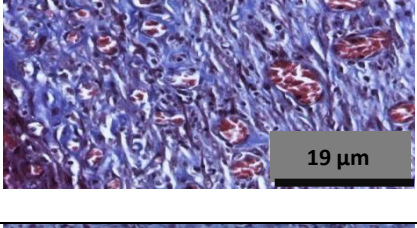
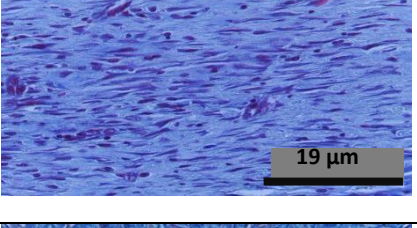
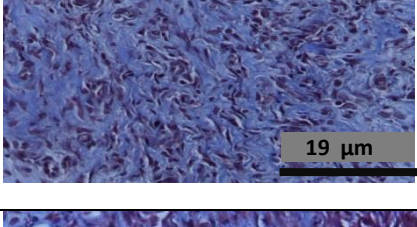
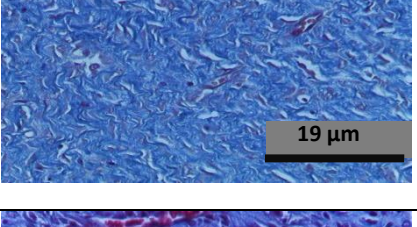
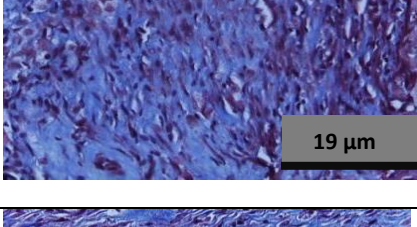
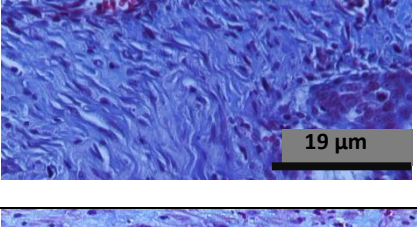
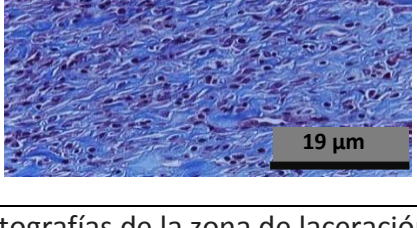
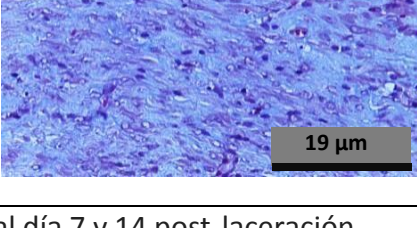
	DIA 7	DIA 14
SHAM		
OVX+VH		
OVX+E2		
OVX+PC1		
OVX+PC2		
OVX+PC3		

Figura 6.21 Microfotografías de la zona de laceración al día 7 y 14 post-laceración.

Observado a un aumento de 40x, tinción tricromía de Masson.

La orientación de las fibras de colágeno fue analizada de forma cuantitativa al día 7 y 14 post-laceración. Al día 7 se observa un score mayor en el grupo OVX+VH y OVX+E2, indicativo de la presencia de fibras de colágeno orientadas en forma paralela. Sin embargo, la administración de las tres dosis de colágeno (PC1, PC2 y PC3) disminuyó significativamente el score ($p < 0.05$), indicando que las fibras presentes en la zona de laceración son de predominancia en forma de canasta, similares a los observados en la dermis de piel normal (Figura 6.22).

Al día 14 post-laceración, se mantuvo el mismo patrón observado en el día 7. Los grupos OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3 mostraron un menor score al ser comparados con OVX+E2 ($p < 0.05$).

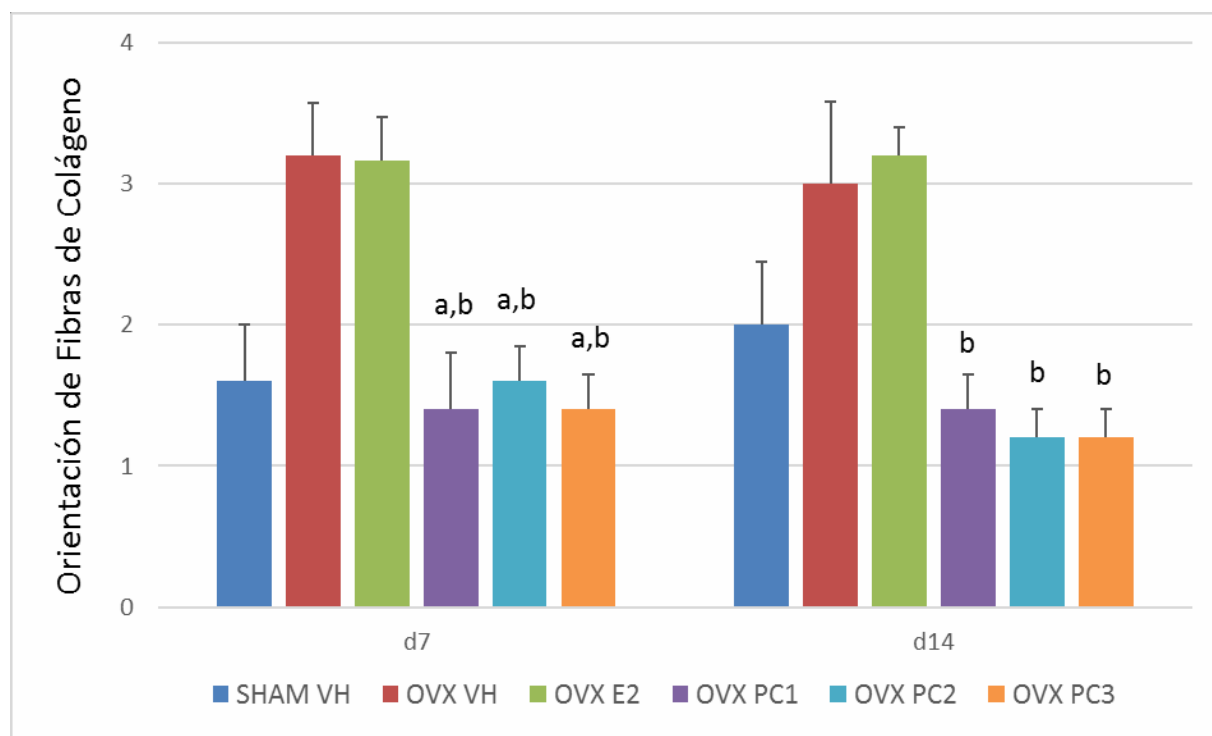


Figura 6.22 Score de orientación de fibras de colágeno al día 7 y 14 post-laceración. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la

primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2, ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p > 0.05$ respecto al grupo OVX+VH; b, $p < 0.05$ respecto al grupo OVX+E2.

6.5 Contenido de Hidroxiprolina:

La evaluación de los niveles de hidroxiprolina en la zona lacerada se realizó al día 14 post-lesión. En la figura 6.23 se observa que el grupo SHAM presentó mayor concentración de hidroxiprolina en comparación del grupo OVX+VH ($p < 0.001$). Dentro de los grupos ovariectomizados se puede observar que la administración de los diferentes tratamientos (OVX+E2, OVX+PC1, OVX+PC2 y OVX+PC3) incrementaron significativamente los niveles de hidroxiprolina en comparación al grupo OVX+VH ($p < 0.001$). Los niveles de hidroxiprolina fueron similares a los encontrados en el grupo SHAM.

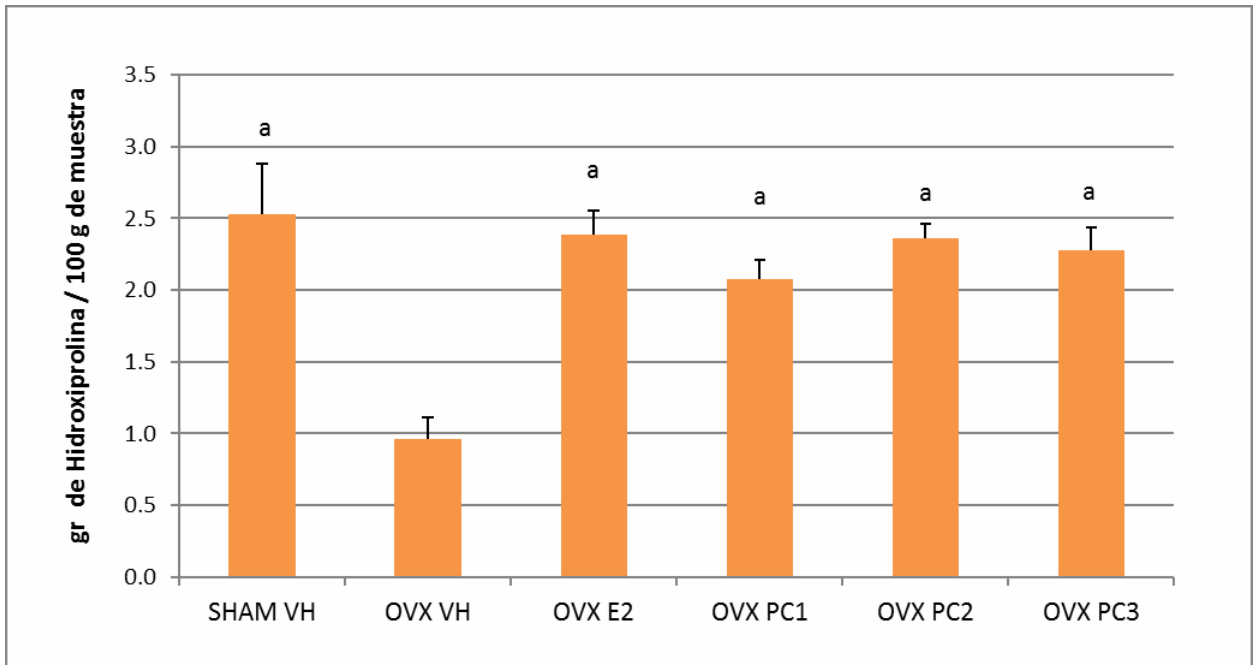


Figura 6.23 Evaluación de niveles de hidroxiprolina en el sitio de laceración al día 14 post-laceración. Datos expresados como promedio \pm SEM. OVX+VH, ovariectomizados tratados con vehículo; OVX+E2, ovariectomizados tratados con estradiol; OVX+PC1, ovariectomizados con la primera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC2,

ovariectomizados con la segunda dosis de péptidos hidrolizados de colágeno; OVX+PC3, ovariectomizados con la tercera dosis de péptidos hidrolizados de colágeno. a, $p < 0.001$ respecto a OVX+VH.

VII. Discusión

La presente tesis fue diseñada para evaluar el efecto de la administración oral de péptidos hidrolizados de colágeno de escamas de anchoveta sobre diferentes parámetros de la reparación tisular en un modelo de ratas hembras ovariectomizadas. Los resultados más relevantes del estudio demuestran que la administración oral de los péptidos hidrolizados de colágeno de escamas de anchoveta aceleran el proceso de reparación de la piel en ratas ovariectomizadas. Esto se aprecia en dos modelos diferentes de laceración cutánea, laceración mediante incisión y laceración mediante escisión. La incisión es un corte limpio y parejo realizado sobre el tejido, mientras que la escisión involucra remover el tejido, similar a la realización de una biopsia. En ambos casos, los péptidos de colágeno lograron acelerar la tasa de cierre de heridas, disminuir el grosor de la herida, así como evitar la formación de hiperplasia epidérmica, en comparación a animales tratados con un vehículo. Además, la administración de péptidos de colágeno logró incrementar el contenido de hidroxiprolina en la piel lacerada de animales ovariectomizados.

El modelo de ovariectomía en animales es empleado frecuentemente para investigar los mecanismos y las complicaciones relacionadas con la menopausia en seres humanos (Turner et al 2011, Rodríguez et al., 2013; Stotzer et al 2015). Una de las complicaciones observadas es el retraso del proceso de reparación tisular cutánea, asociado a la disminución de la producción de estrógenos (Peržel'ová et al 2016). Este efecto lo hemos podido comprobar en la presente tesis, donde se observa que la reparación tisular cutánea es más prolongada en animales ovariectomizados tratados con vehículo, en comparación con animales SHAM (ovarios intactos, se realiza para someter al animal al mismo nivel de estrés que el resto), quienes logran tener un cierre de heridas superior al 50% desde el día 3 post-laceración.

La reparación tisular implica tres procesos, la inflamación, la proliferación y la remodelación (Mukai et al 2014). En el presente estudio se ha evaluado la fase proliferativa (día 7 post-laceración) y de remodelación (día 14 post-laceración) luego de

realizar una herida por escisión y otra por incisión en animales SHAM y ovariectomizados. La observación de estas fases nos permite ver en específico el proceso de proliferación celular tanto en la epidermis como en la dermis, lo que llevará a la formación de la nueva matriz extracelular y a la deposición de fibras de colágeno. Al utilizar el modelo de ovariectomía, en donde no solo se genera un retraso de la reparación tisular cutánea (Seif et al 2014), sino que además existe una disminución de la producción de colágeno (Calvin et al 1998), nos permite evaluar productos o compuestos con propiedades que favorezcan la reparación tisular. En este estudio, se han utilizado los péptidos hidrolizados de colágeno como tratamiento, el cual según la literatura incrementa la concentración de colágeno en los tejidos, y ello lo hace de gran utilidad práctica cuando se requiere colágeno para determinadas funciones del organismo, como es el caso en la respuesta a la laceración tisular.

La evaluación del cierre de heridas, tanto a nivel macroscópico como microscópico, demuestra que la extirpación de ovarios, y la consecuente disminución de los niveles de estrógeno, retrasan el proceso de reparación tisular, mediante el método de incisión y escisión, en ratas hembra. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde existe una asociación entre los niveles de estrógeno y el proceso de cicatrización (Archer et al 2012, Emmerson et al 2012, Hall et al 2005, Thornton et al 2002, Zhou et al 2016), el cual es cualitativamente similar al observado en mujeres posmenopáusicas (Ashcroft y Ashworth, 2003).

En ambos modelos de laceración, la administración oral de estradiol, así como de las tres dosis de péptidos de colágeno, revirtieron los efectos de la ovariectomía sobre la cicatrización de la piel. La principal diferencia entre ambos modelos de laceración utilizada es que, mientras que la incisión es un corte limpio, la escisión requiere remover parte del tejido. Por ende, el cierre de las laceraciones realizadas mediante incisiones requiere un menor tiempo para cicatrizar mientras que, aquellas laceraciones realizadas mediante escisiones requieren de un mayor tiempo debido a que el área de laceración es más grande y el proceso de reparación requiere de la retracción de los bordes de la herida, con

la subsecuente formación del tejido extirpado. Es por ello, que en el caso de las incisiones podemos ver un cierre total de la herida a partir del día 9 post-laceración, mientras que, en el caso de las escisiones, esta se observa a partir del día 11. A pesar de esta diferencia en el tiempo de cierre de heridas, se puede concluir que la administración de péptidos de colágeno acelera el proceso de reparación tisular, presentando un menor grosor de herida en comparación al grupo ovariectomizado tratado con vehículo e incluso al grupo ovariectomizado tratado con estradiol. Entre las tres dosis de péptidos evaluadas, se puede concluir que aquella que presentó un mejor efecto fue la tercera dosis (OVX+PC3), la cual tuvo una acción similar al grupo SHAM, disminuyendo el grosor de heridas realizadas por incisión, mientras que la segunda y tercera dosis fueron más efectivas que el SHAM, disminuyendo el grosor de heridas realizadas por escisión.

La piel es un tejido complejo, por lo tanto, al ocurrir una incisión o escisión se confiere un daño tanto en la capa epidérmica, la membrana basal que subyace a la epidermis y, la dermis, así como en las células que conforman estas capas (Mc Neil et al 2005). Es por ello que es necesario determinar no sólo la tasa de cierre de heridas o el grosor de la herida, sino además observar microscópicamente la formación de las capas que conforman la piel, durante la fase proliferativa, así como la estructura de la nueva matriz extracelular, durante la fase de remodelación.

Los análisis histológicos al día 7 post-laceración muestran que, si bien la re-epitelización ha comenzado en todos los grupos lacerados, aquellas laceraciones de animales ovariectomizados tratados con vehículo, así como de los tratados con estradiol, contaban aún con la presencia de debris. La presencia de debris acumulada es un indicativo de la eliminación de células inflamatorias que han finalizado de realizar su función (Oxlund et al 1996). La presencia de debris al día 7 post-laceración nos lleva a pensar que en estos dos grupos mencionados ha existido un incremento del patrón inflamatorio, prolongando la fase inflamatoria. Al evaluar el grosor de la epidermis, notamos que estos dos grupos presentan hiperplasia epidérmica, en donde se ha generado una hiperproliferación de queratinocitos, células que son capaces de generar

una respuesta inmunitaria (Sugita et al 2007, Gröne et al 2002). Es por ello que la presencia de hiperplasia epidérmica es considerada un indicativo de inflamación de la piel (Boruah et al 2013). Los animales tratados con los péptidos de colágeno mostraron el desarrollo de la capa córnea muy similar al grupo SHAM. La capa córnea es una capa de la epidermis, la cual nos indica que se está dando una re-epitelización adecuada (Christophers 1971). Los animales ovariectomizados tratados con vehículo y con estradiol no contaron con la presencia de la capa córnea al día 7 post-laceración. Este hallazgo nos indicaría que el consumo de los péptidos hidrolizados de colágeno estaría acelerando el proceso de reparación tisular con una formación apropiada de todas las capas de la epidermis, sin producir una hiperproliferación como la observada en el grupo ovariectomizado tratado con vehículo.

Para poder confirmar el efecto de la ovariectomía y los diferentes tratamientos sobre el patrón inflamatorio, se realizó un conteo de las dos principales células inflamatorias presentes durante la reparación tisular, los neutrófilos y macrófagos. En piel sana se observó una mínima cantidad de células inflamatorias. Sin embargo, cuando se genera una laceración, estas células inflamatorias migran a la zona lacerada con la finalidad de eliminar agentes extraños (Mukai et al 2014). Esto se observó al día 7, en donde se encontró una mayor cantidad de neutrófilos y macrófagos en comparación con los encontradas en una piel sana no lacerada. Este incremento en el número de células inflamatorias es normal y es requerido para formar el tejido de granulación y generar contracción de la herida. Para ello los macrófagos producen factores de crecimiento (Clark et al 1996), los cuales se encargarán de reclutar fibroblastos y activarlos para diferenciarlos en miofibroblastos en el tejido de la herida (Sindrilaru et al 2013). Sin embargo, si existe una sobre-población de células inflamatorias, el proceso de reparación tisular se vería comprometido y generaría un retraso en el inicio de la fase proliferativa y de remodelación (Mustoe et al 2006, Xue et al 2015). Es por ello que se espera encontrar una disminución del número de macrófagos al finalizar la fase de proliferación. Si bien ninguno de los tratamientos tuvo un efecto sobre el número de neutrófilos, la administración de estradiol, así como de las tres dosis de péptidos de colágeno, disminuyó

el número de macrófagos en la zona de laceración de los animales ovariectomizados. Así mismo, la tercera dosis de péptido de colágeno (PC3) disminuyó el número de macrófagos desde el día 7 post-laceración en comparación con el grupo SHAM, quien recién logró regresar a valores basales a partir del día 14 post-laceración. Estos resultados confirman que existe un incremento del patrón inflamatorio en animales ovariectomizados en comparación con los intactos, el cual se prolonga hasta la fase de remodelación (día 14 post-laceración). Además, nos comprueba que el tratamiento con la tercera dosis de péptido de colágeno es eficaz para revertir los efectos de la ovariectomía, y de esa manera facilitar la progresión de las fases de la reparación tisular. Este resultado es consistente con estudios previos que indican que la administración de péptidos de colágeno poseen efectos antiinflamatorios (Hartog et al., 2013).

Si el incremento exacerbado de células inflamatorias es perjudicial para el desarrollo de la fase proliferativa y de remodelación, se esperaría entonces encontrar una alteración en los componentes de la nueva matriz extracelular en animales ovariectomizados. Este postulado lo comprobamos al evaluar las laceraciones realizadas por escisión, en donde el tratamiento con vehículo en animales ovariectomizados no solo genera una mayor área de herida, sino que además presenta un retraso de la formación del tejido granuloso. Sin embargo, el tratamiento con los péptidos de colágeno favorecen la formación del tejido granuloso al día 7 post-laceración. Este tejido granuloso, si bien aún está incompleto en este momento, es aquel que dará lugar a la nueva matriz extracelular. Esta observación puede confirmarse al observar las laceraciones realizadas por escisión, en donde se analizan la orientación de las fibras de colágeno depositadas en la nueva matriz extracelular, así como en la cantidad de hidroxiprolina presente en la zona de laceración.

La orientación de las fibras de colágeno nos permite determinar el grado de madurez que estas presentan. De esta manera, una orientación de fibras de colágeno de forma paralela a la capa basal de la epidermis nos indica una mala organización de la nueva matriz extracelular, mientras que una orientación de fibras de colágeno en forma de ondas o de canasta, nos indica una organización óptima, similar a la observada en una

dermis sana (Krieg et al 2011). Los resultados del presente estudio demuestran que la ovariectomía altera la organización de estas fibras, orientándolas en forma paralela. Esto es consistente con estudios previos en los cuales se observa que la ovariectomía altera las fibras de colágeno tipo I (Shah et al 2001). Si bien el tratamiento con estradiol no tuvo efecto alguno sobre la orientación de las fibras de colágeno, la administración oral de las tres dosis de péptidos de colágeno logró revertir este efecto, mostrando una predominancia de fibras de colágeno orientadas en forma de canasta.

La hidroxiprolina es un aminoácido específico que posee el colágeno, el cual deriva de la prolina e hidroxilisina derivados de lisina (Koide et al 2005). Si la ovariectomía retrasa la formación del tejido granuloso, así como genera una alteración de las fibras de colágeno, se esperaría encontrar una menor cantidad de hidroxiprolina en las zonas laceradas. Esto se confirma en nuestros resultados, donde los animales ovariectomizados tratados con vehículo presentan una menor concentración de hidroxiprolina en piel al día 14 post-laceración. Todos los tratamientos administrados a los animales ovariectomizados lograron revertir este efecto, incrementando los niveles de hidroxiprolina hasta obtener niveles similares al grupo SHAM. Esto confirma estudios previos donde se demuestra que los péptidos hidrolizados de colágeno tienen efectos estimulantes sobre el colágeno tipo I y otras moléculas de matriz extracelular en fibroblastos humanos (Liang et al 2010, Zague et al 2011). Esto permite que se incremente la integridad estructural de la piel regenerada, favoreciendo la homeostasis, generando un apoyo estructural a la epidermis, y evitando que exista una re-apertura de la herida (Krieg et al 2011).

El colágeno es un componente necesario para la cicatrización normal de la herida, el cual no sólo confiere fuerza e integridad a la matriz tisular, sino que también juega un papel importante en la homeostasis y en la epitelización en las etapas posteriores de la reparación tisular (Roy et al 2012). Por lo tanto, estimular su síntesis cuando la reparación de la herida es defectuosa es beneficioso para promover la cicatrización de heridas (Zhang et al 2011b). En este estudio se ha demostrado el efecto de la administración oral de péptidos hidrolizados de colágeno de escamas de anchoveta sobre la reparación tisular cutánea. Varios estudios han demostrado que los péptidos hidrolizados de colágeno

pueden ser absorbidos por la vía digestiva y distribuidos eficientemente a la dermis, la capa más profunda de la piel, donde pueden estimular la proliferación de los fibroblastos (Schwartz et al 2012, Sumida et al 2004, Koyama et al 2009, Proksch et al 2014), células encargadas de la producción de colágeno. En el presente estudio se confirma la acción sistémica de estos péptidos, y su acción dosis-dependiente, sobre la piel, utilizando un modelo de animales ovariectomizados.

Una observación interesante fue el efecto de la administración de estradiol a los animales ovariectomizados. Está bien documentado que los estrógenos tales como el estradiol mejoran la calidad de la piel y por lo tanto la cicatrización (Zhou et al 2016, Son et al 2005). Así mismo, tienen acciones anti-inflamatorias bien documentadas (Ashcroft et al 1997b, Ashcroft et al 2003c). Sin embargo, en este estudio se encontró que al día 7, donde se da la fase de proliferación, el grupo que recibió el tratamiento con estradiol (OVX+E2) no obtuvo una acelerada y óptima reparación tisular al compararse con los grupos tratados con péptidos de colágeno. Es recién al día 14 en donde se pudo apreciar una diferencia con el grupo control (OVX-VH). No se descarta el efecto de la administración de estradiol, ya que posiblemente como lo describió Mukai y col. (2014), los efectos del estradiol se intensifican a partir del día 7 post-laceración para adelante. Estos resultados estarían demostrando que la acción de los péptidos de colágeno es más rápida que la acción de los estrógenos sobre la reparación tisular en animales ovariectomizados.

En resumen, los resultados encontrados en la presente tesis demuestran que la administración oral de péptidos hidrolizados de colágeno acelera la reparación tisular en ratas hembras ovariectomizadas, disminuye el patrón inflamatorio, mejora la deposición de fibras de colágeno, así como un aumento de las mismas dándole una mayor fuerza al cierre de herida. Por otro lado, se demostró que la acción del colágeno se encuentra acelerado en comparación con el tratamiento de estradiol, por lo cual, este estudio demuestra que el uso oral de

péptidos hidrolizados de colágeno resulta ser un tratamiento beneficioso para la reparación tisular en un modelo de ovariectomía.

VIII. Conclusiones

- La reparación tisular se ve retrasada ante la ausencia de estrógenos inducida por la ovariectomía de ratas hembras.
- Los tratamientos de colágeno poseen un mejor efecto que el tratamiento convencional con estrógenos en los parámetros medidos de grosor de herida, grosor epidérmico y células inflamatorias
- El tratamiento con 4000 mg.kg^{-1} péptidos hidrolizados de colágeno (OVX+PC3) en el modelo de incisión es la mejor dosis con efectos en reducción de grosor epidérmico y células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos).
- Los tratamientos con 2000 mg. kg^{-1} y 4000 mg. kg^{-1} . péptidos hidrolizados de colágeno (OVX+PC2 y OVX+PC3) en el modelo de escisión son las mejores dosis con mejores efectos en reducción del grosor de herida, hiperplasia epidérmica y reducción de células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos).

IX. Recomendaciones

Se ha visto causa-efecto en el análisis histológico de los péptidos de colágeno de anchoveta, sin embargo esto podría complementarse con análisis inmunohistoquímicos con el propósito de medir citoquinas y factores de crecimientos los cuales puedan estar implicados en el proceso que tienen estos péptidos de colágeno sobre la reparación tisular.

Sería importante en el futuro realizar un estudio toxicológico con la finalidad de evaluar el efecto que tiene estos péptidos de colágeno de anchoveta sobre el organismo.

X. Referencias Bibliográficas

1. Archer D. Postmenopausal skin and estrogen. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28: 26
2. Ashcroft G, Horan M, et al. Aging Is Associated with Reduced Deposition of Specific Extracellular Matrix Components, an Upregulation of Angiogenesis, and an Altered Inflammatory Response in a Murine Incisional Wound Healing Model. *Journal of investigative dermatology* 1997; 108: 430-437 (a)
3. Ashcroft GS, Dodsworth J, Van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat Med* 1997; 3: 1209–1215.(b)
4. Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong M. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest* 2003; 111: 1309–1318.(c)
5. Ashcroft G, Ashworth J. Potential role of estrogens in wound healing. *Am J Clin Dermatol.* 2003; 4:737-43.
6. Atala A, Irvine DJ, Moses M, Shaunak S. Wound Healing Versus Regeneration: Role of the Tissue Environment in Regenerative Medicine. *MRS bulletin / Materials Research Society.* 2010; 35:10.1557
7. Barker T. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine. *Biomaterials* 2011; 32: 4211–4214.
8. Beral V; Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* 2003; 362:419-27.
9. Boruah D, Moorchung N, Vasudevan B, Malik A, Chatterjee M. Morphometric study of microvessels, epidermal characteristics and inflammation in psoriasis vulgaris with their correlations. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013; 79:216-23.
10. Bouloc A, Rpp E, Moga A, Chadoutaud B, Zouboulis C. compensating skin care complex containing pro-xylane in menopausal women: results from multicenter, evaluator – blinded, randomized study. *Acta Derm Venereol* 2017; 97: 541–542

11. Brincat M, Kabalan S, Studd J, Moniz C, de Trafford J, Montgomery J. A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal woman. *Obstet Gynecol* 1987; 70: 840–845. (a)
12. Brincat M, Versi E, Moniz C, Magos A, de Trafford J, Studd JW: Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. *Obstet Gynecol* 1987; 70:123-127. (b)
13. Brincat M. Oestrogens and the skin. *J Cosmet Dermatol*. 2004; 3:41-9.
14. Brown, S., & Savill, J. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *The Journal of Immunology* 1999; 162(1), 480-485.
15. Calvin M, Dyson M, Rymer J, Young SR. The effects of ovarian hormone deficiency on wound contraction in a rat model. *Br J Obstet Gynaecol*. 1998; 105(2):223-7
16. Carr B. Disorders of the ovaries and female reproductive tract. In: Wilson J, Foster D, Kronenberg H, Larsen P, editors. *Williams textbook of endocrinology*. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998; pp. 751-817
17. Christophers E. The architecture of stratum corneum after wounding. *J Invest Dermatol*. 1971; 57(4):241-6.
18. Clark R, & Henson P. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, Plenum Press, New York, NY, USA, 2nd edition, 1996.
19. Deroo B, Korach K. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(3):561-570.
20. Deshmukh S, Dive A, Moharil R, Munde P. Enigmatic insight into collagen. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 2016; 20(2):276-283.
21. Duan R, Zhang J, Du X, Yao X, Konno K. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem* 2009; 112 702-706
22. Eckes B, Nischt R, Krieg T. Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2010;3:45
23. Eming S, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014; 6: 265

24. Emmerson E, Hardman M. The role of estrogen deficiency in skin ageing and wound healing. *Biogerontology* 2012; 13:3-20.
25. Farzaneh S, Zarghi A. Estrogen Receptor Ligands: A Review (2013–2015). Erker T, ed. *Scientia Pharmaceutica*. 2016; 84(3):409-427.
26. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(12): 1531-46.
27. Gennari I, Merlotti D, Nuti R. Selective estrogen receptor modulator (serm) for the treatment of osteoporosis in postmenopausal women: focus on lasofoxifene. *clin interv aging*.2010; 5:19–29.
28. Gómez-Guillén M, López-Caballero M, López de Lacey A, Alemán A, Giménez B, Montero P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. E. Le Bihan, N. Koueta (Eds.), *Sea by-products as a real material: New ways of application*, Transworld Research Network Signpost, Kerala, India (2010), pp. 89–115
Chapter 7
29. Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*. 2002 Sep 6;88:1-12.
30. Gurtner G, Evans G. Advances in head and neck reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2000;106:672–682
31. Gurtner G, Werner S, Barrandon Y, Longaker M. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 15; 453(7193):314-21.
32. Hall G and Phillips T. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 555 568.
33. Hartog A, Cozijnsen M, de Vrij G, Garssen J. Collagen hydrolysate inhibits zymosan-induced inflammation. *Exp Biol Med* 2013; 238(7):798-802.
34. Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays* 2007; 29(10): 1001-10.
35. Hinz B: Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127:526–537.

36. Hopkinson S, Hamill K, Wu Y, Eisenberg J, Hiroyasu S, Jones J. Focal Contact and Hemidesmosomal Proteins in Keratinocyte Migration and Wound Repair. *Advances in Wound Care*. 2014; 3(3):247-263.
37. Hou, H, Li B, Zhao X, et al. The effect of pacific cod (*gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on uv radiation-induced skin photoaging in icr mice. *food chemistry*,2009; 115, 945-950.
38. Hunt, T. K., Hopf, H., & Hussain, Z. Physiology of wound healing. *Advances in Skin & Wound Care* 2000; 13, 6.
39. Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 2001; 3(5):E117–E123
40. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29:55768.10.1016.
41. Kadler K, Holmes D, Trotter J, Chapman J. Collagen fibril formation. *Biochemical Journal*. 1996; 316:1-11.
42. Koide T & Nagata K. Collagen Biosynthesis. *Topics in Current Chemistry* 2005; pp 85-114
43. Koyama Y. Effect of collagen peptide on the skin. *Shokuhinto Kaihatsu* 2009; 44: 10-2.
44. Krieg T, Aumailley M. The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions. *Exp Dermatol*. 2011; 20(8):689-95.
45. Landén N, Li , Ståhle M: Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73:3861–3885.
46. Leibovich S, & Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *American Journal of Pathology*, 1975; pp. 71–100, 1975.
47. Li J-F, Duan H-F, Wu C-T, et al. HGF Accelerates Wound Healing by Promoting the Dedifferentiation of Epidermal Cells through β 1-Integrin/ILK Pathway. *BioMed Research International*. 2013; 2013:470418.

48. Liang j, Pei x., et al. Marine collagen peptides prepared from chum salmon (*oncorhynchus keta*) skin extend the life span and inhibit spontaneous tumor incidence in sprague-dawley rats. *journal of medicinal food* 2010; 13: 757-770.
49. Lin, B., Zhang, F., Yu, Y., Jiang, Q., Zhang, Z., Wang, J., & Li, Y. Marine collagen peptides protect against early alcoholic liver injury in rats. *British Journal of Nutrition* 2012; 107(8), 1160-1166.
50. Madden J, Peacock E. Studies on the biology of collagen during wound healing. 3. Dynamic metabolism of scar collagen and remodeling of dermal wounds. *Ann Surg* 1971; 174:511–520
51. Martin P. wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276 (5309): 75 – 81.
52. Matsumoto Y, Ikeda K, Yamaya Y, Yamashita K, Saito T, et al. The usefulness of the collagen and elastin sponge derived from salmon as an artificial dermis and scaffold for tissue engineering *Biomed. Res* 2011; 32 29-36.
53. Millington G. Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31: 407–12
54. Mneil PL, Kirchhausen T. An emergency response team for membrane repair. *Neat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6,499-505
55. Mukai K, Komatsu E, Nakajima Y, Urai T, Nasruddin, et al. The Effect of 17b-Estradiol on Cutaneous Wound Healing in Protein- Malnourished Ovariectomized Female Mouse Model. 2014; 9(12): e115564.
56. Mustoe T, O'Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 Suppl):35S–41
57. Muthukumar T, Prabu P, Ghosh K, Sastry T. Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014; 1;113:207-12.

58. Muthukumar T, Senthil R; Sastry T. Synthesis and characterization of biosheet impregnated with *Macrotyloma uniflorum* extract for burn/wound dressings. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013; 102: 694-699
59. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 2016; 7(2):27-31.
60. Nanci A. *Ten Cate's Textbook of Oral Histology, Development, Structure & Function*. 7th ed. NewDelhi: Elsevier; 2008. pp. 66–8. Ch. 4.
61. Naylor E, Watson R, Sherratt M. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 2011; 69(3): 249-56.
62. Oxlund H, Christensen H, Seyer-Hansen M, Andreassen TT. Collagen deposition and mechanical strength of colon anastomoses and skin incisional wounds of rats. *J Surg Res*. 1996; 66(1):25-30.
63. Perželová V, Sabol F, Vasilenko T, et al. Pharmacological activation of estrogen receptors- α and - β differentially modulates keratinocyte differentiation with functional impact on wound healing. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016; 37(1):21-28.
64. Proksch E, Segger D, Degwert J, Schunck M, Zague V, Oesser S. Oral supplementation of specific collagen peptides has beneficial effects on human skin physiology: a double-blind, placebo-controlled study. *Skin Pharmacol Physiol* 2014; 27(1): 47-55.
65. Reinke J, Sorg H. wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49(1):35-43.
66. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(1): a004978.
67. Rodriguez, M., Stotzer, U, Domingos, M, Demice, R., Shiguemoto, G, Tomaz, L, et al. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in rats liver. *Clinics*, 2013; 68(9): 1247-54.
68. Rossouw J, Anderson G, Prentice R, et al; Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002

69. Roy DC, Mooney NA, Raeman CH, Dalecki D, Hocking DC. Fibronectin Matrix Mimetics Promote Full-Thickness Wound Repair in Diabetic Mice. *Tissue Engineering Part A*. 2013; 19(21-22):2517-2526.
70. Sandhu S, Gupta S, Bansal H, Singla K. Collagen in health and disease. *J Orofac Res*. 2012; 2:153–9.
71. Sankar S, Sekar S, Mohan R, Rani S, Sundaraseelan J, Sastry T. Preparation and partial characterization of collagen sheet from fish (*Lates calcarifer*) scales. *International Journal of Biological Macromolecules* 2008. 42,1: 6-9
72. Schwartz S, Park J. Ingestion of BioCell Collagen((R)), a novel hydrolyzed chicken sternal cartilage extract; enhanced blood microcirculation and reduced facial aging signs. *Clin Interv Aging* 2012; 7: 267-73.
73. Seif A. *Nigella Sativa* reverses osteoporosis in ovariectomized rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 14:22.
74. Shah M, Maibach H. Estrogen and skin. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2: 143–50.
75. Sibilla S, Godfrey M, Brewer S, et al. An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: scientific background and clinical studies. *The open nutraceuticals journal* 2015; 8, 29-42.
76. Sindrilaru A, Scharffetter-Kochanek K: Disclosure of the culprits: macrophages-versatile regulators of wound healing. *Adv Wound Care* 2013; 2:357–368
77. Sinno H, Prakash S: Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plast Surg Int* 2013; 2013:1–7.
78. Son ED, Lee JY, Lee S, et al. Topical application of 17beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating tgf-Beta signaling in aged human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2005; 124:1149–61
79. Sorg H, Krueger C, Vollmar B. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat* 2007; 211:810–818.
80. Stotzer, U, Rodrigues, M, Domingos, M, Silva, G, Duarte, F, Gatto, C, et al. Resistance Training Suppresses Intra-abdominal Fatty Acid Synthesis in Ovariectomized Rats. *Int. J. Sports Med*. 2015; 36 (3): 226-33.

81. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007; 28(5):521-74
82. Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clinical and Experimental Immunology.* 2007; 147(1):176-183.
83. Sumida E, Hirota A, Kuwaba K. The effect of oral ingestion of collagen peptide on skin hydration and biochemical data of blood. *J Nutr Food* 2004; 7 : 45-52
84. Sumino H, Ichikawa S, Abe M, Endo Y, Nakajima Y, Minegishi T, et al. Effects of aging and postmenopausal hypoestrogenism on skin elasticity and bone mineral density in Japanese women. *Endocr J* 2004; 51: 159–164
85. Thornton M. The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol* 2002; 11: 487–502.
86. Tresguerres J ,benitez de lugo E. fisiología humana 2da ed. Madrid . McGraw-Hill; 1999.
87. Tsourdi E, Barthel A, Rietzsch H, Reichel A, Bornstein SR. Current Aspects in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Wounds in Diabetes Mellitus. *BioMed Research International.* 2013; 2013:385641.
88. Turner S. Animal models of osteoporosis: necessity and limitations. *Eur. Cell. Mater.*2011; 22(1): 66-81.
89. Videira I, Moura D, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol* 2013; 88: 76–83
90. Von Mach-Szczypioski J, Stanosz S, Kościuszkiewicz J, Safranow K. New aspects of postmenopausal osteoporosis treatment with micronized estradiol and progesterone. *Ginekologia Polska* 2016; 87:11, 739–744
91. Wang J, Xu M, Liang R, Zhao M, Zhang Z, Li Y. Oral administration of marine collagen peptides prepared from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) improves wound healing following cesarean section in rats. *Food & Nutrition Research.* 2015; 59:10

92. Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, et al. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem* 2010; 58(2): 835-41.
93. Watt F, Fujiwara H. Cell-Extracellular Matrix Interactions in Normal and Diseased Skin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2011; 3(4):a005124.
94. Witte M, Kiyama T, Barbul A. Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes. *Br J Surg*. 2002; 89(12):1594-601.
95. Wojtowicz A, Oliveira S, Carlson M, Zawadzka A, Rousseau C, Baksh D. The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2014; 22(2):246-255.
96. Xue M, Jackson C. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*. 2015;4(3):119-136.
97. Ying GG, Kookana R, Rub Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 2002; 28, 6: 545-551
98. Zague V, de Freitas V, da Costa Rosa M, de Castro G, Jaeger R, Machado-Santelli GM. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. *J Med Food*. 2011; 14(6):618-24.
99. Zhang Y, Liu W, Li G, Shi B, Miao Y, Wu X. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chem* 2007; 103: 906-912.
100. Zhang Z, Zhao M, et al. Oral administration of skin gelatin isolated from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) enhances wound healing in diabetic rats. *marine drugs*, 2011; 9: 696-711 (a).
101. Zhang Z., Wang J., et al. oral administration of marine collagen peptides from chum salmon skin enhances cutaneous wound healing and angiogenesis in rats. *journal of the science of food and agriculture*, 2011; 91: 2173-2179 (b).
102. Zhou T, Yang Z, Chen Y, Chen Y, Huang Z, You B, Peng Y, Chen J, Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing by Promoting Proliferation of Epidermal Keratinocytes via Erk/Akt Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38:959-96