



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

**EFFECTO DE UN PREPARADO DE EXTRACTOS DE HOJAS DE MATICO Y
LLANTÉN EN PLASTIBASE, EN EL PROCESO REPARATIVO DE UNA
HERIDA ESTANDARIZADA DE MUCOSA PALATINA DE RATA**

(Trabajo Adscrito al Proyecto Pri-Odo 2012.12-004)

José Miguel López Valladares

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. María angélica Torres Q.

Profesor Asociado.

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. María Eugenia Letelier M

Profesor Asociado.

T.M. Montserrat Reyes R.

Instructor.

SANTIAGO – CHILE

2012

AGRADECIMIENTOS

- A mis papas y hermanos, por estar a mi lado en todo momento, por ser el apoyo fundamental, y el incentivo necesario en momentos difíciles.
- A la Dra. María Angélica Torres, por su dedicación, orientación, y buena disposición en la realización de este trabajo.
- A la Dra. María Eugenia Letelier por su apoyo incondicional y orientación en todo este periodo, por su cariño y preocupación en los momentos difíciles.
- A la Prof. Ximena Polanco por su importante colaboración y apoyo, en la realización de esta tesis.
- A la TM. Montserrat Reyes R. por su colaboración en el proceso histológico, su tiempo y buena disposición para realizar esta investigación.
- A Mi hermano Miguel Ángel por su tiempo y ayuda en el desarrollo de esta tesis.

INDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEÓRICO	12
REPARACIÓN TISULAR	12
FITOMEDICINA	22
LESIONES ÚLCERATIVAS DE LA MUCOSA BUCAL. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS	27
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
HIPOTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
MATERIAL Y METODO	35
DISEÑO DE LA INVESTIGACION	35
DETERMINACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL PROCESO REPARATIVO NORMAL DE UNA HERIDA ESTANDARIZADA EN MUCOSA PALATINA DE RATA	35
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	37
MÉTODO	37
EUTANASIA	38
EVALUACION CLINICA DE LOS ANIMALES	38
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y CORTES HISTOLÓGICOS	43
VARIABLES A ANALIZAR Y ANALISIS ESTADÍSTICO	46

RESULTADOS	49
EVALUACION CLINICA DEL PROCESO REPARATIVO	49
CARACTERÍSTICAS HISTOLOMORFOLÓGICAS DEL PROCESO REPARATIVO	58
DISCUSION	70
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	77
CONCLUSIONES	77
SUGERENCIAS	77
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	78
ANEXO	83

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Las úlceras orales son de alta frecuencia y acarrearán incomodidad y gran dolor asociado. Fisiopatológicamente, los actores de inflamación pueden prolongar la lesión al liberar exceso de especies reactivas del oxígeno. La medicina nativa utiliza preparados de *Buddleja globosa* Hope (matico), planta nativa chilena, como cicatrizante y anti-inflamatorio, y los de *Plantago major* L. (llantén), como analgésicos y anti-inflamatorios, (hepatoprotectores). La falta de respaldo científico ha limitado el uso de estas plantas medicinales.

OBJETIVO: Comparar las características reparativas de una herida en mucosa palatina de rata tratada con un preparado de hojas de *matico* y *llantén* incluidos en plastibase (excipiente), respecto a un control solo con plastibase y a un control sin tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se realizó una lesión estandar de 3mm de diámetro en el paladar de 36 ratas Sprague Dawley. Se manejaron divididas en tres grupos: 1) tratamiento con plastibase mas preparado herbal, 2) plastibase solo y 3) sin tratamiento. Diariamente se controló clínicamente por 7 días. Dos ratas por grupo se sacrificaron a los 2, 5 y 7 días después de la lesión. Los paladares fueron procesados histopatológicamente para tinciones con H&E y Giemsa. La diferencia entre los grupos se analizó usando ANOVA, t-test y el test de Wilcoxon para las variables no paramétricas ($p < 0.05$).

RESULTADOS: Características clínicas mejores y velocidad de reparación mayor mostró el grupo tratado con extracto herbal. La contracción de la herida fue de 50% en el tratado con extracto herbal, en comparación con la reducción de un 21% en el tratado con plastibase solo y de 22% en el sin tratamiento (ttest $p < 0,05$). Una aceleración en el proceso inflamatorio, fibroplasia y angiogénesis, así como menor número de mastocitos se observó en los tratados con extracto herbal.

INTRODUCCIÓN

La respuesta de un tejido a una lesión de continuidad es determinada por una serie de eventos que, de manera progresiva y simultánea, se activan para restablecer las condiciones de integridad iniciales del tejido afectado. Durante el proceso reparativo se han descrito usualmente tres etapas básicas: inflamación, proliferación y remodelación (1). Inmediatamente después de la lesión, se produce consecutivamente el control del sangrado y establecimiento de una línea de defensa contra la penetración de agentes patógenos, la eliminación de elementos necróticos, bacterias o cuerpos extraños del sitio de la herida, cierre de la herida con nuevo tejido conectivo o epitelio, y finalmente, modificación del tejido de reparación primario a un tejido funcionalmente activo.

Los leucocitos participan activamente desde la fase inflamatoria, fagocitando a las bacterias y microorganismos y degradando el tejido necrótico. Sin embargo al liberar enzimas, mediadores químicos y especies reactivas del oxígeno (**EROs**, o también ROS, por sus sigla en inglés), pueden prolongar el proceso de reparación.

Las EROs ejercen funciones fisiológicas importantes actuando como mediadores de respuestas celulares (acciones bactericidas, viricidas, inflamación, etc.); sin embargo, bajo condiciones de generación excesiva y/o de remoción deficiente, los EROS producen modificaciones oxidativas de las biomoléculas: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando una alteración de sus estructuras y funciones, lo cual puede conducir a la muerte celular (2). En estas condiciones, debido a un exceso de EROS, se desencadena el fenómeno de “**estrés oxidativo**” (3).

El proceso de reparación de injurias en la mucosa oral es similar al del resto de los tejidos blandos del organismo, pero es de menor duración y rara vez presenta tejido cicatrizal. Sin embargo, dependiendo del microambiente de

la cavidad oral, (en donde existen grandes cantidades de bacterias) puede existir retraso importante en la reparación de este tejido y gran dolor.

El epitelio lesionado de la mucosa bucal tiene la capacidad de restablecer su integridad a través de un proceso de migración epitelial de los bordes de la herida. Esta migración se produce gracias a la proliferación de células germinales que empujan el borde libre hacia delante, deteniéndose cuando las células de ambos bordes de la herida hacen contacto. Los mediadores que regulan este proceso están presentes en las células epiteliales (4), lo que permite una reparación de corta duración y sin cicatriz, proceso de reparación por regeneración. En heridas más profundas, donde además de la superficie del epitelio, se afecta el conjuntivo subyacente (úlceras), la migración del epitelio debe proceder sobre una matriz de tejido conectivo también lesionada. Esta matriz presenta alta actividad fibroblástica y angiogénica y abundantes leucocitos y macrófagos. Estos fenómenos servirán de sostén para que pueda proceder la proliferación y reparación epitelial. Sin embargo, este proceso es lento y su duración dependerá de las dimensiones del defecto y de la presencia o no de factores tales como infección y/o presencia de tejido necrótico. Heridas de mayor profundidad no restablecen la calidad total del tejido lesionado (funcionalidad y organización) reparando por medio de un proceso cicatrizal.

Cabe señalar que las úlceras bucales, son lesiones elementales de alta prevalencia (5), con intenso dolor como manifestación principal y suelen comportarse como heridas crónicas, es decir, que pueden requerir de un largo tiempo para su cura (6). Entre las principales causas que provocan úlceras orales de presentación aguda se encuentran los traumas, alteraciones inmunológicas, las infecciones virales y bacterianas. Estas úlceras también pueden presentarse asociadas a otros procesos patológicos tales como las úlceras orales del liquen plano erosivo, del carcinoma oral de células

escamosas, del penfigoide, del pénfigo vulgar y las úlceras orales asociadas con la ingesta de fármacos.

Una vez que se forma una úlcera bucal, dadas las características propias del tejido, ellas estarán sujetas a un proceso continuo de irritación, principalmente por la acción de la saliva y de la microbiota bucal comensal o transitoria. Esto determina que una lesión inflamatoria que inicialmente nace como aguda se transforme en una lesión crónica. Particularmente las úlceras de origen traumático (úlceras por decúbito), muy frecuentes en la práctica diaria de la consulta odontológica. Comúnmente se producen como consecuencia de alguna mordedura, y por presencia de dientes con bordes cortantes, también por prótesis tanto fijas como removibles en mal estado, por alimentos, cepillado dental traumático, etc. Las úlceras se localizan principalmente en los bordes de la lengua y en la mucosa yugal (mejilla), son molestas y el paciente generalmente consulta por el dolor que ellas provocan. No es extraño que en algunas personas estas úlceras se infecten o demoren largo tiempo en reparar debido a condiciones sistémicas del paciente, acompañándose a veces de dolor durante este periodo. La observación de la relación entre lesión y causa que la provoca, apoya el diagnóstico (eminentemente clínico) que determinará su terapia (7). El tratamiento de las úlceras orales estará determinado por su etiología; no obstante, en muchos casos, aunque se elimine el factor causal, el periodo de reparación es muy molesto para el paciente, generando intenso dolor, incapacidad funcional, y sobreinfecciones, entre otros.

Actualmente se utilizan terapias paliativas tendientes a reducir el dolor e impedir sobreinfecciones, pero su efecto es de muy corta duración. Se ha planteado que ciertos preparados de plantas medicinales pueden tener un efecto benéfico en los procesos reparativos. Las partes de los vegetales empleadas como manejo terapéutico son muy variadas, incluyendo la planta entera y fresca; sin embargo, las hojas son la parte de las plantas más

utilizada en la preparación de extractos, probablemente por la gran cantidad de antioxidantes presentes en esta parte de la planta. Las formas de uso más frecuentemente reportadas son las infusiones y los cocimientos. La vía oral es la más frecuente y la administración para tratamiento de úlceras orales se realiza por medio de enjuagues, o bien ingiriendo la infusión o el cocimiento (8). Actualmente, existen preparados comerciales polivalentes, vendidos como extractos hidro-alcohólicos, jarabes, cremas, etc. pero estos preparados son administrados sólo por vía oral o tópica, sin existir formas farmacéuticas adecuadas, para cada caso en particular, según la patología que lo requiera.

Dentro de las plantas medicinales de uso masificado en Chile destaca la *Buddleja Globosa* Hope o “Matico”, planta nativa chilena, de la cual ya existen varios estudios agronómicos respecto de las características de la planta silvestre y domesticada (9). Sin embargo, su fama ha trascendido poco fuera de nuestras fronteras y por esta razón, la información química y farmacológica existe casi exclusivamente en Chile. Sus preparados, ya sea en infusiones, extractos hidro-alcohólicos o extractos secos, son utilizados por la medicina popular (Mapuches) principalmente como cicatrizantes de heridas y como anti-inflamatorios (10). Las hojas de esta planta tienen además, un alto contenido de polifenoles, compuestos de reconocida actividad antioxidante, lo que explicaría en parte, su actividad reparativa y anti-inflamatoria (11).

Otra planta medicinal muy usada en Chile es el *Plantago Major* L. o “llantén” utilizada durante siglos en muchas partes del mundo, para el tratamiento de problemas y enfermedades relacionadas con la piel, como la cicatrización de heridas y el acné. Además se utiliza para el tratamiento de afecciones respiratorias como el asma, las úlceras en el sistema digestivo y como hepatoprotector. Los preparados de llantén presentan además, propiedades analgésicas y anti-inflamatorias, debido a su contenido en alcaloides, heterósidos iridoideos y flavonoides.

Lamentablemente son escasos los estudios científicos y principalmente farmacológicos limitando el uso médico del matico y del llantén, dejando abandonado un extenso campo de conocimiento respecto a sus posibles usos, y en este caso particular, en la reparación de mucosa bucal.

Investigaciones realizadas por nuestro equipo han demostrado que un extracto hidro-alcohólico de matico estandarizado acelera el proceso de cicatrización de la piel de la zona cervical de ratas Sprague Dawley (manuscrito en revisión). Más aún, hemos estandarizado un extracto seco del cual se han realizado los estudios de la posología para su uso clínico (manuscrito en preparación).

Considerando los antecedentes de la literatura y los obtenidos en el laboratorio de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, es que postulamos que formulaciones semisólidas que contengan extractos de matico y llantén podrían acelerar y mejorar el proceso de cicatrización de úlceras bucales. Para probar la veracidad de este postulado se contará con el apoyo de la empresa Laboratorios Ximena Polanco que donará la formulación farmacéutica preparada a partir de extractos de matico y llantén incluidos plastibase, polímero comercial. Este preparado será administrado a ratas Sprague Dawley con heridas estandarizadas inducidas en mucosa palatina. El proceso de reparación se evaluará macroscópicamente en forma diaria y microscópicamente mediante análisis histopatológicos de los paladares en diferentes tiempos de observación.

Antes de presentar los resultados, en este trabajo de tesis se presenta un breve marco teórico respecto a aspectos generales de reparación de tejidos blandos y particularmente de la mucosa oral, algunos aspectos respecto a la terapéutica usando plantas medicinales, también llamada Fitomedicina y finalmente algunos aspectos respecto a las lesiones ulcerativas de la cavidad bucal.

MARCO TEÓRICO

REPARACIÓN TISULAR

Para sobrevivir es esencial que el organismo sea capaz de sustituir las células lesionadas o muertas y de reparar los tejidos donde se ha producido una alteración de la continuidad de la superficie (12). La reparación de los tejidos comprende dos procesos distintos pero complementarios la regeneración o sustitución de las células lesionadas por otra de la misma clase o la reparación por tejido conjuntivo denso, llamada fibrosis, que deja una cicatriz permanente (13). Inmediatamente después de una lesión se deben activar una serie de vías intra y extracelulares las cuales, coordinadamente, activarán y/o inhibirán una serie de funciones celulares destinadas a restaurar la integridad del tejido y su homeostasis. Componentes celulares del sistema inmune, la cascada para la coagulación sanguínea y las vías inflamatorias son además activadas. Muchos tipos de células, incluyendo células inmunes (neutrófilos, monocitos, linfocitos y células dendríticas), endoteliales, queratinocitos y fibroblastos, sufren cambios marcados en su expresión de genes y fenotipo, llevando a proliferación celular, diferenciación y migración.

El proceso reparativo tisular en el ser humano tiene un origen filogenético común, por que su fisiopatología es similar en cualquier tejido irrigado del organismo. De acuerdo a lo anterior el proceso reparativo como tal implica una cascada de eventos que se superponen en el tiempo y su duración dependerá del tipo de herida y de la extensión de ella. Estas etapas no pueden ser disociadas unas de otras, sin embargo, para individualizar la cinética del proceso, éste se subdivide en fases considerando para ello, sólo las modificaciones morfológicas básicas que se producen en los tejidos (1).

1. Fase Inflamatoria

La inflamación como primera respuesta del tejido frente a una noxa forma parte del sistema inmunológico que se activa frente a invasores extraños tales como virus y bacterias o tejidos lesionados por causas químicas, bioquímicas o traumáticas (14). En estas condiciones se activan terminaciones nerviosas que transmiten dolor, provocando la liberación de moléculas que actúan como neurotransmisores dilatando los vasos del tejido en el que son liberadas, desencadenando la inflamación (15). **La fase inflamatoria** se inicia en el momento en que se produce la herida, de inicio rápido (horas), aumentado en magnitud hasta la reacción máxima (3 días), antes de ir resolviéndose poco a poco, dependiendo de las condiciones fisiológicas presentes (13). La respuesta inicial de los tejidos frente a la injuria continúa con **la hemostasia**, que se inicia con la vasoconstricción dada por la contracción del músculo liso bajo el endotelio. El endotelio de los vasos dañados produce su propio vasoconstrictor, la endotelina, los demás mediadores de la vasoconstricción derivan de las catecolaminas circulantes (adrenalina), del sistema nervioso simpático (noradrenalina) y de las prostaglandinas liberadas por las células dañadas (16). Cabe señalar además, que en el proceso posterior de coagulación y de activación plaquetaria, también son aportados estímulos adicionales para la vasoconstricción a través mediadores tales como: bradicinina, fibrinopéptidos, serotonina y tromboxano A₂. Otro factor importante en la hemostasia inicial es la acción de las plaquetas las cuales activadas contribuyen a la hemostasia a través de su adherencia, agregación y degranulación. La presencia de plaquetas en el lugar de la lesión es estimulada por la trombina y el colágeno expuestos en el interior de la matriz subendotelial de la lesión, el colágeno contacta con la sangre que fluye e induce la adhesión de las plaquetas circulantes. Esta adherencia plaquetaria se logra por las interacciones entre las glucoproteínas VI plaquetarias y el colágeno (17).

Además, ocurren interacciones entre el complejo de la glicoproteína plaquetaria Ib-V-IX y el factor de Von Willebrand unido al colágeno. Asimismo las integrinas plaquetarias contribuyen a la adhesión de las plaquetas al colágeno, al factor de Von Willebrand, al fibrinógeno y a otras plaquetas.

También el factor tisular activa **la vía extrínseca de la coagulación**, determinando la producción de trombina, la trombina inicia a su vez en forma independiente la activación plaquetaria e interactúa con un receptor de la superficie plaquetaria (Par1), liberando ADP, serotonina y tromboxano A₂ (18), estas moléculas refuerzan la agregación plaquetaria, además de ser potentes mediadores de la vasoconstricción (16). La agregación plaquetaria en el entorno de la matriz de fibrina forma un coágulo o trombo, el cual limita la pérdida de sangre, estableciendo una barrera protectora que proporciona un reservorio a los factores liberados por la degranulación de las plaquetas. Estas moléculas fomentan una serie de mecanismos celulares y extracelulares importantes para la hemostasia, así como para otras etapas del proceso de reparación de las heridas. Entre ellos podemos mencionar el depósito de la matriz, quimiotaxis, proliferación celular, angiogénesis y remodelación (17). Como producto final de ambas vías de la coagulación, se activa la producción masiva de trombina, la cual cumple dos funciones esenciales y complementarias: 1) cataliza la conversión del fibrinógeno en fibrina, 2) inicia la activación plaquetaria, con lo cual se obtiene el tapón hemostático definitivo o coágulo fibrinoplaquetario.

Otro acontecimiento importante en esta etapa es **la respuesta celular o cascada celular** frente a la injuria, la cual está dada principalmente por la activación de células sanguíneas (leucocitos), las cuales liberan moléculas de señalización que atraen a otras células de defensa del organismo, dilatan los vasos, permitiendo así el paso de leucocitos a los tejidos. En estas condiciones se activa la síntesis de eicosanoides entre ellos, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, sustancias que actúan sobre la permeabilidad

vascular y la agregación plaquetaria (15). Los fosfolípidos componentes de la membrana plasmática, actúan como reserva de ácido araquidónico. Este ácido es hidrolizado desde los fosfolípidos de membrana mediante las fosfolipasas A2 y C (PLA2 y PLC) el que una vez liberado, se convierte en prostaglandina (PG2) y en tromboxanos mediante la acción de la enzima ciclooxigenasa (COX-2) o en leucotrienos e hidroxiácidos, mediante la 5-lipo-oxigenasa. Las prostaglandinas, el sistema del complemento, la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor plaquetario 4 (PF4) y los productos bacterianos (18), son los encargados de activar a los neutrófilos, primer subgrupo de leucocitos importante de la cascada celular. Estas células alcanzan el lugar de la lesión en gran número pasadas 24 a 48 horas. En este período los neutrófilos representan aproximadamente la mitad de todas las células de la herida, ejerciendo como función principal la defensa de la herida frente a las bacterias y la eliminación del detritus tisular. Para esto, los neutrófilos liberan diversos tipos de enzimas proteolíticas que catalizan la descomposición de las bacterias y la matriz extracelular del foco de lesión. Sin embargo, gracias a los inhibidores de las proteasas se puede proteger el tejido que no interviene en el proceso inflamatorio, para evitar su destrucción. El detritus bacteriano y matricial degradado es eliminado de la herida por fagocitosis neutrofílica. Además de las proteasas, los neutrófilos producen especies reactivas del oxígeno (EROs) que se combinan con el cloro, las cuales permiten la degradación de las biomoléculas dañadas por la injuria (19). Una misión secundaria de los neutrófilos es perpetuar la fase inicial de la inflamación mediante la eliminación de citosinas (18; **Error! Marcador no definido.**). En este sentido una citosina importante es el TNF- α , que aumenta la quimiotaxis de los neutrófilos y estimula la expresión de factores de crecimiento necesarios para la angiogénesis y la síntesis de colágeno por macrófagos, queratinocitos y fibroblastos. Por último con el paso del tiempo,

los neutrófilos son eliminados de la herida por apoptosis o por la fagocitosis de los macrófagos, los que además, actúan destruyendo oxidativamente las partículas fagocitadas. En esta función también se induce la generación de EROs (20) y la liberación de una serie de mediadores químicos, como son las prostaglandinas. Las EROs son especies reducidas del oxígeno muy reactivas, producidas normalmente dentro del metabolismo aeróbico del organismo, fundamentalmente en la mitocondria donde son parte del proceso de respiración celular. Además, estas moléculas en bajas concentraciones modulan diversos procesos:

- Metabolismo de prostanoïdes,
- Auto-oxidación de catecolaminas
- Activación de fagocitos
- Angiogénesis en una herida.

Estas especies reactivas son liberados al medio extracelular por los leucocitos después de ser activados por la presencia de microorganismos, citoquinas, complejos inmunes, o después de la fagocitosis. Las principales EROs producidas intracelularmente son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH). Estas especies atacan biomoléculas tales como ácidos nucleicos, proteína y lípidos, alterando su estructura y función biológica (21) (figura N°1). Este fenómeno se desencadena cuando las defensas antioxidantes celulares no son capaces de regular la síntesis y/o la remoción de estas especies, provocando “estrés oxidativo”.

Es sin duda en la reparación donde las EROs juegan un papel protagonista. Su liberación extracelular regulada, permite su acción como señalizadores intracelulares de diversas cascadas metabólicas, entre ellas, la defensa contra los patógenos invasores y la eliminación de detritus celulares. Las EROs son producidas en grandes cantidades en tejidos lesionados especialmente en la etapa inflamatoria de la reparación donde la enzima

NADPH oxidasa presente en las células proinflamatorias cataliza la reducción del oxígeno molecular a $O_2^{\cdot-}$. Este radical rápidamente dismuta a H_2O_2 , reacción que es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). A pesar que el H_2O_2 , no es un radical, puede causar graves daños en la célula por la generación de radical hidroxilo en presencia de iones de Fe^{3+} o Cu^{2+} (reacción de Fenton). Estos radicales hidroxilo son muy reactivos, de aquí su capacidad de dañar macromoléculas.

Los mecanismos antioxidantes que regulan la concentración celular de las EROs están constituidos por enzimas y compuestos no-enzimáticos. Entre ellos podemos mencionar:

- La superóxido dismutasa (SOD), enzima que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno.
- La catalasa, enzima que convierte el peróxido de hidrógeno en H_2O y O_2 .
- La glutatión peroxidasa, enzima que convierte los peróxidos en alcoholes.
- El ácido úrico, un potente antioxidante presente en el plasma en una concentración mucho mayor que el ascorbato (vitamina C).
- La proteína Ceruloplasmina, la principal transportadora de cobre en el suero.
- El Glutatión (GSH), principal antioxidante no enzimático celular, dada su alta concentración en el organismo.
- Las vitaminas E, A y C
- Antioxidantes polifenólicos aportados por la dieta

Debido a su corta vida media la concentración de EROs son difíciles de determinar *in vivo*. Generalmente, el estudio de estos oxidantes se logra indirectamente en base a las enzimas que los producen o los productos biológicos de su actividad oxidante (líperoxidación, oxidación proteica, etc.).

En heridas de piel de murino se ha observado alta presencia de H_2O_2 en la etapa inflamatoria del proceso reparativo, en comparación con las etapas posteriores (22). Otra observación relevante es que se ha encontrado alta presencia de malondialdehído y 4-hidroxi-2-nonenal, ambos subproductos de la oxidación lipídica (de la membranas biológicas) en úlceras venosas crónicas en comparación con úlceras venosas agudas, lo que sería indicador de presencia de estrés oxidativo en heridas crónicas, que probablemente es el resultado de la persistencia de un fuerte infiltrado inflamatorio (23).

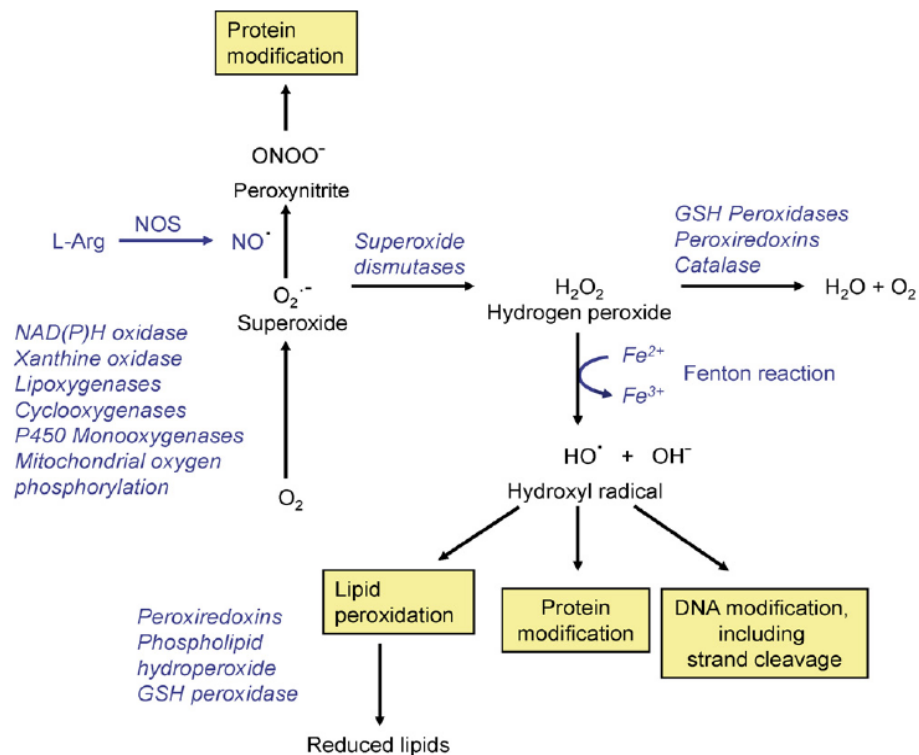


Figura N° 1.
Generación de EROs y sus efectos celulares

2. Fase Proliferativa.

Se produce aproximadamente a partir del cuarto día desde que se produjo la herida y tiene como objetivo la reconstitución vascular y la recuperación del tejido dañado gracias a la proliferación de fibroblastos y del epitelio (12). Los fibroblastos ilesos de los tejidos colindantes a la herida y otros originados a partir de células mesenquimáticas pluripotenciales se activan gracias a mediadores químicos sintetizados por los macrófagos en la fase inflamatoria (13). Estos fibroblastos pueden migrar al coágulo, pasando a formar parte de la malla de fibrina que utilizan como matriz provisoria. En el proceso global las citoquinas y los factores de crecimiento secretados por los macrófagos, serán los encargados de estimular y regular la migración y proliferación de las células encargadas de la reconstitución de tejidos y vasos.

Se ha mostrado una alta síntesis de tropocolágeno por parte de los fibroblastos al tercer o cuarto día después de la lesión. También secretan fibronectina, una proteína con múltiples funciones tales como: ayudar a estabilizar la fibrina, permitir el reconocimiento del material extraño que debe ser removido por el sistema inmunológico, participar como factor quimiotáctico de los fibroblastos y ayudar a guiar a los macrófagos en su actividad fagocitaria a lo largo de la red de fibrina (14).

El proceso reparativo no puede progresar sin la angiogénesis (neoformación vascular a partir de vasos pre-existentes), ya que se debe garantizar un aporte adecuado de sangre, oxígeno y sustancias nutritivas (1). Asimismo, una herida bien irrigada se encuentra extremadamente vascularizada, incluso la permeabilidad de los capilares neoformados es mayor a la de los capilares normales, esto con el fin de responder al aumento del metabolismo en la herida y al progreso de la reparación. A partir del cuarto día y en interdependencia temporal con la reconstitución vascular, comienza a reemplazarse el coágulo por **tejido de granulación** que puede visualizarse en la superficie como pequeños gránulos rosados y vítreo-transparentes.

Al producirse el tejido de granulación óptimo, se observa clínicamente una superficie húmeda, brillante y de color rojo asalmonado; la cual actúa como sostén y relleno para la correcta función de los fibroblastos, los cuales ya en este momento, dado el aporte vascular adecuado, depositan el tropocolágeno, precursor del colágeno comenzando por debajo y atravesando la herida. Inicialmente el colágeno es producido en exceso y sus fibras están desorganizadas y su abundancia permite aumentar la resistencia de la herida (14). Sin embargo la herida no es capaz de resistir fuerzas de tensión durante esta fase, la cual dura de 4 a 6 días. Si la herida es sometida a alguna tensión al comienzo **de la fase fibroblástica**, los bordes de la herida se tienden a separar. No obstante, si es sometida a una tensión cerca del final de esta etapa, ocurre una unión entre el viejo colágeno y el nuevo colágeno formado a nivel de la lesión. Clínicamente al final de este período la herida presenta consistencia firme debido al excesivo acúmulo de colágeno, y eritematosa por el alto grado de vascularización. La herida alcanza entre 70% y 80% de la resistencia a la tensión respecto al tejido antes de ser lesionado (1).

3. Fase de remodelación:

El último acontecimiento en la reparación de la herida, y el más largo, es la maduración del colágeno, que empieza una semana después de la lesión y continúa hasta aproximadamente 30 días (17). Durante este período, el colágeno de la matriz sigue reabsorbiéndose y depositándose, remodelando y fortaleciendo la herida. Esta matriz inicial de colágeno difiere en su contenido y organización a la del tejido conjuntivo no dañado (12), el cual se compone en un 80 a un 90% de colágeno de tipo I y en un 10 a un 20% de colágeno de tipo III, en cambio la matriz colágena de la herida inicial consta en un 30% de colágeno de tipo III. La mayor proporción de este tipo de colágeno hace que la matriz sea más débil, además las fibrillas de colágeno del interior de la matriz están más glucosiladas y son más finas; estas fibras siguen una disposición

paralela y no se entrelazan. Al cabo de 1 semana la fuerza de esta matriz corresponde a un 3% de la del tejido no dañado, las colagenasas y las proteasas escinden y descomponen estas primeras fibrillas de colágeno (24). Este proceso se contrarresta con el depósito continuado de colágeno, lo cual aumenta el espesor, la fuerza y la organización del tejido. Con el tiempo, la relación entre el colágeno de tipo I y el de tipo III se aproxima a la del tejido conjuntivo intacto (19). A los 6 a 7 días, la herida se contrae para facilitar la reparación del tejido; se reduce la presencia vascular y de agua en el tejido de granulación, ganando consistencia. La epitelización cierra la herida por debajo de la malla de fibrina superficial, este proceso incluye la reconstitución de las células epiteliales superficiales vía queratinocitos a través de mitosis y migración celular, principalmente desde los bordes de la herida (25). En este proceso los fibroblastos del tejido de granulación, una vez que finalizan sus actividades de secreción, se diferencian parcialmente en fibrocitos (estado de reposo de los fibroblastos) y parcialmente en miofibroblastos, los cuales retraen el tejido cicatricial, logrando de este modo acercar los bordes de la herida. La capacidad para aproximar los bordes de este tejido depende mucho del tamaño, profundidad, localización y el tipo de herida, así como del estado nutricional, del cuidado de la herida y de la salud general del paciente (26).

FITOMEDICINA

La fitomedicina es la disciplina de la medicina que emplea plantas medicinales en terapéutica, ya sea en forma de extractos, infusiones, de cocciones, en un contexto científico y adoptando los criterios de investigación propios de la metodología científica: fases preclínicas, clínicas, ensayos farmacológicos, toxicológicos, mutagénicos, etc. Esta disciplina engloba tanto a la Fitofarmacología, que es la ciencia que estudia los fitomedicamentos, en cuanto a su mecanismo y sitios de acción (receptores), como a la Fitoterapia, que aplica los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico y busca además establecer las interacciones medicamentosas, contraindicaciones y efectos adversos (27). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha precisado el término fitofármaco como: “producto medicinal acabado y etiquetado, cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales”. Entendiéndose por material vegetal: jugos, resinas, aceites vegetales y cualquier otra sustancia de naturaleza semejante (28).

Las plantas medicinales son vegetales que en uno o más de sus órganos, contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica. Los orígenes de la utilización de plantas para tratar enfermedades u otras entidades nosológicas, tales como los síndromes de filiación cultural (empacho, mal de ojo, el aire, etc.), son tan antiguos como la humanidad misma. El acto de seleccionar plantas con propiedades medicinales, le confiere al hombre una propiedad singular; la de sanación propia o de sus semejantes. Este proceso de selección de hierbas curativas en los inicios de la humanidad, estuvo asociado a las características morfológicas de las plantas, raíces, hojas o frutos y su semejanza con la figura

humana o de órganos. También se basó en las acciones que sus diferentes preparados desencadenaban en los consumidores accidentales o voluntarios. En este último caso, se esbozaba ya en los comienzos de la historia, una estrategia que más tarde sería fundamental en las ciencias médicas; el principio de observación de un efecto asociado al uso de un determinado recurso terapéutico (29).

La Fitomedicina desde la antigüedad se ha interesado particularmente en las plantas empleadas por curanderos, y chamanes, así como en la medicina china y la ayurvédica (sistema de medicina hindú). Sin embargo, la medicina herbal oficialmente comienza a apartarse del uso de tinturas, extractos, de cocciones e infusiones de plantas y de los compuestos obtenidos de vegetales, y comienza a orientar su interés hacia los fármacos de síntesis, obtenidos en laboratorios químicos. Aun cuando ocurre este temprano alejamiento en la terapéutica, en el siglo XX se continúan usando las plantas como las mejores diseñadoras de moléculas-fármacos, pues no pocas veces el hombre se rinde frente a la imposibilidad de imitar estructuras naturales que constituyen la base de nuevos medicamentos. De este modo, la humanidad utiliza el laboratorio vegetal y aplica sus conocimientos sobre estructuras químicas preexistentes en las plantas, desarrollando una gran diversidad de fármacos que actualmente constituyen un 60% de los recursos terapéuticos modernos, surgiendo así, numerosos fármacos de síntesis que han sido ampliamente utilizados en las más variadas patologías (27).

Los extractos naturales utilizados con fines terapéuticos están constituidos por diversos compuestos de diferente naturaleza química, tales como polifenoles, isoprenoides, compuestos tiólicos, ácido ascórbico y polisacáridos, entre otros, en conjunto todos ellos contribuyen, bajo diferentes mecanismos, a ejercer los efectos terapéuticos característicos de un preparado natural. Así, **la soya** y verduras de hojas verdes como la espinaca y la lechuga contienen flavonoides de actividad diurética, cicatrizante, anti-

inflamatoria y flevoprotectora; **los eucaliptus** son ricos en fenilpropanoides con actividad analgésica, bactericida y anti-hipertensiva (30). Importante es destacar que la presencia y proporción de los principios activos en los preparados naturales, es característica de cada planta y del solvente empleado en la extracción.

Dentro de los usos etnomédicos en la zona central y la zona sur de Chile, de las plantas medicinales, destaca **la *Buddleja globosa* Hope**, mas conocida como “matico”. Figura entre las plantas más recomendadas en el manejo de las heridas, patologías gastrointestinales, donde se emplea contra dolor de estómago y disentería y patologías hepáticas y vesiculares (31). Por otra parte, se sabe que las hojas de matico tienen un alto contenido de polifenoles, compuestos de reconocida actividad antioxidante. El infuso de matico se utiliza como diurético, antiinflamatorio, antiséptico local y cicatrizante. El infuso también se administra en forma oral en caso de úlceras y lesiones de las mucosas, así como en el tratamiento de afecciones hepáticas (32). Se ha demostrado que el matico posee actividad antibacteriana la cual es atribuible a los glicósidos presentes en las hojas de la planta (33). Más aún, a partir de un extracto lipofílico de la raíz de *Buddleja globosa* se han aislado tres sesquiterpenos que muestran actividad anti-inflamatoria *in vitro*, inhiben tanto la ciclooxigenasa (COX-2) como la 5-lipooxigenasa (LOX) (34). La administración oral y tópica a partir de extractos seriados ha mostrado propiedades analgésicas y anti-inflamatorias (35). También existen estudios que demuestran los efectos estimulantes de la proliferación de fibroblastos *in vitro* (35). Varios autores (10, 36, 37, 38, 39) han destacado las cualidades reparativas de matico en piel y mucosas, sugiriendo el empleo de la infusión, polvos, cocimientos, compresas, lavados y pomadas de matico para la curación de heridas, y la infusión para úlceras y trastornos digestivos (40, 41, 42). Respecto a su toxicología, estudios de toxicidad aguda en ratones, han

mostrado que la administración oral del extracto crudo hasta 2 g/Kg e intraperitoneal hasta 600 mg/Kg, no evidencia efectos tóxicos (43).

Cabe recordar que en el proceso reparativo, el organismo se defiende de los estados patológicos activando procesos inflamatorios, donde los polimorfonucleares (PMNN) y los macrófagos, actúan principalmente destruyendo oxidativamente las partículas fagocitadas. En esta función se induce la generación de EROs. Investigaciones previas del Laboratorio han mostrado que el matico acelera la etapa inflamatoria del proceso reparativo de una herida de piel de rata. Asimismo, existe evidencia que el matico es capaz de inhibir la aparición de focos inflamatorios gastrointestinales provocados por la administración de fármacos de estructura nitrofuránosica (datos no publicados). Estos antecedentes parecen indicar que la capacidad antioxidante de matico podría estar involucrada en el efecto reparador observado. Más aún, el preparado utilizado en estos estudios parece estar enriquecido en principios activos de acción local a nivel de la herida, lo cual favorecería el proceso de reparación.

Otro extracto de plantas muy comúnmente usado como medicina natural en Chile es el que se obtiene del *Plantago major L.* miembro de la familia plantaginaceae, conocido por la población nativa (Mapuches) como "llantén". Esta planta es utilizada por sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, hepatoprotectoras, astringentes y antihemorrágicas, propiedades todas que favorecen el proceso reparativo de las heridas (44). Las investigaciones realizadas sobre *Plantago major* han revelado la presencia de mucílagos, pectinas, flavonoides, taninos, aucubósido (aucubina) y catapol (45). La Aucubigemina es el principio activo de mayor relevancia; proviene de sustancias inactivas como polímeros de este compuesto y de la Aucubina, en el proceso de catabolismo de esta sustancia. Por hidrólisis, se forma un dialdehído que actúa como bactericida, ya que desnaturaliza las proteínas de ciertos microorganismos; no obstante, si la planta se calienta, la

Aucubigenina pierde su efecto terapéutico (45). Las hojas contienen sustancias con propiedades anti-inflamatorias, como Plantamajosida, Baicaleína, Hispidulina, Aucubina, Acido Ursólico y Acido Oleanólico. Entre los Acidos Fenólicos se encuentran los Ácidos *p*-hidroxibenzoico, Siríngico, Gentísico, Caféico, Ferúlico, y *p*-hidroxifenilacético. Compuestos como acteosida y plantamajosida poseen propiedades antibacteriales; ciertos flavonoides y el ácido caféico cuentan con propiedades antioxidantes; los polisacáridos pépticos son efectivos contra úlceras y por sus actividades inmunoestimulantes (46).

En la actualidad existen medicamentos a base de compuestos propios de llantén que se comercializan sin mayores estudios científicos, especialmente farmacológicos y toxicológicos. Sin embargo, se utiliza principalmente como remedio casero, donde para su uso las personas recolectan plantas (hojas, semillas y la espiga) que crecen en su jardín, en terrenos baldíos o en potreros. Se emplean principalmente como infusión o ungüento (47). En el campo de la salud humana, entre los múltiples usos de esta planta, se encuentran la detención de la diarrea, disentería y amebiasis, por sus propiedades astringentes y hepatoprotectoras. Se ha visto además que una infusión de hojas de *P. major*, inhibe (82% a 95%) la acidez de la secreción gástrica (43).

Además existen distintas aplicaciones para tratar enfermedades como la tos, la faringitis, la laringitis, la bronquitis, la tuberculosis. Más aún, preparados de llantén se utilizan para curar el “dolor de garganta” y la “irritación en la boca” y para reducir la inflamación glandular. Esto se debe a que la planta cuenta con un alto contenido en mucílagos, que ejercen propiedades emolientes, que suavizan las mucosas respiratorias (45).

El llantén tiene propiedades hemostáticas, incrementando la coagulación sanguínea en las heridas, evitando hemorragias, las hojas del llantén frescas presentan buenas propiedades para desinfectar las heridas y

favorecer su reparación (43). Igualmente su aplicación sobre quemaduras de piel, estimula la reparación y reduce el dolor, esta propiedad se le atribuye tanto a su riqueza en taninos, con función cicatrizante y hemostática, como a su contenido en alantoína, sustancia que se caracteriza por estimular la regeneración de células epidérmicas. Es por ello que este componente es de gran uso en la industria de la cosmética y forma parte de la composición de cremas para la piel (44). Se ha evidenciado además, que el llantén inhibe la síntesis de ácido araquidónico en procesos de edema e inflamación y que sus iridoides, entre ellos la acubina, podrían ser los responsables de la actividad anti-inflamatoria descrita para esta planta (48).

Respecto a su toxicidad, pruebas en ratas donde se administró un extracto etanólico (70%) vía oral e intraperitoneal mostraron baja toxicidad (49).

LESIONES ÚLCERATIVAS DE LA MUCOSA BUCAL. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

Una de las lesiones más frecuentes en la boca, después de las caries y enfermedades periodontales, son las úlceras de la mucosa. Esta mucosa, debido a sus características anatómicas y a las funciones propias que desarrolla dentro del sistema estomatognático, es un lugar muy expuesto a lesiones ulcerosas de diverso origen.

Los términos erosión y úlcera se confunden con frecuencia y por error se emplean indistintamente. Se define **EROSIÓN** como solución de continuidad poco profunda del epitelio superficial, que no rompe la membrana basal, que aparece a la exploración clínica como un área eritematosa muy poco profunda y que sólo implica lesión superficial (49, 46). Se ha definido **ÚLCERA** como solución de continuidad más profunda que afecta a todo el espesor del epitelio superficial, alcanzando el tejido conjuntivo subyacente

resultando con apariencia de cráter que puede ser aumentado por edema y/o por proliferación del tejido que la rodea (5).

Las úlceras orales representan un grupo variable y llamativo de lesiones. Una lectura superficial de la relación anterior pone en evidencia que algunas de estas lesiones se deben a influencia local (ej. úlceras traumáticas), mientras que otras son manifestaciones de problemas sistémicos (como úlceras por déficit de vitamina B, entre otras) (50).

En general, el dolor es la principal característica de las úlceras orales traumáticas. Una vez que se forma este tipo de úlcera, el tejido va a estar sujeto a un proceso continuo de irritación debido a la acción de la saliva y de la microflora bucal. Esto favorece que una lesión inflamatoria aguda se torne crónica (5). La saliva aporta características propias para la evolución de estas lesiones ya que posee altas cantidades de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y, como las células epiteliales orales expresan receptores para EGF, se estimula la reparación epitelial. Las características intrínsecas del epitelio oral, con su gran velocidad de renovación (5 días aproximadamente) respecto de la piel, favorecen la reparación de las heridas y reducen la colonización microbiana, ya que los microorganismos unidos a las células epiteliales son rápidamente descamados a medida que los queratinocitos del epitelio celular se renueva (51).

Las heridas y úlceras de la mucosa bucal pueden deberse a causas diversas, desde una carencia de vitaminas del complejo B, alguna enfermedad de origen vírico, reacciones alérgicas o traumas principalmente en pacientes con aparatos ortodónticos o protésicos.

Las heridas y úlceras de la mucosa bucal se pueden clasificar de acuerdo a diferentes parámetros:

De acuerdo al inicio de la lesión se clasifican en úlceras primarias, es decir, no presentan una vesícula previa (Ej. úlceras traumáticas) y úlceras secundarias, que derivan de otras formas clínicas como pápulas y vesículas,

que sufren ulceración (Ej. vesículas). Las lesiones exofíticas suelen presentar este cambio secundario cuando se úlceran a causa de agresiones mecánicas crónicas o a una biopsia incisional.

De acuerdo a su evolución: en úlceras agudas, es decir, aquellas de instauración brusca y corta duración, como una úlcera traumática, y en crónicas: de instauración insidiosa y larga duración, como las de la tuberculosis (5).

Según su etiología donde se clasifican en:

a) Úlceras Traumáticas causadas ya sea por radiaciones, sustancias cáusticas, medicamentos, quemaduras, galvanismo, prótesis mal ajustada, cepillado violento, inyección de líquidos a presión (úlcera trófica), úlcera pterigoide y enfermedad de Riga-Fede.

b) Úlceras por Patologías sistémicas preexistentes donde encontramos **las úlceras neoplásicas** causadas por cáncer espinocelular, adenocarcinoma, sarcoma, linfoma, metástasis. **Las úlceras infecciosas** causadas por bacterias (como: gingivitis ulcero necrótica, sífilis, TBC), causadas por virus (como: gingivoestomatitis herpética primaria , herpes recurrente intraoral, herpes-zoster, varicela, herpangina, mononucleosis) o causadas por hongos (como: candidiasis, blastomicosis, histoplasmosis, etc). **Las úlceras inmunológicas:** causadas por liquen plano erosivo, ulceración recurrente oral, pénfigo, penfigoide, eritema multiforme, síndrome de Behcet, síndrome de Reiter, granuloma letal de la línea media. **Las úlceras como manifestaciones de enfermedad general:** déficit de ácido fólico, hierro y vitamina B12, leucemia aguda, diabetes, agranulocitosis, etc.. Esta última clasificación es más útil, ya que plantea la causa de la lesión y por ende orienta en el tratamiento (52).

A continuación se describirán algunas de las úlceras de la mucosa oral más comunes.

Úlcera recurrente oral

La úlcera recurrente oral (URO), o recidivante, es una enfermedad crónica de carácter inflamatorio, caracterizada por la aparición de una o varias úlceras (aftas) en la mucosa oral, generalmente en zonas no queratinizadas, de histología inespecífica, que persisten durante días o semanas provocando dolor, y recurren después de períodos de remisión muy variables (53, 54).

Úlceras secundarias por Virus del herpes simple

El virus del herpes simple (VHS) es un patógeno humano común que posee dos serotipos: el tipo 1 afecta fundamentalmente a la cavidad oral, mientras que el tipo 2 se encuentra más relacionado con las infecciones genitales. El contagio se produce por contacto directo (55). Las manifestaciones clínicas varían en función de si la infección es primaria o secundaria, así como de la localización anatómica. A diferencia de las URO, afectan principalmente mucosa masticatoria, queratinizada, límite mucocutáneo y se produce por ruptura de las vesículas.

Úlcera por Carcinoma oral de células escamosas

Todas las neoplasias malignas bucales pueden producir en su evolución una ulceración. Las observadas con más frecuencia, son las debidas al carcinoma de células escamosas (COCE) (56). El COCE posee diversas formas de presentación que pueden agruparse en 3 grandes grupos: exofíticas, endofíticas y mixtas. Las formas endofíticas se suelen presentar como una lesión ulcerada y solitaria en la mucosa oral, según avanzan adquieren un aspecto crateriforme, con una base indurada y bordes evertidos y puede producirse o no dolor. Todas las úlceras con o sin borde indurado, generalmente indoloras, erosiones o máculas, que no reparan tras un período de 15 días después de haber eliminado el posible agente etiológico, deben ser biopsiadas y considerar su posible malignidad. Esto es especialmente

importante cuando hay antecedentes de consumo de alcohol y tabaco en el paciente, así como cuando las lesiones se presentan en localizaciones de alto riesgo, como las caras ventral y lateral de la lengua, el suelo de la boca y el paladar blando, en estos casos sólo la biopsia podrá ofrecer un diagnóstico diferencial con el resto de lesiones orales que cursan con la aparición de úlceras (57).

Úlceras traumáticas

Las úlceras traumáticas son lesiones de alta frecuencia en los tejidos blandos bucales. Generalmente producidas por una irritación mecánica, química, eléctrica o térmica, cuya principal característica es la presencia de una relación causa-efecto (58). Suelen cursar como episodios dolorosos de corta duración, y que pueden recurrir si el agente que los ocasiona no se elimina.

Las úlceras por mordeduras accidentales son frecuentes tras la realización de anestésicos locales en niños; suelen aparecer en la mucosa vestibular, en el labio inferior o en la lengua (59). Un diente roto o con un borde cortante puede provocar una úlcera de etiología fácilmente identificable (60). Las úlceras por decúbito de las prótesis se caracterizan por la aparición de un dolor agudo de intensidad moderada, con la presencia de un área central blanco-amarillenta, de aspecto limpio y no hemorrágico con un halo eritematoso (7). Asimismo, pueden aparecer por la colocación de una radiografía intrabucal al día siguiente de realizar la exploración. La irritación química (por exposición a sustancias ácidas o básicas) también produce ulceraciones, es el caso de la aplicación local de antiinflamatorios no esteroideos, como la aspirina (5).

Se han descrito úlceras orales provocadas por el empleo inadecuado de productos para la higiene de las prótesis removibles (pastillas limpiadoras), la liberación de peróxido de hidrógeno en las zonas de aplicación conlleva a la

destrucción tisular a través de un mecanismo de necrosis licuefactiva. Las quemaduras eléctricas en la cavidad oral suelen ocurrir en niños, al chupar o masticar un cable eléctrico activo, las localizaciones más habituales son los labios y las zonas anteriores de la boca (58). Las quemaduras térmicas suelen aparecer en la lengua o el paladar asociados con la ingesta de alimentos retentivos muy calientes que se pueden adherir a la superficie mucosa. Las úlceras auto inducidas se pueden apreciar en niños o en pacientes con alteraciones psicológicas que pellizcan su encía de forma repetitiva con las uñas o con otros objetos (5).

Clínicamente las úlceras traumáticas se observan de forma irregular, limitadas, con un centro de tejido necrótico de color blanco-amarillento, y rodeadas por una ancha banda eritematosa. De tamaño variable y evolucionan con una reparación espontánea, en un periodo entre 10 a 14 días, sin dejar cicatriz. Dentro de las primeras 24 horas de producirse el trauma hay un aspecto sintomático, dolor y enrojecimiento de la mucosa. Luego la etapa pre-ulcerativa, se caracteriza por una mácula eritematosa localizada con una discreta elevación de consistencia firme, con una membrana fibrinosa superficial, halo eritematoso y dolor. La tercera es la etapa ulcerativa cuando ya la membrana es blanquecina y necrótica, que sucede en un periodo entre 1 a 3 días. Un exudado fibrinoso blanquecino amarillento es formado en el piso de la úlcera, persistiendo el halo eritematoso y la lesión asume un aspecto crateriforme. En esta etapa la ulcera alcanza su desarrollo máximo, y el dolor tiende a disminuir, aportando una sensación de bienestar para el paciente. La cuarta etapa es la reparativa, ocurre espontáneamente, como en el resto del organismo (61). Respecto a la fisiopatología de estas lesiones, y a su carácter de traumáticas, la respuesta de los tejidos es inespecífica, presentándose primeramente pérdida de continuidad de la superficie epitelial, cubierta por un exudado fibrinoso. El epitelio del borde de la úlcera muestra actividad proliferativa; además, el corión se observa densamente infiltrado de células

mononucleares y PMNN, particularmente bajo el área de la ulceración, aunque en las lesiones crónicas esta puede ser remplazada por linfocitos y células plasmáticas. Al igual que el proceso reparativo común de esta mucosa, se destaca la prominente actividad fibroblástica, macrófagos en número moderado y también numerosos vasos de neoformación cerca a la malla de fibrina. En resumen, se observa un proceso fisiológico normal de reparación.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

El preparado de *Buddleja globosa* Hope y *Plantago Major L.* aumenta la velocidad de reparación de una herida de mucosa palatina en ratas Sprague Dawley.

OBJETIVO GENERAL

Comparar clínica e histomorfologicamente el efecto de un preparado de hojas de *Buddleja globosa* Hope y *Plantago Major L.* respecto a controles con plastibase sola y no tratado, en el proceso reparativo de una herida estandarizada en mucosa palatina de rata

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinación espacio-temporal del proceso reparativo de una herida estandarizada en mucosa palatina de rata, mediante una escala de evaluación clínica.
2. Analizar y comparar clínicamente el proceso reparativo de una herida estandarizada en mucosa palatina de rata, tratada con preparado de Matico y Llantén (en preparación plastibase), sólo con la plastibase y sin tratamiento anexo.
3. Comparar las características histomorfológicas del proceso reparativo de una herida estandarizada en mucosa palatina de rata, tratadas con preparado de Matico y Llantén (en preparación plastibase), sólo con la plastibase y sin tratamiento anexo.

MATERIAL Y METODO

DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Es un estudio de efectividad de reparación de mucosa oral de un preparado herbal en una experimentación con ratas.






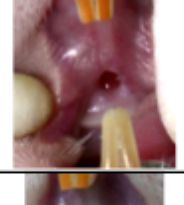

DETERMINACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DEL PROCESO REPARATIVO NORMAL DE UNA HERIDA ESTANDARIZADA EN MUCOSA PALATINA DE RATA

Debido a la falta de antecedentes descriptivos en la literatura respecto al proceso reparativo de una herida en mucosa palatina de rata Sprague Dawley (ratas SD), se determinó el proceso en su dimensión espacial y temporal, mediante un modelo experimental efectuado en las dependencias del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad De Chile.

Usando un bisturí circular Punch de 3 mm de diámetro, se realizó una ulcera de espesor total (Hasta el periostio) en el paladar de 2 ratas Sprague Dawley. La evolución clínica de esta herida fue observada diariamente usando una encuesta de evaluación clínica (ver criterios en tabla N° 2), anotando las características del proceso reparativo, y midiendo diariamente la evolución del diámetro de la ulcera generada. Esto permitió caracterizar las etapas de la reparación y sus determinantes clínicos.

Las observaciones diarias se describen en la tabla N° 1. Dado que después de 7 días de observación se apreciaron cambios clínicos significativos respecto al inicio de la herida, se decidió detener el experimento después de 7 días de iniciado. Se establecieron las variables temporo-espaciales y se efectuó el diseño experimental para el modelo de reparación de herida palatina de 3mm en ratas Sprague Dawley de 250-350g.

Tabla N°1
Estado diario de reparación clínica de herida palatina en ratas SD

DIA	CARACTERISTICA	IMAGEN
Día 1	Herida eritematosa, hemorrágica, con bordes rojos sollevantados, fondo socavado y tejidos vecinos eritematosos. Diámetro de la herida 3mm	
Día 2	Herida eritematosa, abundante exudado seroso, bordes rojos sollevantados, con fondo socavado, presencia incipiente de fibrina y tejidos vecinos eritematosos. Diámetro de la herida 3mm	
Día 3	Herida eritematosa, exudado seroso, bordes rojos sollevantados, fondo menos socavado que el día 2, presencia de fibrina gris-amarillento, tejidos vecinos menos eritematosos que el día anterior. Diámetro de la herida de 2,9 mm	
Día 4	Herida con fondo gris amarillento, con exudado seroso, bordes rojos, menos sollevantados que el día anterior, color rojo, fondo plano, con presencia franca de fibrina (gris amarillenta) y los tejidos vecinos se observan menos eritematosos que el día anterior. Diámetro de la herida de 2,8 mm.	
Día 5	Herida de color gris-amarillento con bordes rojizos, sin exudado evidente, bordes planos, fondo plano, abundante fibrina, y los tejidos vecinos se observan de un leve color eritematoso. Diámetro de la herida de 2,8 mm	
Día 6	Herida rosada, exudado seroso, con bordes planos, fondo plano rojizo, sin presencia de fibrina y con tejidos vecinos de color rosados: diámetro de la herida de 2,6 mm	
Día 7	Herida con bordes de color rosados y planos, fondo plano de color rojizo, tejidos vecinos normales. Diámetro de la herida de 2,5mm	

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los animales fueron adquiridos y mantenidos en el Bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Durante el tiempo de experimentación se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad (40-50 %), con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, con una dieta estándar de pellet marca Champion® y agua *ad libitum*.

Este Protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Cuidado Animal de la Facultad de Medicina de la U. de Chile (ver Anexo 1)

MÉTODO

36 ratas (*Rattus norvegicus*) machos de la cepa Sprague Dawley, con un peso promedio de 250 ± 20 g, fueron divididas en 3 grupos de 12 ratas cada uno: experimental, control 1 y control 2. Las ratas fueron anestesiadas con Ketamina 10 % (pharma genex) y Xilacina 2% (pharma genex) a una dosis de 90 y 10 mg/Kg respectivamente vía intraperitoneal. Se esperó un margen de tiempo entre 5 y 8 minutos para obtener el nivel de anestesia, necesario para el procedimiento. Luego se realizó una lesión con un bisturí Punch, de 3 mm de diámetro, de espesor total (mucoperiostico) en el paladar anterior de cada rata (Figura. 3 d, e y f).

El Grupo Experimental recibió Preparado herbal consistente en plastibase con 10% de extracto hidro-alcohólico de Buddleja Globosa y Plantago Major estandarizado (donado por Laboratorios Ximena Polanco S.A.), 2 veces al día por 7 días.

El Grupo control 1 (C1) recibió plastibase sola (Preparado magistral de plastibase oral B®, Farmacias Ahumada) sin el principio activo, es decir sólo el carrier farmacéutico (excipiente). 2 veces al día por 7 días.

Esto debido a que la plastibase por si sola genera un efecto mejorando la reparación, ya que protege la zona afectada y evita la irritación provocada por la masticación y otras funciones bucales habituales (62). Se usó este grupo con el fin de tener aislados los efectos del compuesto activo (Matico y Llantén) y del excipiente por separado.

El Grupo control 2 (C2) no recibió medicamento, la herida se dejó seguir su curso habitual de reparación.

EUTANASIA

Los animales en cada grupo fueron sacrificados por decapitación a los 2, 5 y 7 días.

La eutanasia de los animales fue realizada a través de uno de los métodos aceptados por la “Asociación Médico Veterinaria de América” (Pritchett y Corning, www.ivis.org) y la “Asociación Chilena de Ciencias de Animales de Laboratorio (ASOCHICAL)”, el que contempla la utilización de una guillotina de decapitación, que procura una muerte rápida, con mínimo sufrimiento. Los paladares que contenían las heridas, fueron rápidamente disecados en frío, lavados en suero fisiológico y fijados en *p*-formaldehído al 4 % en PBS, por 48 h.

EVALUACION CLINICA DE LOS ANIMALES

Cada día las heridas de los animales fueron evaluadas clínicamente. Esta evaluación del proceso reparativo se realizó usando una pauta que encuesta 7 dominios, cada uno con las diferentes características de los parámetros clínicos que enmarcan el proceso reparativo. Para el análisis de los resultados entregados por esta encuesta, se asignó a cada característica una puntuación de 1 a 3, ordenándolas de modo que un valor total más alto en la encuesta, significa un proceso de reparación mas avanzado. El conjunto de características se muestran en la tabla N° 2.

Tabla N° 2
Encuesta de Valoración de parámetros clínicos de reparación de la
úlceras palatina

Características	Criterio			Puntaje
Color	Rojo eritematoso	Gris/Amarillo	Rosado	
	1	2	3	3
Exudado	Sangrante	Seroso	Sin exudado	
	1	2	3	3
Bordes	Solevados	Planos		
	1	2		2
Color bordes	Rojo eritematoso	Rosado		
	1	2		2
Presencia Fibrina	Si	No		
	1	2		2
Fondo	Socavado	Plano		
	1	2		2
Tejido vecino	Isquémico	Eritematoso	Normal	
	1	2	3	3
			TOTAL MAXIMO	17

Las variables de cada característica clínica son definidas a continuación.

Color de la herida

- **Eritematoso:** Traducción clínica de un proceso reparativo agudo o de reciente evolución; microscópicamente existe abundante extravasación sanguínea por la lesión vascular, formación de un coágulo. Hay vasodilatación e hiperemia, aumento del líquido intersticial por aumento de la permeabilidad vascular, formación de un infiltrado celular inflamatorio agudo.
- **Gris/Amarillo:** Este color corresponde a un estado de reparación intermedio subagudo; ésta característica clínica corresponde al depósito abundante de fibrina en la herida.
- **Rosado:** Avance del epitelio y su engrosamiento para recuperar el grosor de sus capas. Reducción en las características de la fase inflamatoria y maduración del tejido de granulación con aumento de fibroblastos y de fibras reticulares, reducción paulatina del número de vasos.

Presencia de Exudado

- **Sangrante:** Expresión clínica de la hemorragia producida por pérdida de continuidad del tejido sano, es decir, expresa la destrucción reciente del tejido.
- **Seroso:** Fase Inflamatoria con presencia de exudado que drena del líquido tisular abundante por el edema.
- **Sin exudado:** Demuestra una fase más avanzada del proceso reparativo en que se ha reabsorbido el edema, hay angiogénesis y fibroplasia; y por lo general esta presente el tejido de granulación que madura.

Aspecto de los Bordes de la herida

- **Solevantados:** Expresa clínicamente el aumento de volumen del tejido lesionado debido a la liberación de sangre en el intersticio (por hemorragia), a la presencia de edema y de un infiltrado celular

inflamatorio generalmente debido a la herida reciente; indica plena fase inflamatoria del proceso de reparación.

- Planos: indica la reducción del infiltrado inflamatorio, relacionado con la recuperación de la circulación y el paso a una etapa más proliferativa.

Color de los Bordes de la herida

- Eritematoso: la mucosa del borde de la ulcera presenta color rojo vivo y a veces un rojo vinoso oscuro, esto debido a la congestión vascular asociada a la hemorragia reciente, al proceso inflamatorio activo, a la presencia además de mayor número de vasos de pequeño calibre en el conjuntivo (formación del tejido de granulación) y en ocasiones a la presencia de necrosis en los bordes.
- Rosado: Este parámetro indica una mucosa cuyo epitelio se ha engrosado y ha recuperado su irrigación, la cantidad de vasos se ha reducido y hay aumento de colágeno de tipo III que va madurando lentamente, el infiltrado inflamatorio se ha reducido.

Presencia de fibrina:

- Si: Expresión clínica del proceso hemostático, indica una etapa post-aguda o inflamatoria de la reparación.
- No: Indica la ausencia parcial de hemostasia en la herida; es predictor de anomalías en el proceso normal reparativo según la etapa en la que se observe.

Aspecto del Fondo de la herida

- Socavado. Expresión de la pérdida de tejido y del aumento de volumen de los bordes de la herida debido a una fase inflamatoria en el proceso de reparación
- Plano: Característica que indica un proceso proliferativo tisular en vías de restituir el defecto generado parcial o totalmente, microscópicamente se caracteriza por alta tasa mitótica celular, neo-angiogénesis, aposición de fibras de la MEC. etc.

Aspecto de los Tejidos vecinos

- **Isquémico:** El tejido inmediatamente vecino a la herida entrega indirectamente características de la normalidad del proceso reparativo. En este caso si es de características isquémicas esto indicará que probablemente esta llegando insuficiente irrigación a los bordes de la herida, lo que determinará una reparación anómala.
- **Eritematoso:** Indicativo de la presencia de alta vascularización, en relación a los bordes de la herida, es probablemente un buen indicador de un óptimo proceso reparativo inicial.
- **Normal:** Este parámetro de normalidad se busca observando un área de tejido vecino mas alejado de la herida, esta característica indicará según la etapa reparativa en que se observe, un proceso reparativo en etapas finales con predominio crónico reparativo por sobre el agudo inflamatorio.

Medición del diámetro de la herida

Además diariamente se midió el diámetro de la herida usando una sonda periodontal, mediante el posicionamiento del extremo activo de la sonda en sentido paralelo respecto a los incisivos de la rata (Figura 2). El resultado se expresó en mm.



Figura N°2

Medición del diámetro de la ulcera mediante una sonda periodontal.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y CORTES HISTOLÓGICOS

Todos los procedimientos histológicos fueron realizados en el Laboratorio de Histología e IREPO de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los paladares fueron fijados por inmersión en *p*-formaldehído al 4 % en PBS por 48 horas. Una vez fijados, los tejidos fueron lavados en agua destilada y desmineralizados por 4 semanas en EDTA al 10%. Luego fueron deshidratados en alcoholes de grado creciente, aclarados e incluidos en parafina. Con un micrótopo se realizaron cortes histológicos seriados de 5 μ m. Los cortes fueron procesados para tinciones con Hematoxilina & Eosina (H&E) y con Giemsa (para diferenciar células inflamatorias) (Figura 4).

La tinción con H&E es la técnica histológica mas usada para análisis histopatológico de rutina. La hematoxilina, colorante catiónico o básico, y la eosina es un colorante aniónico o ácido. La mezcla de los dos tiñen los núcleos de azul, citoplasmas rosado pálido, músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

La tinción con Giemsa de uso común para el estudio morfológico de células sanguíneas en frotis y medula ósea, se uso para diferenciar las células inflamatorias presentes en la lesión, y su evolución a través del tiempo.

Se realizaron microfotografías de 3 cortes a 50 μ m de diferencia por cada grupo de observación, a magnificación (objetivo y ocular) x40, x100, x400, x1000. Con una cámara digital para microscopio Moticam 2000, con un software de procesamiento de imagen Micrometrics SE Premium para Windows XP (Arquimed Santiago Chile). ,

Sobre las microfotografías digitales a 400X y 1000X se analizaron las características morfológicas del proceso reparativo en los tres grupos. Los parámetros posibles de evaluar con cada tinción histoquímica empleada se presentan en la tabla N° 3.

La respuesta inflamatoria en los diferentes grupos de tejidos fue clasificada como:

- Grado 1: leve grado de inflamación, escaso infiltrado celular inflamatorio, tanto de polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) y linfocitos. Vasos nativos dilatados, escasa presencia de edema.
- Grado 2: grado medio de inflamación, mayor numero de células inflamatorias en el conectivo, particularmente linfocitos. Dilatación vascular, e hiperemia.
- Grado 3: alto grado de inflamación, abundante infiltrado celular, dilatación vascular, hiperemia, estasis.

Tabla N° 3
Características histológicas evaluadas usando diferentes tinciones
histoquímicas

HEMATOXILINA & EOSINA:	GIEMSA:
Tejido epitelial	
<p>Presencia de detritus celular: Restos o fragmentos que quedan del proceso de desintegración del tejido que fue lesionado.</p> <p>Estado de migración de los queratinocitos: características morfológicas de sus uniones intercelulares.</p> <p>Presencia de fibrina entre los bordes de la herida</p> <p>Capas de células epiteliales: La mucosa palatina sana es un epitelio plano pluriestratificado queratinizado, por ende el aumento en el número de estratificaciones observadas en la evolución, de la herida indicará un proceso de reparación adecuada.</p>	<p>Presencia de infiltrado inflamatorio entre los bordes epiteliales de la herida en reparación, sobre los haces de fibrina (PMNN, Macrófagos)</p> <p>Características de queratinocitos</p>
Tejido conjuntivo	
<p>Cantidad relativa de vasos sanguíneos y células: En la etapa de formación de tejido, uno de los eventos mas importantes es la Angiogénesis; mecanismo que otorga el aporte de oxígeno, nutrientes y otras moléculas adecuadas para la reparación del tejido. También hay un aumento de células generalmente de fibroblastos, de células inflamatorias y macrófagos.</p>	<p>Presencia de infiltrado inflamatorio (PMNN, Macrófagos).</p> <p>Presencia de Eritrocitos (Forman parte del coagulo inicial durante la hemostasia primaria).</p> <p>Presencia de trombocitos:</p>

VARIABLES A ANALIZAR Y ANALISIS ESTADÍSTICO

Variables Clínicas:

- Estado de reparación de la Herida: Descripción clínica del proceso de reparación en cada uno de los grupos, mediante el uso de la pauta de evaluación clínica, las características pueden describirse en forma individual, pero además la pauta entrega un valor total: “Índice de reparación”, que puede ser comparado como variable continua entre los grupos y por día.
- Diámetro de la herida: se realizó la medición clínica en mm del diámetro de la herida, variable continua que permite comparaciones intragrupos y entre los grupos por día de observación.

Variables Histológicas:

- Descripción morfológica de cortes de cada grupo en estudio y descripción de la respuesta inflamatoria en los diferentes grupos de tejidos clasificada como grado 1 (leve grado de inflamación), grado 2 (grado medio de inflamación) y grado 3 (alto grado de inflamación).

Los datos fueron tabulados en Excel y se realizó un análisis estadístico descriptivo mediante tablas, gráficos y porcentajes.

Las variables continuas fueron analizadas en su distribución usando el Test Shapiro Wilk ($p > 0,05$). Se calcularon las medias y la desviación estándar. Para evaluar las diferencias intragrupos se realizó un t de Student para muestras pareadas comparando cada día respecto al inicial y para la comparación entre los tres grupos se realizó un test ANOVA y Bonferroni para diferenciar los grupos cuando existían diferencias estadísticamente significativas.

Las diferencias se consideraron como significativas, cuando $p < 0.05$. Todas las pruebas estadísticas se realizaron usando el software STATA 9 (Escuela de Salud Pública. U. de Chile).



Figura N° 3

Protocolo quirúrgico utilizado en el tratamiento de los animales. Determinación del peso inicial de cada rata **(A)**. Dosificación del anestésico según peso **(B)**. Infiltración anestésica intraperitoneal **(C)**. Generación de una úlcera mediante un bisturí Punch **(D)**. Eliminación del pedículo mucoso recidivante **(E)**. Visualización de la úlcera de espesor total **(F)**. Hemostasia con compresa **(G)**. Herida sin hemorragia evidente **(H)**. Medición del diámetro **(I)**. Preparado Matico/Llantén en plastibase, Colocación **(J-L)**.

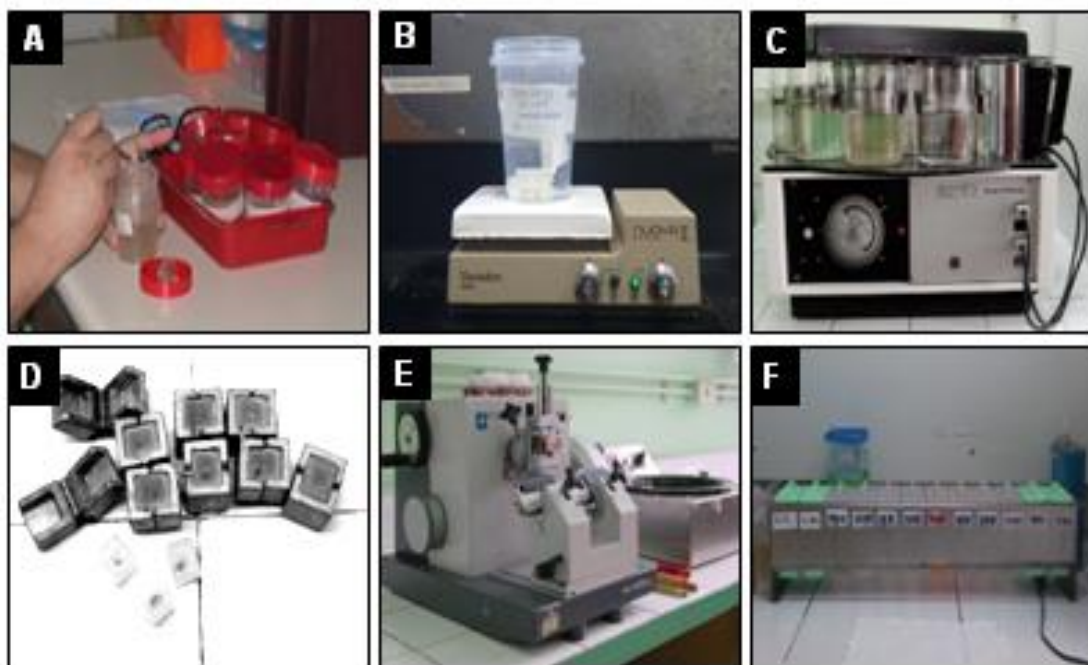


Figura N° 4

Resumen fotográfico del procesamiento histológico de las muestras. Fijación de las muestras **(A)**. Desmineralizaron de las muestras **(B)**. Inclusión de las muestras en el procesador de tejidos **(C)**. Inclusión en parafina (taco) **(D)**. Cortes de los tacos en micrótopo **(E)**. Batería de tinciones **(F)**.

RESULTADOS

EVALUACION CLINICA DEL PROCESO REPARATIVO DE LOS TRES GRUPOS EN ESTUDIO

La comparación del proceso reparativo de las úlceras palatinas entre los grupos de ratas Sprague Dawley en estudio, se llevó a cabo de acuerdo a la encuesta de evaluación clínica de úlceras orales según características propias de una reparación de este tipo de lesiones. A cada característica se le asignó un valor numérico (encuesta de evaluación clínica, ver tabla N°2).

En la tabla N°4 se muestra la comparación, entre los tres grupos en estudio, de los resultados promedio para cada característica clínica evaluada, durante los 7 días de observación del proceso reparativo; y en la tabla N°5 se muestra la comparación del “índice de reparación total”, calculado según el valor total de la encuesta de parámetros clínicos en cada grupo.

En la figura N°5 se presentan las características clínicas comparadas entre los tres grupos de observación en los días 2, 5 y 7 del proceso reparativo. A continuación se describen estas características entre los tres grupos en estudio.

Color de la herida. A partir del día 3 fue posible observar clínicamente sólo en el grupo que recibió el preparado herbal, una herida de color rosado o color normal. En los animales del grupo tratado sólo con plastibase, este cambio sucedió a partir del día 5. Asimismo, el color de la herida de los animales del grupo sin tratamiento, se normalizó entre los días 4 y 5, pero este color rosado se tornó gris amarillento entre los días 6 y 7.

Tipo de exudado. A partir del día 2, la herida de los animales del grupo tratado con extracto herbal, no mostró exudado de ningún tipo. En el grupo tratado con plastibase solo, este cambio ocurrió a partir del día 3, y en el grupo sin tratamiento, a partir del día 4. Cabe destacar que en el grupo sin

tratamiento el estado de las heridas fue bastante irregular en el grupo y en algunas se observó nuevamente presencia de exudado al día 7. En los otros en cambio la reparación presentó aspecto homogéneo en todos los animales.

Bordes de la herida. Hasta el día 4, las heridas presentaron características similares, es decir, los días 2 y 3 las heridas se sollevataron y por el día 4 sus bordes se visualizaron planos. Esta característica se mantuvo hasta el día 7 en los animales del grupo tratado con el extracto herbal; sin embargo, desde el día 4 en adelante, los animales de los dos grupos controles presentaron muchas variaciones. Así por ejemplo, los bordes de la herida se sollevataron nuevamente al día 6 para los animales del control plastibase solo y al día 5 para los del grupo sin tratamiento.

Color de los bordes. Desde el día 2 los animales de los grupos tratados con extracto herbal y con plastibase solo, mostraron un color rosado de los bordes de la herida (equivalente a mucosa normal). En el grupo sin tratamiento en cambio, esta variación se observó a partir del día 4 de observación.

Presencia de fibrina. La herida de los animales de los grupos tratados con extracto herbal y con plastibase solo, mostró la presencia de fibrina sólo el día 2 de tratamiento. En cambio, en el del grupo sin tratamiento la presencia de fibrina se observó desde el día 3 persistiendo aún el día 5 de observación.

Fondo de la herida. Los animales del grupo tratado con extracto herbal, mostraron su herida plana los días 6 y 7; sin embargo, la herida de los animales de ambos grupos controles se visualizó con fondo socavado durante los 7 días de observación.

Tejidos vecinos. El tejido vecino a la herida en el grupo tratado con extracto herbal cambió su aspecto de eritematoso a normal a partir del día 3 del periodo de tratamiento. En el grupo tratado con plastibase solo este cambio ocurrió a partir del día 4, y en el sin tratamiento, a partir del día 5 de observación.

En la tabla N°5 se muestra la comparación de la variación de los parámetros clínicos de la reparación total entre los grupos. Con test Shapiro Wilk se estableció que la variable “Índice de Reparación Total” presentaba una distribución normal (ejemplo: día 2, $p=0,484$; día 7 $p=0,999$ en grupo con plastibase y extracto herbal), por lo que se realizó t-Test de muestras pareadas para establecer la significancia de las diferencias del estado observado, respecto al estado final en cada uno de los grupos en estudio (Análisis Intra-grupos).

En el grupo de ratas tratadas con plastibase y extracto herbal, se presentaron diferencias significativas en las características clínicas solo entre el primer y el segundo día de observación respecto al día 7, al igual que en el grupo tratado sólo con plastibase, es decir ya desde el día 2 se observó un índice reparativo total elevado. Sin embargo en el grupo sin tratamiento las diferencias significativas persistieron hasta el tercer y cuarto día.

El análisis comparativo del “Índice de Reparación” entre los 3 grupos de estudio por cada día, se realizó con el Test de comparaciones múltiples ANOVA, mostrando diferencias significativas a partir del tercer día, entre los tratados con plastibase con y sin el extracto herbal respecto al sin tratamiento (ANOVA, Bonferroni $p=0,0001$ y $p=0,023$ respectivamente).

El “Índice de Reparación” observado en los tratados con extracto herbal según la pauta, mostro un valor mas alto ($14,5 \pm 1,9$) que el tratado con plastibase solo ($13,0 \pm 1,2$), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Estas diferencias entre los grupos de tratamiento, respecto al estado de reparación total o índice de reparación, se mantuvieron hasta el día 6, donde las diferencias ya no fueron significativas entre los grupos.

El gráfico de la variación de la reparación total para cada grupo durante todos los días de estudio se muestra en la figura N°6.

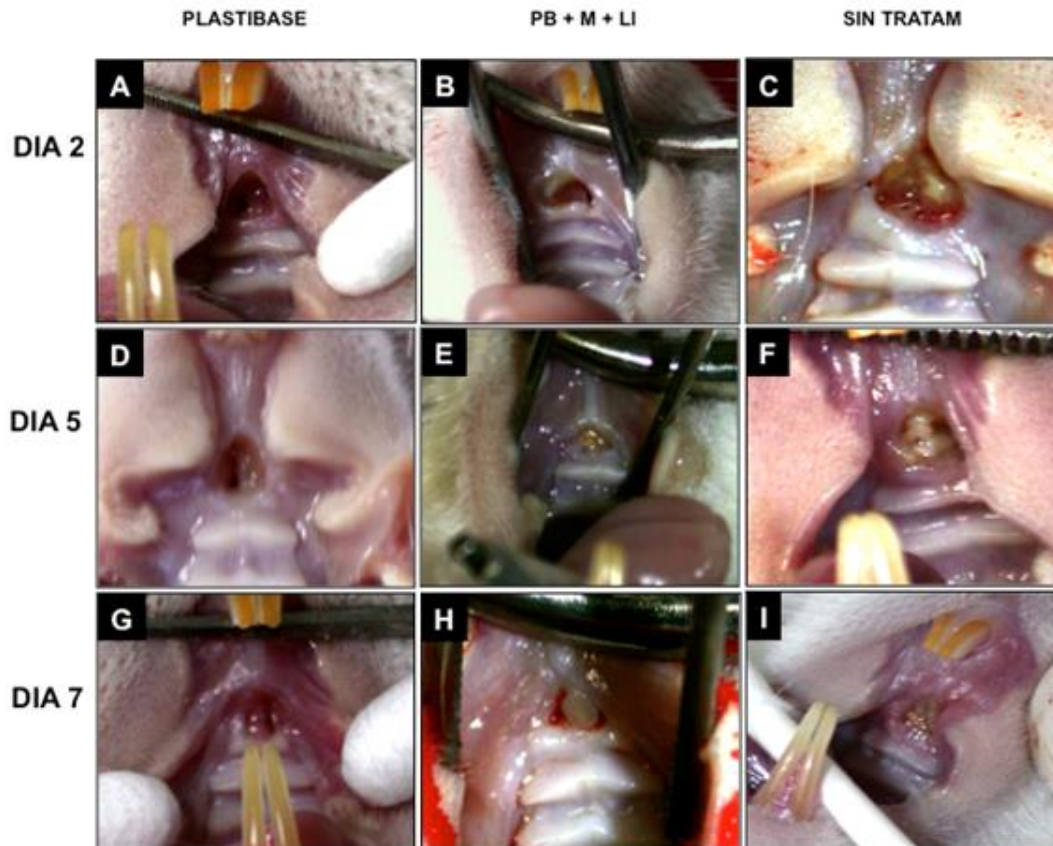


Figura N° 5

Fotos clínicas de la variación de la reparación de la úlcera, los días 2, 5 y 7 en los tres grupos de ratas. Úlcera palatina donde destaca el exudado seroso abundante (A). Úlcera palatina con baja presencia de exudado (B). Úlcera palatina con abundante exudado seroso y hemorrágico (C). Herida palatina con fondo socavado (D). Herida palatina con presencia de abundante fibrina (E). Herida palatina con presencia de fibrina y exudado seroso (F). Herida con fondo socavado y exudado seroso (G). Herida con presencia de botón mucoso (H). Herida con presencia de fibrina y sin exudado (I).

Tabla N°4
Comparación de valores promedio de características clínicas de
reparación en los tres grupos de ratas

CARACTERISTICAS CLINICAS	GRUPOS	Dias						
		Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia	Dia
		1	2	3	4	5	6	7
COLOR 1: rojo 2: amarillo/gris 3: rosado	Experimental	1	2	3	3	3	3	3
	Control 1	1	2	2	2	3	3	2
	Control 2	1	2	2	3	3	2	2
EXUDADO 1: sangrante 2: seroso 3: sin exudado	Experimental	1	3	3	3	3	3	3
	Control 1	1	2	3	3	3	3	3
	Control 2	1	2	2	3	3	3	2
BORDES 1: sollevantados 2: plano	Experimental	2	1	1	2	2	2	2
	Control 1	2	1	1	2	2	1	2
	Control 2	2	1	1	2	1	2	2
COLOR BORDES 1: rojos 2: rosados	Experimental	1	2	2	2	2	2	2
	Control 1	1	2	2	2	2	2	2
	Control 2	1	1	1	2	2	2	2
PRESENCIA FIBRINA 1: si 2: no	Experimental	2	1	2	2	2	2	2
	Control 1	2	1	2	2	2	2	2
	Control 2	2	2	1	1	1	2	2
FONDO 1: socavado 2: plano	Experimental	1	1	1	1	1	2	2
	Control 1	1	1	1	1	1	1	1
	Control 2	1	1	1	1	1	1	1
TEJIDO VECINO 1: isquémico 2: eritematoso 3: normal	Experimental	2	2	3	3	3	3	3
	Control 1	2	3	2	3	3	3	3
	Control 2	2	2	2	2	3	3	3

Tabla N°5
Variación diaria del Índice de reparación establecido según pauta
Clínica, de lesión palatina en ratas con diferentes tratamientos

DIA DE OBSERVACION	PLASTIBASE CON EXTRACTO HERBAL			SOLO PLASTIBASE			SIN TRATAMIENTO		
	Media y DS	Min	Max	Media y DS	Min	Max	Media y DS	Min	Max
1	11,0 ± 0,0	11	11	11,0 ± 0,0	11	11	11,0 ± 0,0	11	11
2	12,6 ± 1,9	10	15	13,1 ± 2,0	10	16	12,3 ± 1,3	10	15
3	14,5 ± 1,9	11	17	13,0 ± 1,2	12	15	10,9 ± 1,1	10	13
4	15,3 ± 1,9	11	17	15,3 ± 1,0	14	16	14,7 ± 0,8	14	16
5	15,8 ± 1,0	14	17	15,9 ± 1,1	14	17	13,7 ± 2,3	9	15
6	16,0 ± 4,6	16	16	15,3 ± 1,0	14	16	15,7 ± 1,2	15	17
7	16,5 ± 0,6	16	17	16,0 ± 1,4	14	17	16,0 ± 1,0	15	17

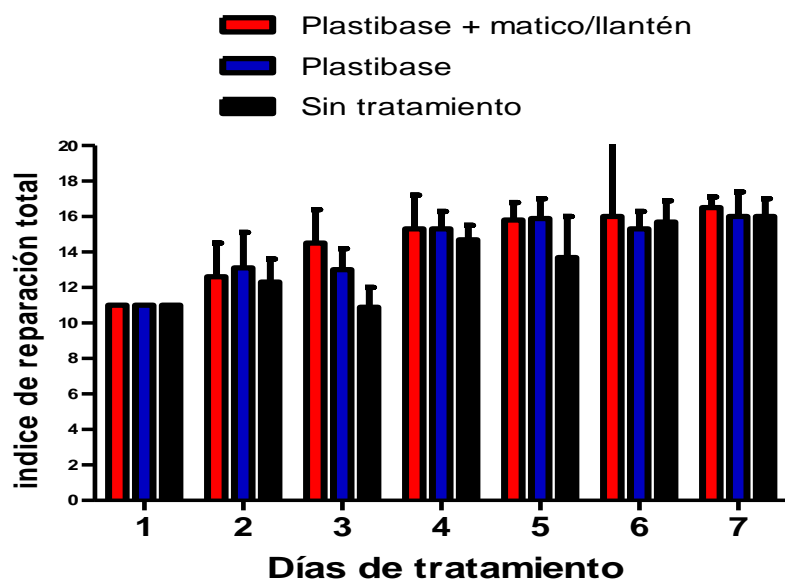


Figura N° 6

Comparación diaria de los tres grupos de estudio según la variación del estado de reparación total establecido según pauta de evaluación clínica

Variación del diámetro de la herida en los grupos en estudio (Contracción de la Herida)

La tabla N° 6 muestra la comparación en la reducción del diámetro de la úlcera entre los tres grupos, en ella se puede observar que ya desde el segundo día, el grupo tratado con el extracto herbal presentó una reducción de 0,4 mm respecto al primer día y una diferencia de 0,7 mm respecto al diámetro de la herida observado el día 2 en el control 1 y 0,2 mm respecto a lo observado en el control 2. Esta contracción de la herida en el grupo tratado con el extracto herbal presentó una tendencia homogénea en el tiempo, a diferencia de los dos controles, donde se mostraron diferencias individuales importantes.

Al comparar la reducción del diámetro de la úlcera entre el día 1 y el día 7 de observación entre los tres grupos, el grupo tratado con el preparado herbal mostró una contracción del 50% del diámetro de la herida, en cambio en el grupo tratado con plastibase solo se observó una reducción del 22% y del 21% en el sin tratamiento (tabla N° 7). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los controles, pero ambos fueron diferentes respecto al grupo experimental (t test $p < 0,05$).

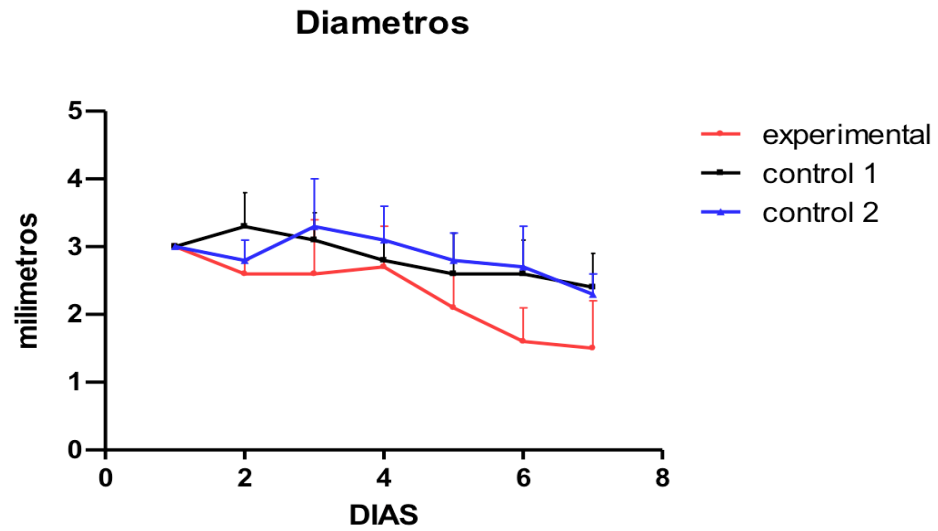
Tabla N° 6
Variación diaria de la reducción del diámetro de la lesión palatina en
ratas según los diferentes tratamientos

DIA DE OBSERVACIÓN	PLASTIBASE CON EXTRACTO HERBAL			SOLO PLASTIBASE			SIN TRATAMIENTO		
	Media y DS	Min	Max	Media y DS	Min	Max	Media y DS	Min	Max
1	3,0 ± 0,0	3	3	3,0 ± 0,0	3	3	3,0 ± 0,0	3	3
2	2,6 ± 0,2	2,5	3	3,3 ± 0,5	2,5	4	2,8 ± 0,3	2,5	3
3	2,6 ± 0,5	2	4,5	3,1 ± 0,6	3	4	3,3 ± 0,2	2,5	4
4	2,7 ± 0,6	2	4	2,8 ± 0,3	2,5	3	3,1 ± 0,5	2,5	4
5	2,1 ± 0,5	1,5	3	2,6 ± 0,6	1,5	3	2,8 ± 0,4	2	3
6	1,6 ± 0,4	1,5	2	2,4 ± 0,4	2	3	2,7 ± 0,4	2	3
7	1,5 ± 0,7	0,5	2	2,4 ± 0,5	2	3	2,3 ± 0,3	2	2,5

Tabla N° 7
Variación del diámetro inicial y final y los porcentajes de variación
respecto a la herida inicial y su significancia estadística para cada grupo

GRUPOS	Diámetro Prom. inicial en mm	Diámetro Prom. final en mm	Diferencia en mm	% de reducción después de 7 días	Intragrupo (t Test m pareadas)	Inter grupos (t-test m. no pareadas)
Exp (n=12)	3,0	1,5	1,5	50	0,01	(EXP/C1)0,04
C1 (n=12)	3,0	2,4	0,6	21	0,04	(EXP/C2)0,04
C2 (n=12)	3,0	2,3	0,7	22	0,03	(C1/C2) 0,45

Exp: Plastibase con extracto herbal. **C1:** Plastibase solo. **C2:** Sin tratamiento



Experimental: Plastibase + Matico/Llantén. Control 1: Plastibase. Control 2: Sin tratamiento

Figura N° 7

Variación del diámetro de la úlcera en los 3 grupos de estudio durante el tratamiento.

CARACTERÍSTICAS HISTOMORFOLÓGICAS DEL PROCESO REPARATIVO DE MUCOSA PALATINA DE RATA

Descripción histológica del proceso reparativo de herida palatina tratada con Plastibase y Extracto Herbal (Experimental).

Al día 2 no se observó tejido necrótico en la zona lesionada. A nivel de los bordes epiteliales truncados, los queratinocitos, particularmente de la capa basal, presentaron un aspecto alargado como avanzando entre la malla de fibrina interpuesta de aspecto hialino (Figura 14: tejido fibrilar reparativo), fibrilar con abundante infiltrado inflamatorio, particularmente polimorfos nucleares (infiltrado agudo), algunos linfocitos y abundantes fibroblastos. Debajo del epitelio, en el conjuntivo, se observaron vasos sanguíneos antiguos pletóricos de sangre. No se observaron mastocitos en las cercanías de los vasos sanguíneos.

Al día 5 se visualizó el avance del epitelio en la zona del margen de la herida, se observaron varios estratos, pero no se apreciaron mayores diferencias en el sitio de migración respecto al día 2. En el conjuntivo en cambio se observó menos infiltrado inflamatorio, aunque se describen células tipo linfocitos localizados entre los restos de fibrina y mayor número de células compatibles con fibroblastos y miofibroblastos, menor cantidad de zonas hialinas, y abundantes vasos sanguíneos de pequeño calibre entre restos de fibrina. Se observaron también fascículos de fibras colágenas y algunos histiocitos.

Al día 7 se observó el avance del epitelio, la malla de fibrina no se visualizó en ninguno de los cortes. El conectivo presentó abundantes fascículos de fibras colágenas más gruesas entremezcladas con fibras finas tipo malla reticular, con abundantes células tipo fibroblastos. Se apreciaron múltiples vasos sanguíneos de pequeño calibre tipo vasos de neoformación, aún algunos histiocitos y se distinguieron algunos mastocitos cercanos a los

vasos sanguíneos de mayor calibre. Aún se observó infiltrado inflamatorio pero muy localizado.

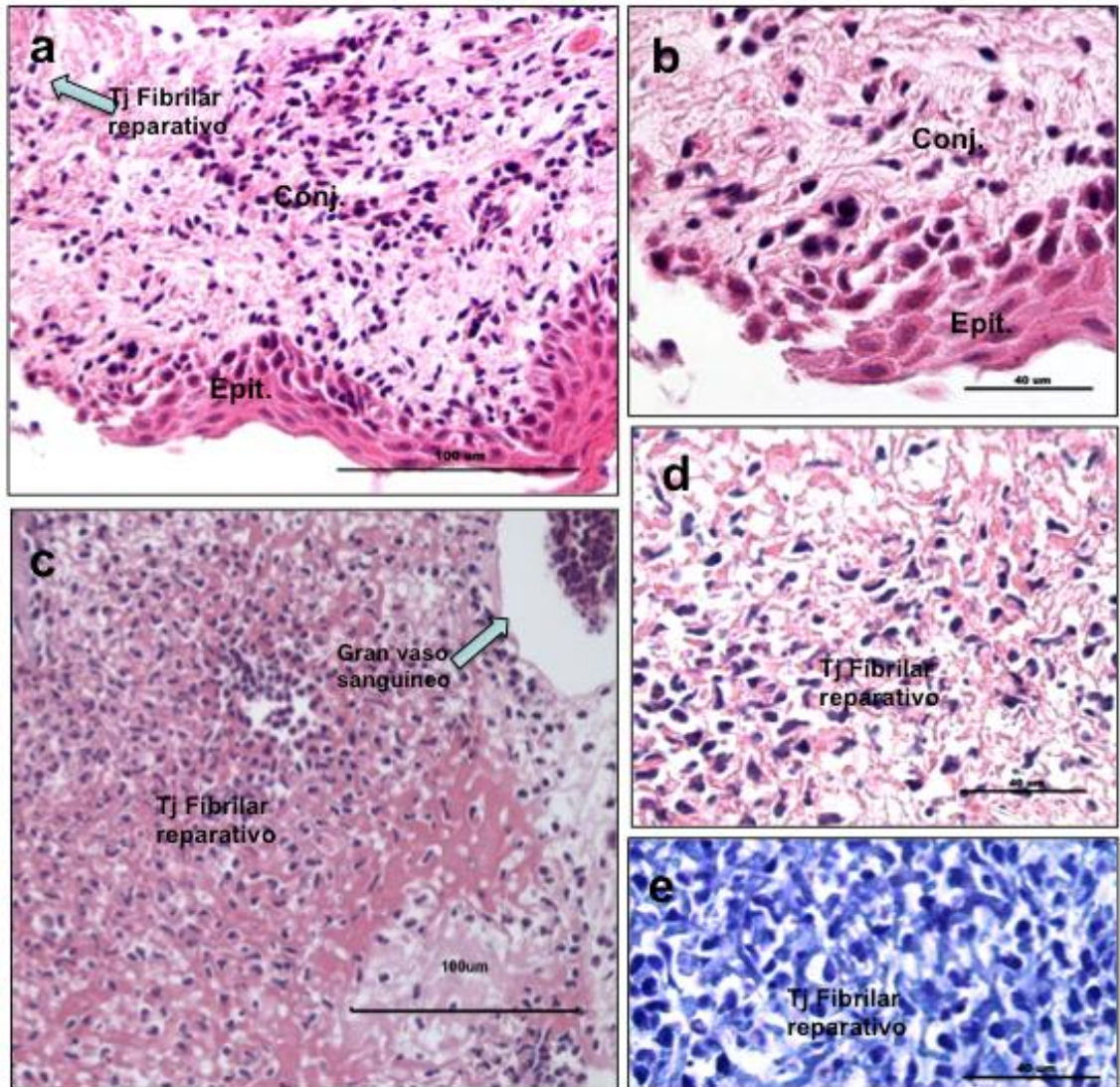


Figura N°14

Grupo tratado con Preparado Herbal. Día 2.

(a) y (c) x 400. (b), (d) y (e) x 1000. a-d H&E, e Giemsa.

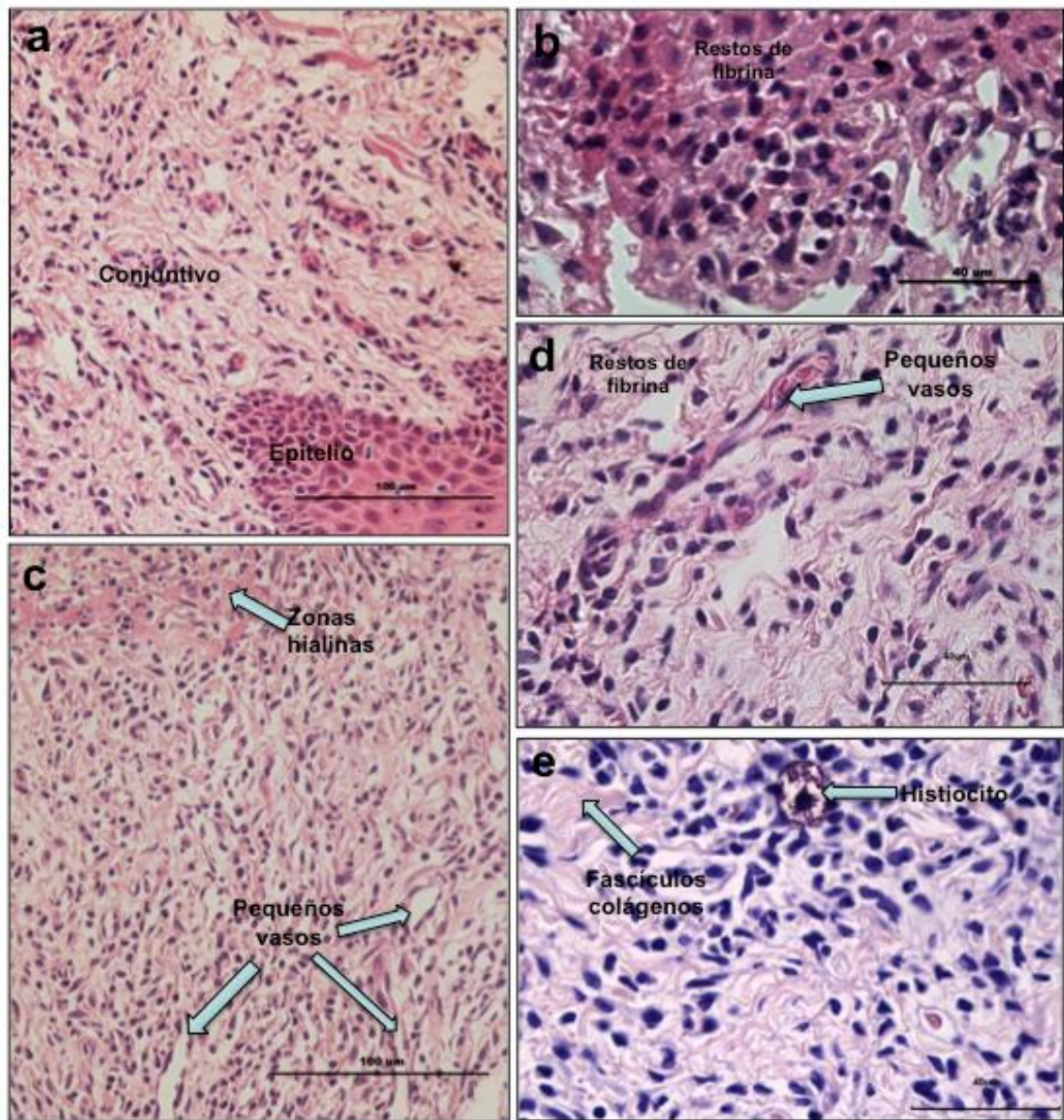


Figura N° 15

Grupo tratado con Preparado Herbal. Día 5

(a) y (c) x 400. (b), (d) y (e) x 1000. a-d H&E, e Giemsa.

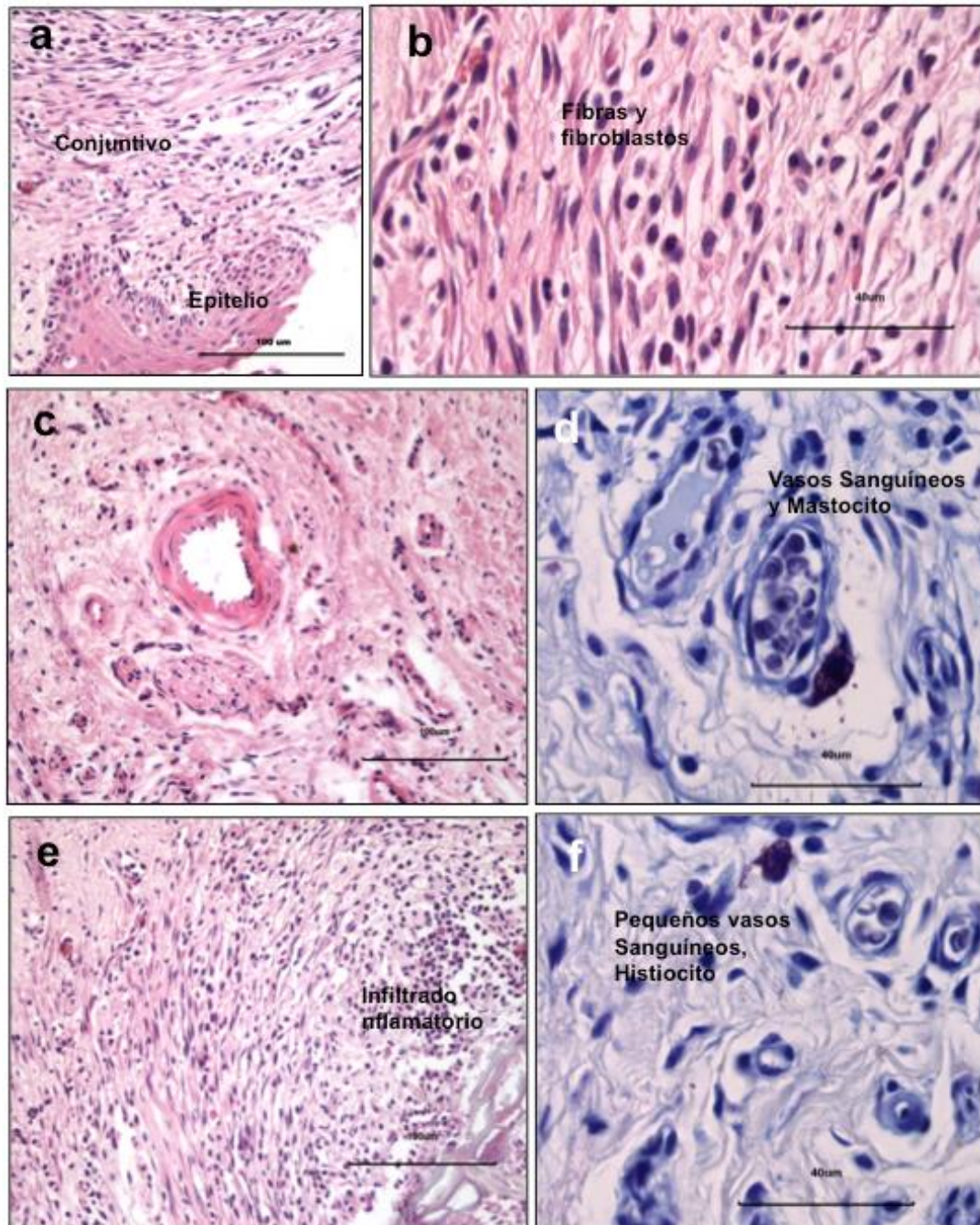


Figura N° 16

Grupo tratado con Preparado Herbal. Día 7

(a), (c) y (e) x 400. (b), (d) y (f) x 1000. a, b,c, e H&E, d y f: Giemsa

Descripción histológica del proceso reparativo de herida palatina tratada con Plastibase solo (Control 1).

Al día 2 se observó la pérdida de tejido en la zona afectada con los bordes truncados en el epitelio, particularmente la capa basal presentó células alargadas y algunos estratos medios se observaron los desmosomas entre los queratinocitos. En la zona de pérdida de tejido se observó claramente una malla fibrina, recubriendo toda la zona por donde el epitelio está cambiando su aspecto. Bajo esta malla el conectivo subyacente mostró variable cantidad de zonas hialinas eosinófilas e infiltrado inflamatorio particularmente polimorfos nucleares (infiltrado agudo). En la parte más profunda del conectivo se apreciaron gran cantidad de Mastocitos en relación a los vasos sanguíneos.

Al día 5, el epitelio avanza en su proliferación, particularmente las células basales parecen perder su adhesión con las células vecinas para desplazarse. Los restos de fibrina aún presentes se observaron invadidos por células compatibles con fibroblastos, múltiples células inflamatorias de tipo PMNN, y varias células tipo linfocitos dispersos en una matriz con abundantes y amplias zonas hialinas. Debajo de este conglomerado celular, se apreció un notable número de células adiposas. Alrededor de los vasos se distinguen abundantes histiocitos en lugar de mastocitos. Los vasos de gran calibre se aprecian dilatados e hiperémicos.

Al día 7, en el conectivo, se siguen observando una serie de zonas hialinas que son muy compatibles con áreas de fibras colágenas en degeneración y renovación de la malla fibrilar. La concentración celular aumentó notablemente, particularmente con células de tipo fibroblastos, el infiltrado inflamatorio persiste, y se aprecia escasa proliferación vascular. Se observan células inflamatorias localizadas.

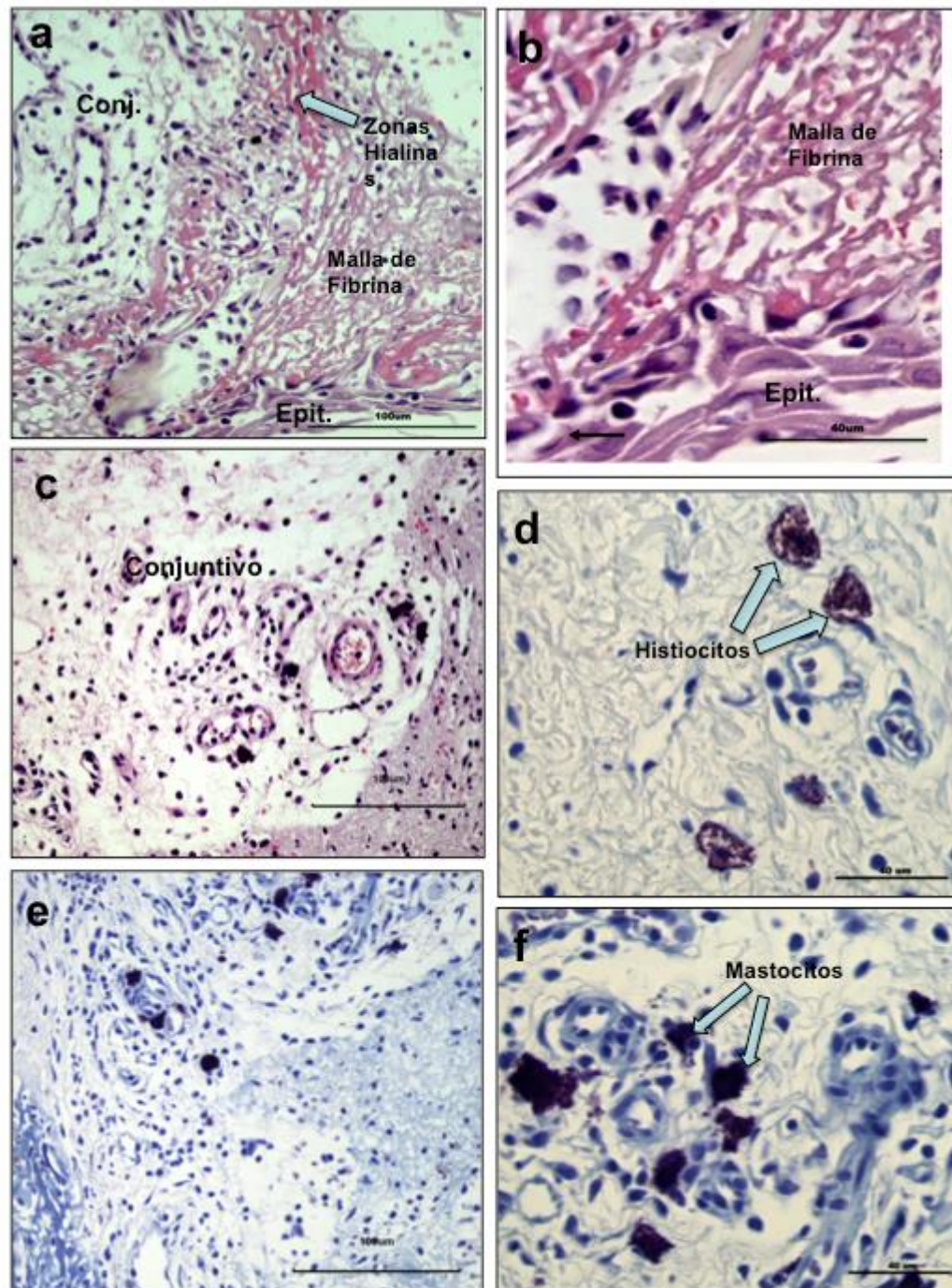


Figura N° 8

Grupo tratado solo con Plastibase. Día 2

(a), (c) y (e) x 400. (b), (d) y (f) x 1000. a-c H&E, d-f Giemsa.

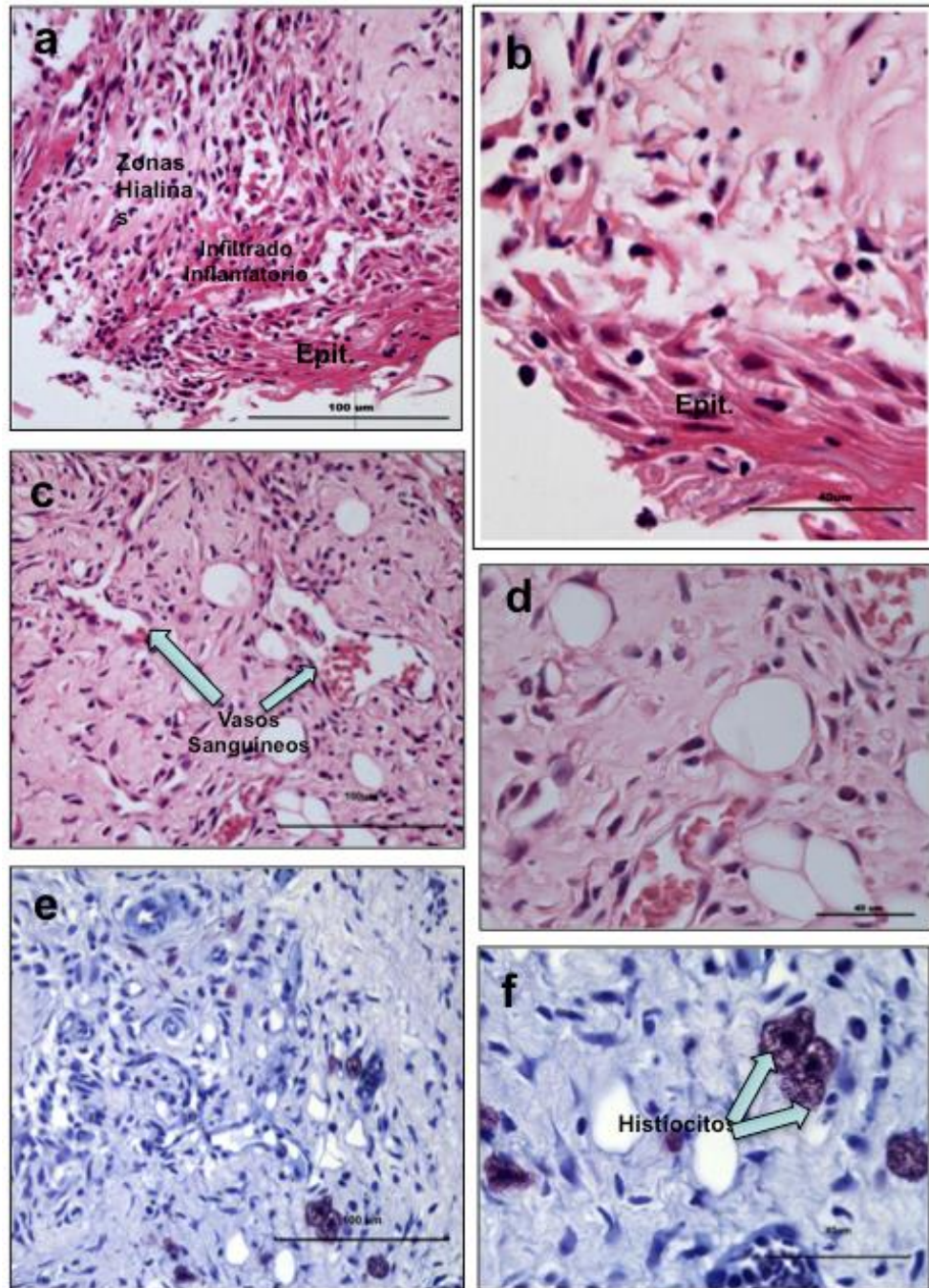


Figura N° 9

Grupo tratado solo con Plastibase. Día 5.

(a), (c) y (e) x 400. (b), (d) y (f) x 1000. a-d H&E, e-f Giemsa.

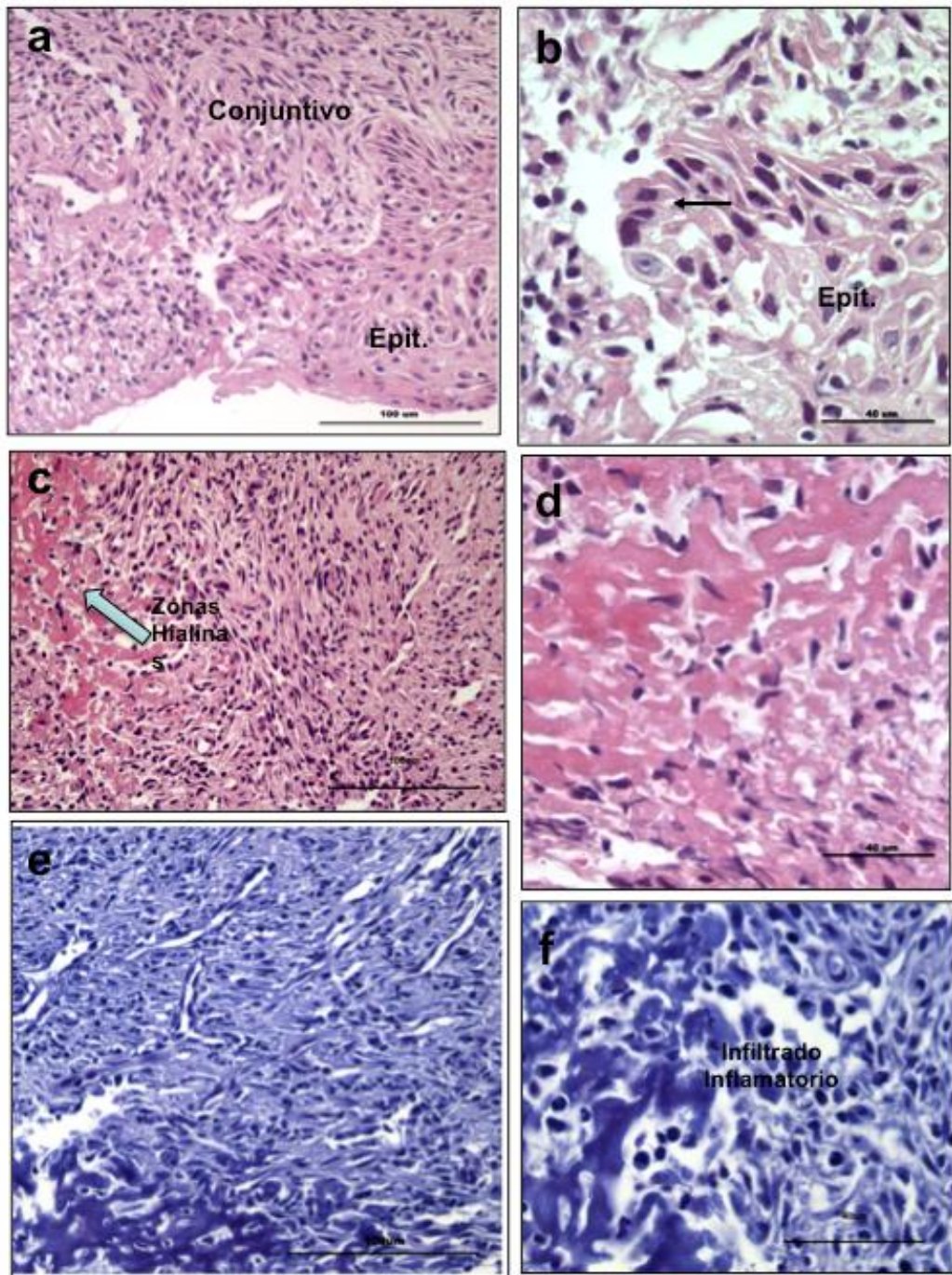


Figura N° 10

Grupo tratado solo con Plastibase. Día 7.

(a), (c) y (e) x 400. (b), (d) y (f) x 1000. a-d H&E, e-f Giemsa

Descripción histológica del proceso reparativo de herida palatina sin tratamiento (Control 2).

Al día 2 se observó el tejido muy afectado, un epitelio con núcleos picnóticos y un conectivo con aspecto infartado, con un débil infiltrado inflamatorio particularmente formado por linfocitos.

Al día 5, aún se observó una abundante malla de fibrina con zonas eosinófilas. El epitelio aún se presentaba fino con núcleos picnóticos, pero el conectivo presentaba abundante infiltrado inflamatorio y múltiples histiocitos y mastocitos

A los 7 días el epitelio avanzaba lentamente en un tejido con abundante infiltrado inflamatorio y múltiples histiocitos.

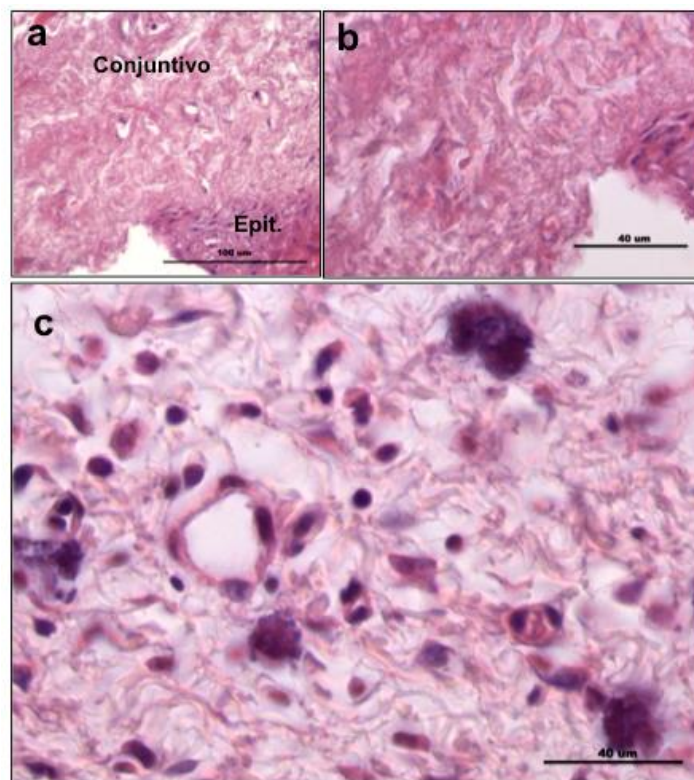


Figura N° 11

Grupo sin tratamiento. Día 2.

(a) x 400. **(b)** y **(c)** x 1000. **a** y **b** H&E, **c** H&E.

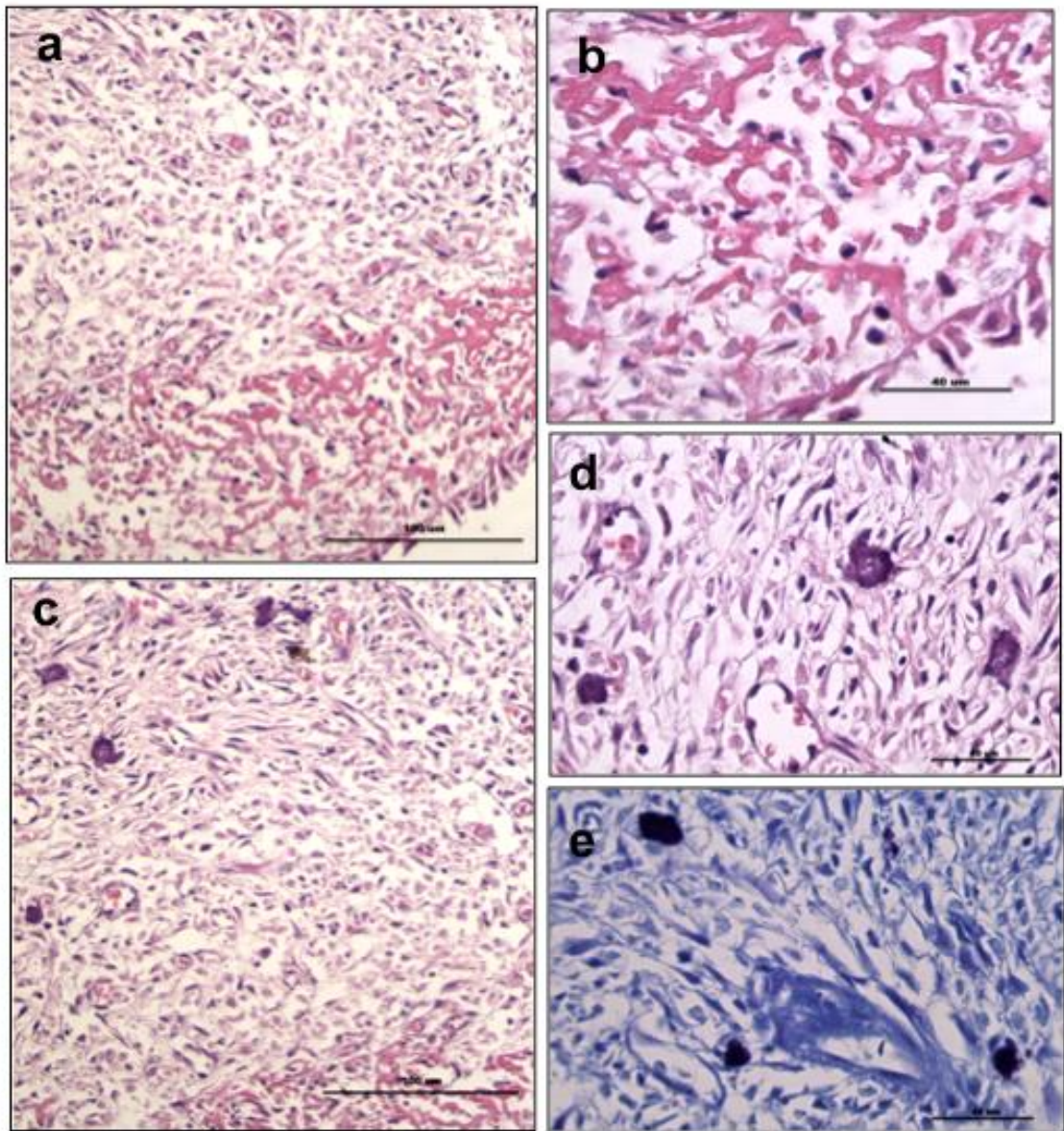


Figura N° 12

Grupo sin tratamiento. Día 5.

(a) y (c) x 400. (b), (d), (e) x 1000. a-d H&E, e Giemsa.

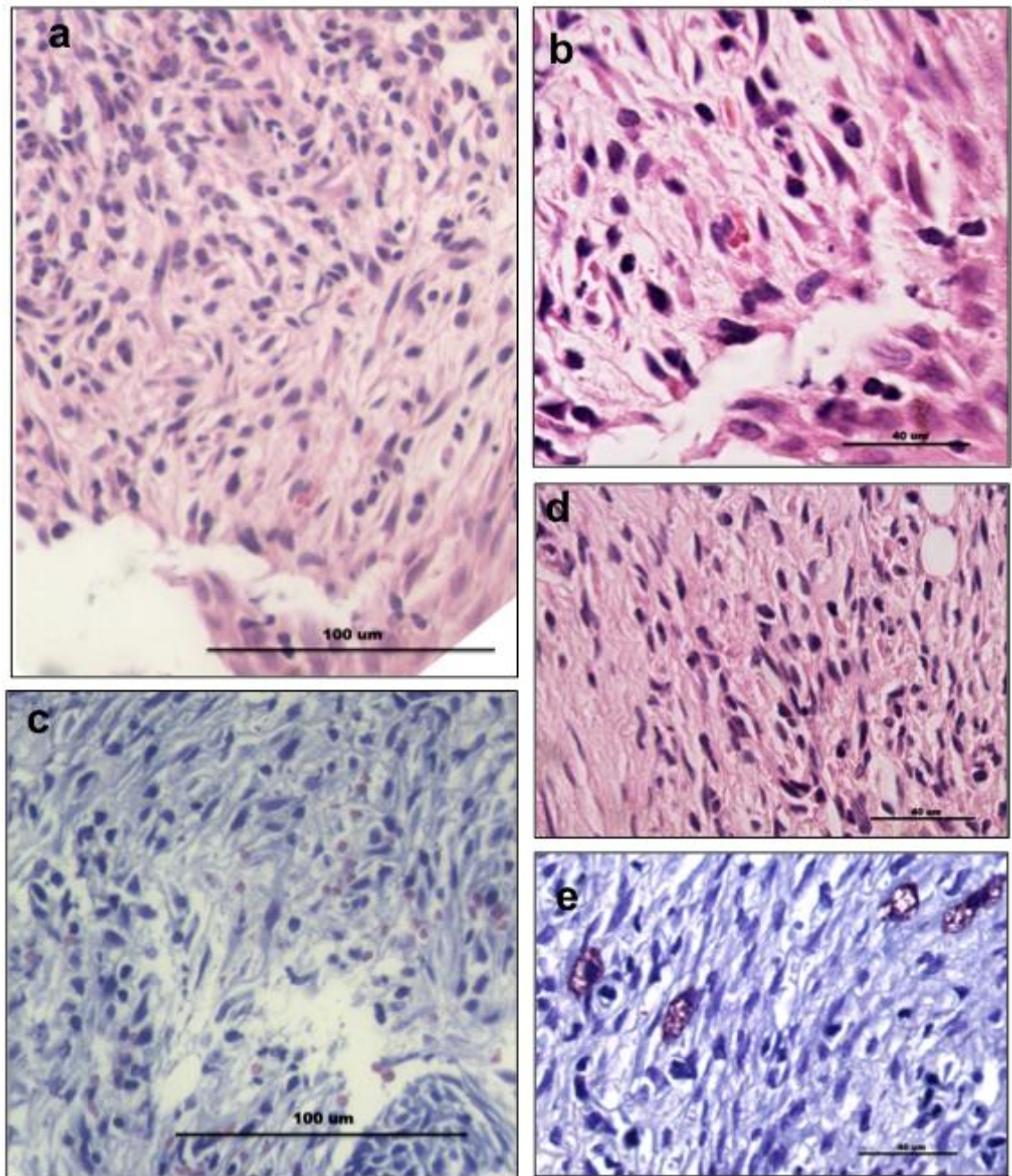


Figura N° 13

Grupo sin tratamiento. Día 7.

(a), (c) x 400. (b), (d), (e) x 1000. a y d H&E, c y e Giemsa

Descripción histológica del proceso inflamatorio relativo en los tres Grupos en estudio.

La tabla N°8 resume el aspecto cualitativo de la inflamación, basados en las características histológicas, en los tres grupos en estudio, en los diferentes tiempos de observación. El proceso inflamatorio se observó muy intenso, de alto grado al día dos en el grupo tratado con el preparado herbal, en cambio esta reacción no se observó aún tan marcada dos días después de la lesión en los grupos controles. En las observaciones del día 5 las características inflamatorias se invierten y en los controles y el proceso inflamatorio aparece a toda orquesta en cambio se observó una reducción en los tratados con extracto herbal. En el día 7, el grupo control sin tratamiento aún presentó un grado de inflamación importante, observándose una reducción en el tratado con plastibase y una inflamación muy leve en el tratado con plastibase y preparado herbal.

Tabla N° 8
Grado de inflamación a los 2, 5 y 7 días, basados en diferencias histológicas entre los tres grupos de estudio.

GRUPO	GRADO DE INFLAMACION	ANALISIS HISTOLOGICO
Plastibase con preparado Herbal	Grado 3	Después de 2 días
Plastibase solo	Grado 2	
Sin Tratamiento	Grado 1	
Plastibase con preparado Herbal	Grado 2	Después de 5 días
Plastibase solo	Grado 3	
Sin Tratamiento	Grado 3	
Plastibase con preparado Herbal	Grado 1	Después de 7 días
Plastibase solo	Grado 2	
Sin Tratamiento	Grado 3	

DISCUSION

La reparación de tejidos y la cicatrización de heridas son procesos complejos que cursan con inflamación, fibroplasia, neovascularización, contracción de la herida y el recubrimiento del defecto con epitelio (epitelización). Los procesos de reparación (regeneración y cicatrización), son esenciales para evitar la invasión de los tejidos dañados por agentes patógenos y para reformar el tejido dañado parcial o totalmente. Esta compleja cascada de eventos se inicia desde el momento de la lesión y puede continuar durante períodos variables, dependiendo de la extensión de la herida (1).

El proceso generalmente es dividido en tres fases: **fase inflamatoria** (establecimiento de la homeostasis y la inflamación); **fase proliferativa** (consiste en la granulación, contracción y epitelización) y, finalmente, la **fase de remodelación** que determina, en última instancia, la fuerza y la apariencia del tejido reparado (1). La participación de cada fase varía dependiendo en gran medida de factores tales como el tipo, la ubicación y el ambiente donde se produce la herida, pero pueden eventualmente ser manipuladas utilizando ciertas medicaciones. Okabe y Amagase (63) informaron que tres días postquirúrgicos, es cuando la etapa inflamatoria alcanza su mayor actividad, condición según estos autores necesaria en la reparación normal, y posterior depósito de matriz.

Las úlceras bucales, son lesiones elementales de alta prevalencia (5), con intenso dolor como manifestación principal y suelen comportarse como heridas crónicas, es decir, que pueden requerir de un largo tiempo para su cura (6). Se ha descrito que el proceso de reparación de injurias en la mucosa oral es de menor duración que en otros tejidos, pero la ubicación de la lesión y la presencia de alta concentración bacteriana pueden retrasar el proceso,

generando intenso dolor, incapacidad funcional, y sobreinfecciones, entre otros.

El tratamiento clínico de las úlceras orales estará determinado por su etiología y en el caso de las úlceras por decúbito, no existe un consenso acerca de un protocolo de manejo terapéutico definido. Un agente terapéutico seleccionado para el tratamiento de heridas idealmente debería mejorar una o más fases de la reparación sin generar daño ni efectos secundarios.

Estudios previos *in vitro* habían demostrado que el extracto de la planta medicinal *matico* poseía actividad antibacteriana (33), anti-inflamatoria (34) y efectos estimulantes de la proliferación de fibroblastos (35); también en su administración oral y tópica había mostrado propiedades analgésicas y anti-inflamatorias. y varios autores (10, 37, 36, 38, 39) habían coincidido en las cualidades reparativas que posee el matico sobre la piel y mucosas, sugiriendo el empleo de todas las formas de matico para la curación de heridas, particularmente las úlceras por trastornos digestivos (41, 42, 64).

Otra hierba muy usada con fines medicinales en Chile es el *llanten* del cual también han sido demostradas sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, hepatoprotectoras, astringentes y antihemorrágicas, todo contribuyendo al proceso reparativo de las heridas (44); pero además es usada en la detención de la diarrea, disentería y amebiasis, por sus propiedades astringentes y hepatoprotectoras. Se ha visto que es capaz de reducir en 82% a 95% la acidez de la secreción gástrica (43). Y también es usada para reducir la tos, la faringitis, la laringitis, la bronquitis, la tuberculosis. Empleándolo como infusión o ungüento (47).

Dadas las propiedades benéficas demostradas de ambas plantas medicinales por separado, en esta investigación se buscó analizar el efecto clínico e histopatológico, de un preparado herbal conteniendo ambos extractos matico y llantén, en un modelo experimental de reparación de una úlcera oral palatina en ratas. En estudios que involucran la mucosa oral, las ratas son

frecuentemente usadas porque presentan algunas ventajas en relación a otros animales, tales como bajo costo, la fácil manipulación y el mantenimiento del medio ambiente en condiciones sanitarias controladas, en un bioterio (65). Otra ventaja es la similitud entre la mucosa oral de ratas y seres humanos; ambos poseen, en el paladar, una mucosa masticatoria con un epitelio estratificado plano paraqueratinizado, con una lamina propia y una cantidad variable de submucosa que modulan y mantienen las actividades reparativas (61). En este trabajo, las heridas de todos los animales en experimentación fueron estandarizadas y estuvieron ausentes de manifestaciones clínicas de infección, debido principalmente al ambiente y procedimientos asépticos, por medio de los cuales se llevaron a cabo los procedimientos. Se eligió un periodo de observación de 7 días dado que en nuestras condiciones experimentales se observaron diferencias en las características clínicas del proceso reparativo espontaneo coincidiendo con lo descrito por Marcondes (61), quien observó el cierre total de una herida palatina después de 14 días de observación. Las observaciones se realizaron diariamente y las curaciones se realizaron dos veces al día.

Las ratas tratadas con el extracto herbal de matico y llantén mostraron un proceso reparativo significativamente mas rápido que los grupos controles en el periodo de 7 días de observación.

Clínicamente las características de la superficie ulcerada en el grupo tratado con el extracto herbal fueron significativamente mejores que en los controles ya desde el tercer día de observación, con la aparición más temprana de fibrina, reducción del aspecto edematoso y eritematoso y con menor presencia de exudado, en relación a lo observado con los grupos controles. Incluso la herida presentó una mayor reducción del diámetro ya desde el segundo día de observación. Esto implica que la fase inflamatoria en los tejidos de la herida tratados con el preparado herbal estaba en una etapa de remisión ya al tercer día de observación. Esto coincide con lo observado

histológicamente donde los cortes obtenidos después de dos días de los tejidos tratados con el preparado herbal, mostraron una gran número de células infiltradas tales como macrófagos, neutrófilos, algunos linfocitos y fibroblastos; una importante reacción vascular con hiperemia y vasodilatación (Figuras 16 d y f), en comparación con las heridas no tratadas donde estas características se observaron en los cortes obtenidos al día 5.

La fase inflamatoria aparece ser mas breve en los grupos tratados con el extracto herbal, esto podría explicarse por la capacidad antioxidante demostrada para el matico y el llantén (principalmente polifenoles), al inhibir la aparición de focos inflamatorios gastrointestinales (datos de este equipo no publicados). Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son producidas principalmente por los neutrófilos donde intracelularmente al combinarse con el cloro, permiten la degradación de las biomoléculas dañadas por injuria (19), pero además ellos pueden liberar estas especies reactivas al medio extracelular después de ser activados por la presencia de microorganismos, citoquinas, complejos inmunes, o después de la fagocitosis. En bajas concentraciones las EROs modulan el metabolismo de prostanoïdes, la auto-oxidación de catecolaminas, la activación de los fagocitos y la angiogénesis en una herida. Sin embargo en la etapa inflamatoria de la reparación tisular las EROs son producidas en grandes cantidades, en comparación con las etapas posteriores (22). La enzima NADPH oxidasa, presente en las células pro-inflamatorias, cataliza la reducción del oxígeno molecular a O_2^- . Cuando las defensas antioxidantes celulares no son capaces de regular la síntesis y/o la remoción de estas especies, se produce “estrés oxidativo”. Se ha observado alta presencia de malondialdehído y 4-hidroxi-2-nonenal, ambos subproductos de la oxidación lipídica (de la membranas biológicas) en úlceras venosas crónicas en comparación con úlceras venosas agudas, lo que sería indicador de presencia de estrés oxidativo en heridas crónicas, que probablemente es el resultado de la persistencia de un fuerte infiltrado inflamatorio (23).

Otro hecho histomorfológico importante a resaltar es la abundante presencia de mastocitos en ambos controles respecto al tratado con el preparado herbal. Estas células generalmente están presentes en todas las fases de la reparación tisular y se les ha reconocido una capacidad de regular el proceso reparativo (66). Sin embargo un exceso de esta línea celular produciría una sobrerreacción de la reparación y sobretodo, una respuesta inflamatoria escandalosa. En el grupo tratado con el preparado herbal no se observaron Mastocitos en los cortes de tejidos después de 2 días de reparación lo cual coincide con una reducción más rápida de la respuesta inflamatoria.

Al día 5 de observación el grupo tratado con el extracto herbal ya presentaba mayor contracción de la herida, con bordes menos irregulares e inflamados menor componente clínico inflamatorio, y un mayor grado de epitelización, comparado con los grupos controles (Figura N° 5).

El análisis de la variación del diámetro de la úlcera en los tres grupos en estudio también mostró que la reparación de la herida del grupo experimental fue más rápida que la de los grupos controles. Esta disminución fue progresiva en el tiempo, alcanzando un máximo del 50% al séptimo día de tratamiento comparado con un 20%, que fue la disminución máxima alcanzada con ambos controles. Cabe señalar además, que la disminución del diámetro de la herida de los controles no tuvo un comportamiento lineal en el tiempo y el valor de disminución del 20% corresponde al séptimo día de tratamiento. Importante es destacar que a pesar del número bajo de animales utilizados por grupo (12 animales), la diferencia del grupo experimental fue estadísticamente significativa, demostrando un real efecto del extracto herbal, resultados que fueron consecuentes con las características clínicas evaluadas del proceso reparativo.

Estas características clínicas también coinciden con lo observado histológicamente, donde ya al día 5 se observan en el tejido tratado con el

preparado herbal un tejido con gran cantidad de células de tipo fibroblastos algún infiltrado inflamatorio con leucocitos y macrófagos y gran cantidad de vasos neoformados, características que coinciden con la formación del tejido de granulación (1). La proliferación de fibroblastos y su diferenciación en miofibroblastos con la consecuente formación de una matriz extracelular rica en fibras de colágeno que van madurando primero como fibras reticulares (colágeno tipo III) y al madurar reforma el colágeno tipo I, incrementando así la resistencia del tejido en reparación y provocando la contracción progresiva de la herida para facilitar el cierre del defecto (67). El número aparentemente mayor de células tipo fibroblastos y miofibroblastos en las heridas tratadas con el preparado herbal particularmente al día 7 de observación, permiten explicar parcialmente la reducción más rápida del diámetro de la herida, como se evidencia en otros estudios con otros extractos naturales (67, 68, 69).

También la proliferación de los queratinocitos permite el cierre de la herida y la reducción de su diámetro, este proceso de epitelización ha sido descrito como el proceso de división y migración de los queratinocitos a partir de las capas basales del epitelio (4). Si bien en este estudio no se llegó a la observación del cierre completo de la herida en el grupo tratado con el preparado herbal se observaron cambios importantes en las capas basales del epitelio lesionado, más estudios con marcadores de proliferación celular deberían ser realizados, para comparar la actividad de los queratinocitos en los diferentes periodos de observación.

No es menos importante reconocer que la herida de los animales tratados con plastibase presentó una leve diferencia respecto al grupo control no tratado; ella se manifestó en la evaluación clínica, pero no en la reducción del diámetro de la herida. Esto se debe, probablemente, al efecto de protección física del gel plastibase fenómeno que permite aislar la mucosa oral del medio ambiente bucal.

Este trabajo muestra que el uso de fitomedicina, sobretodo en las zonas rurales donde las plantas medicinales se utilizan empíricamente como “cataplasmas” e infusiones de matico en el tratamiento de heridas de la piel y mucosas, podría ser una alternativa terapéutica válida. El trabajo experimental realizado, confirma la hipótesis de esta tesis y justifica el uso de las hojas de matico y llantén en este tipo de patologías. Más aún, preparados a partir de extractos hidro-alcohólicos serían más potentes que aquellos provenientes de infusos que corresponden a extractos acuosos. Por otra parte, la administración en este caso de este extracto en un vehículo farmacéutico, acorde a las características del medio oral, permite acortar el tiempo de tratamiento, generando una reparación más rápida y de mejores características.

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

CONCLUSIONES

El preparado de matico y llantén incluido en plastibase aceleró en todos sus aspectos el proceso de reparación, disminuyendo el tiempo de recuperación de la úlcera palatina de las ratas respecto a los grupos control.

Específicamente:

- El grupo tratado con extracto herbal presentó parámetros clínicos de reparación más tempranos y mayor contracción del diámetro de la úlcera palatina respecto de los grupos control 1 y 2.
- El grupo control 1 (plastibase sola), presentó parámetros clínicos de reparación levemente más prematuros respecto al grupo control 2 (sin tratamiento).
- El análisis histomorfológico evidenció en el grupo experimental una reducción de los componentes inflamatorios y mayor presencia de material fibrilar a lo largo de todos los días de observación, respecto de los grupos control.

SUGERENCIAS

- Realizar un análisis histomorfológico de la maduración y el tipo de fibras colágenas presentes en el tiempo, en los tres grupos de estudio.
- Realizar un análisis inmunohistoquímico que permitan evidenciar moléculas marcadoras de las diferentes etapas del proceso reparativo como COX₂ enzima inducible frente a procesos inflamatorios y Ki67 para la proliferación celular.
- Aumentar el número de animales de experimentación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Geoffrey C, Gurtner S, Barrandon Y, Longaker T. Wound repair and regeneration. *Nature* .2008; 453: 10-15.
- 2 Mühl D, Woth G, Drenkovics L, Varga A, Ghosh S, Csontos C, Bogár L, Wéber G, Lantos J. Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury. *Indian J Med Res*. 2011;134 (1):69-78.
- 3 Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Exp Med*. 2011; 208 (3):417-420.
- 4 Peterson L, Hupp J, Ellis E, Tucker R. Contemporary of oral and maxillofacial surgery. .2da Ed. Madrid. St. Mosby.1988.
- 5 Bascones A, Figuero E, Esparza G. Ulceras orales, Revisión. *Medicina Clínica* .2005; 125(15):590-7.
- 6 Lazarus G, Cooper M. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol*. 1988; 130:489-93.
- 7 Soriano Y, Masanet M, Gavaldá C, Gallud M, Haya C. Lesiones erosivas y ulceradas de la mucosa oral. Manifestaciones clínicas y diagnóstico. *ICOEV*. 2005; 150:10-21.
- 8 Waizel-Bucay J, Martínez I. Plantas empleadas en odontalgias I. *Revista ADM*. 2007; 64(5): 173-186.
- 9 Vogel H, Razmilic H, Polanco X, Letelier M. Effect of different provenances and production conditions on antioxidant properties in *Buddleja globosa* leaves. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2010; 9(5):333 – 342.
- 10 Backhouse N, Delporte C., Erazo S., Negrete R., Vargas L. *Buddleja globosa* Hope (Buddlejaceae), Matico, Estudios para un futuro producto Farmacéutico. XXIV Congreso Latinoamericano y XXI Congreso Peruano de Química, Lima, Perú. 2000.
- 11 Backhouse N, Rosales L, Apablaza C, Goity L, Erazo S, Negrete R, Theodoluz C, Rodríguez J, Delporte C. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *J Ethnopharmacol*.2008; 116 (2): 263-9.

-
- 12 Robbins J, Ramzi S, Vinay K, Tucker C. Patología estructural y funcional. Sexta ed. Edición español .Madrid. McGraw Hill interamericana.2000; Cap 4: pp.95-120.
 - 13 Watson T. Soft Tissue Wound Healing, review. Sportx-medicine. 2009; 29: 1-6.
 - 14 Felzani R. Cicatrización de los tejidos con interés en cirugía bucal. Acta Odontológica Venezolana.2005; 43(3):24-32.
 - 15 Martin P, Leibovich S. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. Trends Cell Biol. 2005; 15: 599–607.
 - 16 Efron D, Chandrakanth A, Park J-E. Wound healing. Schwartz's principles of surgery. 8th edition. New York. McGraw-Hill. 2005.
 - 17 Teller P, White T. The physiology of wound healing: injury through maturation. Surg Clin North Am. 2009; 89(3): 599-610.
 - 18 Furie B, Furie C. Mechanisms of thrombus formation. N Engl J Med.2008; 359:938–49.
 - 19 Hunt T. Wound healing: Current surgical diagnosis and treatment. 12th edition. New York. McGraw-Hill .2006.
 - 20 Mescher L, Neff W. Regenerative capacity and the developing immune system. Eng Biotechnol.2005; 93: 39–66.
 - 21 Greenwald, R. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases a critical. Free Radical Biology and Medicine.1990; 8 (2): 201-209.
 - 22 Roy S. Khanna S. Nallu K .Dermal wound healing is subject to redox control. Mol Ther. 2006; 13: 211-220.
 - 23 Schäfer M, Werner S.Oxidative stress in normal and impaired wound repair. Pharmacol Res.2008; 58(2): 165-171.
 - 24 Diegelmann F. Cellular and biochemical aspects of normal wound healing: an overview. J urol.1997; 157 (1): 298–302.
 - 25 Eming S, Krieg T, Davidson J. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. J Invest Dermatol. 2007; 127: 514–21.

-
- 26 Broughton G, Janis J, Attinger C. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117 (7):12–34.
 - 27 Morales M. *En las Raíces está el Futuro: Fitomedicina y Fitoterapia.* Ediciones Universidad de Chile. Santiago de Chile. Editorial Mediterráneo. 2004.
 - 28 Cozzi L. OMS: Monografie di piante medicinali. 1 edizione. Genova.2002. whqlibdoc.who.int/publications/2002/9241545178_vol1_ita.pdf. Visualizado el 20-11-2012.
 - 29 Morales M. Clinical use of the Ginkgo biloba extract. *Revista de Fitoterapia España.*2000; 1(2): 95-105.
 - 30 Houghton P, Hikino H. Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja* species. *Planta Med.*1989; 55:123-6.
 - 31 Mellado V, Medina E, San Martín C. *Herbolaria Médica de Chile: Diagnóstico de su estado actual y perspectivas futuras para la Medicina Oficial Chilena.* Ministerio de Salud, Santiago de Chile.1996.
 - 32 Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T .*Plantas medicinales de uso en Chile, Química y Farmacología.* Santiago de Chile: Editorial Universitaria.2001; 22: 69-72.
 - 33 Pardo F, Perich F, Torres R. Un nuevo glicósido de *Buddleja globosa* con actividad bactericida. *Bol. Soc. Chil. Quim.*1997; 42 (1): 101-4.
 - 34 Liao Y, Houghton P, Hoult J. Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J. Nat. Prod.*1999; 62(9): 1241-5.
 - 35 Houghton P, Hylands P, Mensah A, Hensel A. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *J. Ethnopharmacol.*2005; 100(12):100-107.
 - 36 Mösbach E. *Botánica Indígena de Chile.* Santiago de Chile: Museo Chileno de Arte Precolombino, Fundación Andes y Editorial Andrés Bello.1992.
 - 37 Muñoz M, Barrera E, Meza I. (1981). El uso medicinal y alimenticio de plantas nativa y naturalizadas en Chile; Santiago de Chile: Museo Nacional de Historia Natural.1981;33: 20-8.

-
- 38 Hoffmann A, Farga C, Lastra J. . Plantas medicinales de uso común en Chile. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago de Chile. Lord Cochrane .1992; 260-7.
- 39 Farga C, Lastra J. Plantas medicinales de uso común en Chile. Santiago de Chile: Ed. Paesmi.1988; 51-55.
- 40 Houghton P. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. J. Ethnopharmacol.1984; 11(3): 293-308.
- 41 Mensah A, Houghton P, Hughes M. *In vitro* investigation of the wound-healing properties of *Buddleja globosa*. Journal of Pharmacy and Pharmacology.1998; 50: 83.
- 42 Houghton P, Mensah A. Biologically-active compounds from *Buddleja* species. Phytochemicals New York: Kluwer Academic/Plenum.1999; 33:343-68.
- 43 Vargas L. Evaluación de las actividades analgésica y antiinflamatoria de *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. Formulación de un preparado dermatológico. Santiago de Chile: Tesis; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.2001.
- 44 Hetland G, Samuelsen A, Lovik M, Paulsen B. Protective effect of *Plantago major* L. Pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. Scand J Immunol.2000; 52: 348-55.
- 45 Páginamédica.com. Balcón Alternativo: Fitoterapia. Plantas de acción antifebril y sudorífica. Faro interior.Mexico.2005. Visualizada 20/11/2012. [http:// www.paginamedica.com/balcon/ver.asp.fitoterapia](http://www.paginamedica.com/balcon/ver.asp.fitoterapia).
- 46 Scully C, Porter S. Orofacial disease: update for the dental clinical team. Dent Update.1998; 25: 478–84.
- 47 Botanical.com. Martínez V. El mundo de las plantas. México. 2005. Visualizada.21/12/29012.<http://www.botanical-online.com/medicinalslantent.htm>.
- 48 Bruneton J. Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants 3rd ed. Paris. Intercept-Lavoisier .2000.
- 49 Angelov A, Lambev I, Markov j .Study of acute and chronical toxicity of disperse of *Plantago major*. Medical Archives.1980; 18: 47–52.

-
- 50 Wood N, Goaz P. Diagnostico diferencial de las lesiones orales y maxilofaciales. Quinta edición. Madrid. Harcourt. 1999;pp 652.
 - 51 Gallagher G. Biología y patología de la mucosa oral. Dermatología en medicina general. 4ta ed. Madrid: Panamericana.1997; pp.1417-1482.
 - 52 Cawson, R. Oral Ulcerations. Clinical Aspects.Oral Surg.1972; 33: 912-921.
 - 53 Esparza-Gómez G, López-Argüello C, García N. Estomatitis aftosa recidivante: Revisión y puesta al día. Med Oral.1998; 3:18-35.
 - 54 Esparza-Gómez GC, Cerero R, Moreno L.Estomatitis aftosa recurrente. Gaceta Dental.2000; 104: 44-52.
 - 55 MacPhail L, Greenspan D. Herpetic gingivostomatitis in a 70-year-old man. Oral Surg.1995; 7: 50-52.
 - 56 Bascones Martínez A, Valero Marugán A, Carrillo de Albornoz Sainz A, Encinas-Bascones A. Afectación oral de las enfermedades comunes en la infancia con carácter exantemático. Av Odontoestomatol. 2006; 22 (3): 163-170.
 - 57 Schneider L, Schneider A. Dianosis of oral ulcers. Mt Sinai J Med.1998; 65: 383-7.
 - 58 Bruce A, Rogers R. Acute oral ulcers. Dermatol Clin.2003; 21:1-15.
 - 59 Shimoyama T, Kaneko T, Nasu D. A case of an electrical burn in the oral cavity of an adult. J Oral Sci.1999; 41:127-8.
 - 60 Razmus T. Tongue ulcerated by trauma: report of a case. JADA.1992; 123: 82-6.
 - 61 Cavalcante G, Sousa de Paula R. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. Acta Cir Bras.2011; 26(3):227-34.
 - 62 Soothe N . Cyanoacrylate medical adhesives a new era Colgate ORABASE: Compend Contin Educ .Dent Suppl.2001; 32: 7-11.
 - 63 Okabe S, Amagase K. Anoverviewof acetic acid ulcer models – the history and state of the art of peptic ulcer research. Biol Pharm Bull.2005; 28(8):1321

-
- 64 Houghton P. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. J. Ethonopharmacology.1984; 11: 293-308.
- 65 Fernando J, Guénet J. (2003). Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Universidad de Alcalá de Henares y la SECAL. <http://www.secal.es/Elemento.aspx?id=469>. Visualizado el 18/11/2012
- 66 Aller MA, Arias JI, Arias J. Pathological axes of wound repair: gastrulation revisited. Biol Med Model. 2010; 14:7-37.
- 67 Panchatcharam M, Miriyala S, Gayathri VS, Suguna L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. Mol Cell Biochem.2006; 290(1-2): 87-96.
- 68 Aramwit P, Sangcakul A. The effects of sericin cream on wound healing in rats. Biosci Biotechnol Biochem.2007; 71(10): 2473-2477.
- 69 Kosger H, Ozturk M, Sokmen A, Bulut E. Wound healing effects of *arnebia densiflora* root extracts on rat palatal mucosa. Eur J Dent. 2009; 3(2):96-99.

ANEXO

APROBACION PROTOCOLO DRAS MA TORRES-MA LETELIER 0483

1 mensaje

Patricia Iturra <piturra@med.uchile.cl>
Para: matorresquintana@gmail.com, mel@ciq.uchile.cl

13 de noviembre de 2011 13:41

Estimado(a)colega,

Me es grato informar que la ultima versión CORREGIDA del Protocolo CBA # 0483 FMUCH, ha sido aprobada.

Le ruego que nos haga llegar DOS COPIAS IMPRESAS de esta versión corregida de su Protocolo, con la firma del ACADEMICO responsable Y DEL DIRECTOR del Programa o departamento en la última Sección del protocolo (Sección L).

Rogamos entregar este documento donde la Sra. MONICA VIDELA, Secretaria Administrativa, de la Comisión de Ética de la Facultad, 3º piso Decanato, anexo 86923. Una vez entregado el documento, la Certificación de su Protocolo será enviada a su Unidad Académica.

saluda atentamente
Patricia Iturra