



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL DR DARIO FERNANDEZ FIERRO

“EVALUACION DE LA EFICACIA DE LA PIEL DE CADAVERES CON ISQUEMIA  
PROLONGADA UTILIZADA COMO CUBIERTA CUTANEA TEMPORAL EN UN  
MODELO ANIMAL.”

T E S I S   D E   P O S G R A D O  
P A R A   O B T E N E R   E L   T I T U L O   D E  
E S P E C I A L I S T A   E N   A N A T O M I A   P A T O L O G I C A

P R E S E N T A :

DR. JULIO CESAR PLASCENCIA BELTRAN.

RESIDENTE DE 3ER AÑO DEL

CURSO DE ESPECIALIZACION DE ANATOMIA PATOLÓGICA



MEXICO D.F. 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A Dios**, en algunas ocasiones, mi única compañía.

**A toda mi familia** (incluidas mis madres y hermanitas de patología)  
quienes tanto me han cuidado y apoyado.

**A todos los colaboradores** que ayudaron a materializar una idea  
sin mayor interés que hacer crecer a nuestra Sagrada Ciencia.

**Y a todos aquellos que creyeron en mí y a los que no creyeron**, también,  
pues, dentro de las motivaciones más grandes de éste mundo están el amor y el odio.

## **INVESTIGADORES Y COLABORADORES:**

### **DR. JULIO CESAR PLASCENCIA BELTRAN**

Investigador principal y responsable de protocolo de investigación.

Residente de tercer año de Anatomía Patológica.

Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”

### **DRA. MARÍA ELENA GARCIA SANTOS.**

Asesor de Tesis y Profesor de Titular del Curso de Anatomía Patológica

Médico Anatomopatólogo adscrito al Servicio de Anatomía Patología.

Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”

### **DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ**

Asesor Técnico de Tesis

Jefe del Departamento de Tejido Conjuntivo

Instituto Nacional de Rehabilitación. INR.

### **DRA. LOURDES NORMA CRUZ SANCHEZ**

Tutor Metodológico de Tesis (Estadística)

Jefa de la división de Enseñanza e Investigación

Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro”, ISSSTE

### **DRA. NURIA GISPERT CRUELLS**

Colaborador Técnico de Tesis (Laboratorio y Recursos del Servicio de Anatomía patológica)

Jefe del servicio de Anatomía Patológica y Profesor adjunto del curso de Anatomía Patológica

Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro”, ISSSTE

### **DRA. ZAYRA PAMELA SAID GAYOSSO**

Colaborador Técnico (Manejo de Animales).

Residente del 2º año de Anatomía Patológica.

Hospital General “Dr. Darío Fernández Fierro”

**DR. ENRIQUE PINZÓN ESTRADA.**

Asesor Técnico y Colaborador de Recursos Materiales (Animales de laboratorio).

Jefe del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

**T.H. EDUARDO FARFAN MORALES**

Colaborador Técnico de Tesis. (Tinciones Básicas e Inmunohistoquímica CD31)

Histotecnólogo.

Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro”, ISSSTE

**T.H. ANTONIO DAVILA DIAZ**

Colaborador Técnico de Tesis. (Tinciones Básicas)

Histotecnólogo.

Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro”, ISSSTE

**Lic. En Biol. GABRIELA ESPINOZA MOLINA.**

Colaborador Técnico de Tesis (Diseño experimental)

Colaborador del Departamento de Tejido Conjuntivo

Instituto Nacional de Rehabilitación. INR.

**QFB. SALGADO CURIEL ROSA MARIA.**

Colaborador Técnico de Tesis (Diseño Experimental)

Colaborador del Departamento de Tejido Conjuntivo

Instituto Nacional de Rehabilitación. INR.

**QFB y M en C. JOAQUIN GONZALEZ MONROY**

Colaborador Técnico de Tesis. (Microbiología)

Químico jefe de sección (Microbiología) del Laboratorio Clínico

Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro”, ISSSTE

**QBP. RUBEN DARIO CERON CARDENAS**

Colaborador Técnico de Tesis. (Microbiología)

Jefe del Laboratorio Clínico.

Hospital General “Dr Darío Fernández Fierro”, ISSSTE.

**DRA. LOURDES RODRIGUEZ FRAGOSO.**

Colaborador Técnico de Tesis (Ensayo MTT)

Profesora-Investigadora Titular, Maestro en Ciencias en Toxicología,

Doctora en Ciencias en Farmacología.

Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**M en F. LORENZO ULISES OSUNA MARTINEZ.**

Colaborador Técnico de Tesis (Ensayo MTT)

Laboratorio de Farmacología y Toxicología.

Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

## **INDICE**

**Página**

<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6-13</b>
<b>DISEÑO.....</b>	<b>14</b>
<b>JUSTIFICACION.....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>14</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>15-18</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>19-55</b>
<b>ANALISIS ESTADISTICO.....</b>	<b>45-55</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>56-57</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>58-60</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>61-62</b>
<b>APENDICE.....</b>	<b>63</b>

## **EVALUACION DE LA EFICACIA DE LA PIEL DE CADAVERES CON ISQUEMIA PROLONGADA UTILIZADA COMO CUBIERTA CUTANEA TEMPORAL EN UN MODELO ANIMAL.**

**MARCO TEORICO:** La piel nuestro mayor y más complejo órgano, que mide aproximadamente 1.5 a 2.0 m<sup>2</sup> y su espesor varía entre los 0.5mm a los 4mm y con peso aproximado de 5kg y que actúa como barrera protectora aislando al organismo del medio externo de agentes químicos e infecciosos, provee regulación térmica, además prevenir deshidratación por evaporación, entre otras propiedades.[1] No obstante y pese a su aparente resistencia, es en esencia, vulnerable a gran gama de daños provocados por diversos agentes, que incluso, en ocasiones son imperceptibles.

La piel humana normal se compone de células epidérmicas principalmente de queratinocitos (95-97%) y células anexas (glándulas, pelo, uñas) y en menor proporción melanocitos, células dendríticas (células de Langerhans) y estructuras sensoriales nerviosas (células de Merkel). [3]

El componente dérmico incluye componentes vasculares (endotelio, músculo liso), fibroblastos, células nerviosas (dolor, temperatura), células de respuesta inmune (mastocitos, histiocitos) y músculos piloerectores, no obstante, la mayor parte de la dermis consiste en matriz extracelular (colágeno, elastina, reticulina, polisacáridos) que es la que provee de sus características mecánicas a la piel (fuerza y elasticidad). [3]

Las quemaduras en sus distintos tipos y grados son consideradas dentro de las lesiones más graves debido a que desprovee a la piel de sus más importantes características como son el aislamiento tanto de los agentes infecciosos como de la conservación de líquidos en el medio interno, lo que causará una alteración temprana y por lo general grave en la homeostasis del organismo.

Las lesiones cutáneas por lo general se acompañarán de una restauración de su estructura y su función, hecho que estará condicionado por el tipo y extensión del daño. [1]

La cicatrización o recuperación puede considerarse en cuatro etapas o estadios. El primero es considerado como el estadio de la limitación del daño, convencionalmente en donde ocurre

hemorragia y coagulación, en éste además de prevenir la pérdida de sangre sino además se genera un relleno temporal para la herida así como se inicia la primera llegada de células de respuesta a la zona dañada, las cuales promueven la inflamación de la siguiente etapa. El segundo estadio (inflamatorio) se caracteriza por incrementar el flujo sanguíneo hacia el área lesionada y tiene lugar el ingreso de leucocitos de varias clases que actúan removiendo el tejido irreparable así como recuperar el salvable protegiéndolo de la colonización de microorganismos. El tercer estadio (proliferativo) presenta desarrollo de vasos sanguíneos dentro del área delimitada por el material hematógeno de relleno, además de crecimiento de fibroblastos los que producen fibrina y que forman parte del tejido de granulación en la herida, al mismo tiempo existe estimulación del crecimiento de las células epiteliales en los márgenes de la herida y de los apéndices epidérmicos profundos cuyos procesos sirven para proveer una cubierta celular epitelial por medio de puentes a través de la herida para su cierre.[2]

Cuando el cierre de la herida se ha logrado se puede considerar curada, pero en realidad es el comienzo de la etapa más larga y compleja de la recuperación. El estadio de remodelación, puede durar meses después de haberse cerrado la herida. El tejido fibroso depositado en la herida será modificado por acción de los fibroblastos para finalizar con una cicatriz, la cual en ocasiones es indistinguible a simple vista de la piel circundante, otras veces se eleva sobre la piel adyacente pero dentro de los límites de la lesión original (cicatriz hipertrófica) y en otras ocasiones rebasa el margen de la lesión original y se eleva sobre la piel aledaña (cicatriz queloide). [2,4,5]

El mecanismo de reparación descrito puede durar de varios días a semanas incluso meses, dependiendo de la extensión y profundidad de las lesiones, además de las situaciones que complican la recuperación como son infecciones o enfermedades concomitantes que puede presentar el paciente (diabetes, inmunocompromiso, etc.) haciendo más prolongada aún la recuperación.[4,5]

En el empeño por mantener tal equilibrio a la vez de propiciar la regeneración y/o reparación de la piel se han creado e implementado diversos sustitutos sintéticos y biológicos, permanentes y temporales para resolver la ausencia de la piel.

El sustituto dérmico se define como aquel material sintético o biológico que proporciona parcial o totalmente las propiedades de la piel ya sea temporal o permanentemente con la finalidad primaria será evitar infecciones y desequilibrio hidroelectrolítico, así como proveer un plano bajo el cual el tejido subyacente proliferará de manera organizada. [4]

Visto desde el contexto de diferentes autores, el sustituto dérmico "ideal" deberá: ser barato, de larga duración, se usará fuera de la propia piel, no antigénica, resistente, flexible, que mantenga todos los atributos de la piel propia, que se adapte a superficies irregulares, fácil de fijar, que crezca con los niños, se aplique en un solo acto quirúrgico y que no cause cicatriz hipertrófica [4,5,7,9,10], en opinión de un servidor, son criterios que en conjunto pueden ser casi imposibles de cumplir, no obstante, cada una de las investigaciones exitosas o fallidas no acercará cada vez más a cumplir cada una de estas demandas.

Pueden clasificarse basados en la composición de la piel en: Clase I, sustituto de piel que consiste sólo de equivalente epidérmico cultivado. Clase II, que abarca componentes dérmicos de piel procesada o fabricada con colágeno u otras proteínas de la matriz. Clase III, sustituto de piel que posee los distintos componentes epidérmicos y dérmicos, los cuales comúnmente son conocidos como piel compuesta.[1,5,7,8, 9, 10, 11, 12]

Otra clasificación que cubre todos los materiales sería:

Clase I: Materiales de preparación impermeables temporales.

Éstos no tienen ningún componente epidérmico es decir sin queratinocitos, es esencialmente un material impermeable, que como la piel actúa como una barrera mecánica en contra de la invasión bacteriana y reduce la evaporación de agua y así propiciar un ambiente húmedo para una mejor curación. En esta clase se incluyen:

a) Materiales de una sola capa, membranas naturales que funcionan como una cubierta biológica:

-Membrana amniótica.

-Piel de papa.

b) Materiales sintéticos de una sola capa para sustitución de piel:

-Capa sintética de polímero (Tegaderm, Opsite, Dermafilm)

-Espuma o spray de polímero.

c) Material bicapa creado a base de tejido:

-TransCyte, que consiste en una membrana de polímero y fibroblastos de recién nacido humano cultivados bajo condiciones asépticas in vitro sobre una red de nylon. Como los fibroblastos proliferan sobre la red de nylon, éstos secretan colágeno dérmico humano, matriz proteínica y factores de crecimiento, posteriormente se congelan con lo que se detiene la actividad metabólica celular, no obstante el colágeno y los factores de crecimiento seguirán intactos de ahí al cubrir la lesión del paciente las células epiteliales propias migran a través de la herida más rápido con una recuperación más pronta. [1,5,6,7, 8,9,11,12,13,14]

Clase II: Substituto de piel de capa única durable:

a) Substitutos epidérmicos: producen cicatriz de poca calidad, producción flictenas y desprendimiento llegan a ocurrir.

-El único producto en esta categoría es el autoinjerto epitelial cultivado o Apligraf.

b) Substitutos dérmicos: abarcan componentes dérmicos de piel procesada o fabricada con colágeno y otras proteínas de la matriz. Éstos producen mejor calidad de cicatrización y minimiza la posibilidad de contractura e incluye:

- Capa de colágeno proveniente de porcino (Permacol).

- Matriz dérmica bovina (Matriderm), es proteína extracelular (colágeno y elastina) que funciona como andamio para la reconstrucción de la piel y modulación del tejido de cicatrización. Es utilizada con injerto autólogo, para defectos de todo el espesor de la piel. Incrementa la elasticidad y la flexibilidad de la piel regenerada.

- Matriz dérmica humana (Alloderm) es una matriz, dérmica acelular de componentes

naturales biológicos (colágeno fibrilar y colágeno tipo VI, elastina, hialuronas, proteoglicanos, fibronectina y canales vasculares), derivada de tejido cutáneo humano listo para permitir que el organismo monte su propio proceso de regeneración de tejido.

Clase III: Substitutos compuestos de piel:

- a) Injertos de piel (aloinjerto de cadáver, Xenoinjerto- Cerdo)
- b) Piel de tejido procesado:
  - Integraw, capa epidérmica temporal, capa flexible de silicón de grado médico y una capa dérmica (una matriz de colágeno bovino y glucosaminoglicanos).
  - Biobrane, bicapa en la que la externa es una capa de silicón (análoga epidérmica) y una interna a base de una red de nylon cubierta con colágeno para adherirse a la superficie (análogo dérmico).

Substituto a base de tejido permanente: el éxito de tomar la dermis (como se observa en Alloderm e Integra) se debe al hecho de que la dermis (de origen mesodérmico) tiene solo una ligera o indetectable antigenicidad, mientras que la epidermis (de origen ectodérmico) presenta células de Lángrhans que se caracterizan por presentar antígeno HLA-DR que puede provocar mayor reacción de rechazo de huésped hacia la epidermis. [1,5,7,8,9,13,14,15]

En torno al marco legal para la realización de éste estudio, debido a la utilización de piel cadavérica se realizó la revisión de dos de las principales normas que dictan la conducta a seguir. La ley general de salud de nuestro país en su título decimocuarto sobre la donación, trasplantes y pérdida de la vida, nos brinda los lineamientos necesarios sobre dichas actividades. En el capítulo V con respecto a los cadáveres, existe el Artículo 350 Bis 3 que cita: Para la utilización de cadáveres o parte de ellos de personas conocidas, con fines de docencia e investigación, se requiere el consentimiento del disponente. En caso de tratarse se un cadáver completo deberá notificarse a la autoridad sanitaria correspondiente. El Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos en su artículo 79 cita: Para la utilización de cadáveres o parte de ellos, de personas conocidas con fines de investigación o docencia, se requiere permiso del

disponible originario otorgado ante la fe del notario público o en documento privado, expedido ante dos testigos idóneos.(16,17)

La piel obtenida de cadáver y utilizada como cubierta cutánea, es una actividad que se ha venido realizando desde varios años atrás en diversos sitios del mundo [18], no obstante la fuente de donde proviene es muy escasa, es decir solo por donación de órganos, cultura que aún debe desarrollarse en nuestro país, pues en comparativa con países desarrollados es excesivamente escasa la cantidad de donación de órganos y por ende de piel, no obstante, ésta actitud pudiese ser diferente en un caso postmortem y con la donación de un fragmento de un órgano que no modificará radicalmente al cuerpo, resultando en un beneficio para los pacientes con daño y carencia de piel. [19]. La poca piel que se obtiene debe ser preservada para ser posteriormente utilizada como cubierta cutánea temporal, y es sometida a diversos procesos como: limpieza, desinfección, ultracongelación, comprobación de viabilidad mediante valoración de actividad mitocondrial (Prueba MTT), revisión de agentes infecciosos como virus y bacterias preparación para colocación, entre otros, todo con el fin de asegurar su eficacia. ,[20,21, 22,23]

La prueba de MTT, se ha utilizado para evaluar la calidad del tejido cutáneo criopreservado y se basa en la reducción de sales de tetrazolio por las enzimas producidas por las células viables de las muestras obtenidas. Esta prueba utiliza un agente oxidante cromogénico (MMT) que corresponde a un sistema policíclico (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S) con un anillo tetrazólico que es fácilmente reducido por la deshidrogenasa mitocondrial u otro sistema de transporte de electrones, formando, a través de la apertura del anillo tetrazólico, un compuesto cromogénico nitrogenado llamado formazan, del cual su grupo funcional característico es R<sub>1</sub>NH-N=CR<sub>2</sub>-N=NR. En las células el formazan forma cristales insolubles al agua color rojo púrpura, a los cuales la membrana celular es impermeable, la molécula puede de cualquier forma entrar en la célula, pero el producto no puede dejar la célula si no ha sido correctamente metabolizado eso es si la cadena de transporte de electrones esta metabólicamente activa (capaz de reducir la molécula).

La impermeabilidad de la membrana celular al MTT sugiere que esta sal es transportada al interior mediante endocitosis y que el formazan se acumula en los compartimientos endosómicos y lisosómicos de la célula para entonces ser transportada fuera por exocitosis.

La transformación del MTT está acompañado por un cambio de color de amarillo a azul oscuro- púrpura. A la vez que se liberan sales de formazan de los compartimientos intracelulares, éstas deben ser extraídas utilizando el solvente 2-metoxietanol ( $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ) y cuya función es disolver las membranas celulares permitiendo que se libere el formazan fuera de las células y se disuelva formando la solución púrpura.

La densidad óptica de esta solución será medida por electroespectrofotómetro a una longitud de onda de 570nm. La densidad óptica brinda un estimado del número de mitocondrias activas y por lo tanto la viabilidad de las células de la muestra. [24, 25],

**DISEÑO:**

Se trata de un estudio experimental, prospectivo, abierto.

**JUSTIFICACIÓN:**

Como ya se estableció anteriormente la piel de reemplazo es un material valioso en primer lugar por el costo que conlleva su almacenamiento además el garantizar su viabilidad y su seguridad para ser injertada sin riesgo a contraer infecciones; y en segundo lugar por lo difícil de su obtención (solo por donación de pacientes con muerte cerebral) que pudiese representar la situación más compleja. Este estudio pretende al evaluar la viabilidad y utilidad de la piel con isquemia prolongada como piel substituta, de ser así, enormes cantidades de piel cadavérica de pacientes con isquemia fría prolongada, estará “rescatándose” de ser desechada y utilizándose en provecho de pacientes con pérdida cutánea.

En la actualidad se observa un incremento en los traumas en donde hay compromiso cutáneo que en ocasiones es tan extenso que compromete la vida y, por desgracia, de modo contrario la donación de tejidos entre ellos la piel se ha visto bastante disminuida, resultando en la escases grave de cubiertas cutáneas permanentes y temporales por lo cual debe de manera inmediata traducirse en mayor investigación para resolver ésta situación.

**OBJETIVO:**

Evaluar la viabilidad de la piel obtenida de cadáveres con isquemia prolongada (mayor a 6 horas y menor de 12horas) para ser utilizada como cubierta cutánea, esto mediante la medición de la actividad mitocondrial, la observación de la reepitelización subyacente a un injerto y la proliferación de vasos sanguíneos de neoformación esto en un modelo animal.

**HIPOTESIS:**

La piel obtenida a tendrá un adecuado comportamiento al ser utilizado como sustituto dérmico temporal presentando viabilidad mitocondrial, crecimiento de tejido periférico al implante e indicios de neovascularización.

**METODOS:**

La obtención de las muestras de piel cadavérica se llevó a cabo en el servicio de patología en el Hospital General, Dr. Darío Fernández Fierro, de 2º nivel del ISSSTE, previo consentimiento informado (apéndice 1).

La piel se colectó en cualquier horario postmortem dentro del rango de 6 a 12hrs desde el fallecimiento del paciente, hasta obtener 5 muestras de piel de cadáver de distintos cuerpos. Esto fue, el sujeto 1, masculino de 73 años de edad con 10hrs postmortem. Sujeto 2, femenino de 75 años de edad con 12hrs postmortem. Sujeto 3, femenino de 61 años de edad con 8hrs postmortem. Sujeto 4, masculino de 70 años de edad con 8hrs postmortem. Sujeto 5, masculino de 58 años de edad con 7hrs postmortem.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: menores de 18 años y mayores de 75 años, aquellos que hayan muerto con o como consecuencia de éstas causas comprobadas : sepsis, virus de inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, Citomegalovirus, Tuberculosis, Tumores cutáneos de alto grado, Tumores en cualquier parte del cuerpo que sean de alto grado o con metástasis y por causa violenta que lo haga caso médico legal, esto con el fin igualar en cierto grado con el estándar establecido en la mayoría de los bancos de piel.

Se tomó una muestra de 4.5cm x 4.5cm y de espesor entre 0.1- 0.2cm por cadáver de la región paraescapular de cuerpos los cuales se encontraban a temperatura ambiente, ésto, mediante un dermatomo con previa asepsia que consiste en lavado extenso de todo el dorso del tórax primero con jabón quirúrgico y gasa estéril, rasurado con navaja de rasurar nueva, enjuague con solución salina estéril, lavado con yodopovino en espuma, enjuague con sol salina estéril

y por último un rocío de isopropanol ó alcohol al 70% con atomizador, secado con gasa estéril, la navaja se reemplazó para cada biopsiado. Posteriormente se ocluyó la zona biopsiada con tela adhesiva impermeable para prevenir escape de fluido del cadáver. Obtenidas las muestras un fragmento de 0.2 x 0.2cm de cada biopsia se sometió a análisis histológico para establecer el espesor y características histológicas previas a la criopreservación de la muestra a ser procesada (**fase 1**). Y otro fragmento idéntico se sometió a análisis microbiológico para determinar carga bacteriana así como tipificación de la misma para descartar flora nativa de la piel; por último (**fase 2**), el resto de la biopsia se colocó en el medio de recolección que consistió en solución isotónica en buffer de lactatos más 80mg/lit de amikacina, 80mg/lit de gentamicina, 500mg/lit de vancomicina, 50mg fluconazol, que debió refrigerarse a 4°C para no perder propiedades pues pasó tiempo entre toma de las muestras de los diferentes cadáveres.

Posterior a su obtención se mantuvieron a 4°C por 4 hrs para dejar actuar los antibióticos, se colocó cada muestra de piel entre 2 hojas de papel filtro y se colocaron en un contenedor con 15 ml de criopreservante (glicerol) para congelarse durante 4-12hrs a -20°C y posteriormente se someten a ultracongelación (menos de -80°C) por un periodo no menor a 72hrs y no mayor a 120hrs, esto para simular el almacenaje estandarizado de la piel obtenida por donación. [20,21, 22,23]

Al término del periodo de criopreservación se descongela la piel a temperatura ambiente por 1hr y se procede a cortar 4 fragmentos en cuadrado de 1.0cm por lado, uno de los fragmentos se dividieron en 3 fragmentos más pequeños, uno de ellos se somete a procesamiento habitual para revisión histológica mediante la tinción de hematoxilina-eosina para establecer si existieron alteraciones morfológicas evidentes durante la criopresevación (**fase 3**). El un segundo fragmento se somete a análisis microbiológico bacteriano por medio de cultivo y tipificación bacteriana para establecer la eficacia del tratamiento desinfectante previo a la congelación, la acción del glicerol y la criopresevación *persé* en contra de los agentes infecciosos, en éste caso bacterias (**fase 4**) y el tercero, se somete valoración de viabilidad mitocondrial mediante el ensayo MTT o la reducción de tetrazolio a sales de formazan (ya descrita la técnica en marco teórico) (**fase 5**).

Posteriormente, en el modelo animal que consiste en ratas cepa Wistar, machos de 200gr provenientes de un bioterio oficial y registrado se aplicaron fragmentos de piel como cubiertas cutáneas, mediante sedación, rasurado y aseo en la zona dorsal con lavado usando jabón quirúrgico, agua de irrigación estéril, yodopovidona en espuma otro enjuague con agua de irrigación estéril y secado con gasa estéril, después, se retiraron 3 fragmentos iguales de piel de 1.0cmx 0.5cm de espesor parcial (0.1-0.2cm) mediante un dermatomo dejando 3 espacios sin piel superficial, uno de ellos substituido por un fragmento de las mismas dimensiones de la piel cadavérica de uno de los cuerpos, a espacio otro se le aplicó un autoinjerto de las mismas medidas (C+) y el último espacio se deja sin cubierta a evolución natural de cicatrización (C-). Éste procedimiento se realizó por cada cadáver muestreado. Éste procedimiento se realizó en tres animales por cada cadáver. (Ver figura 1)

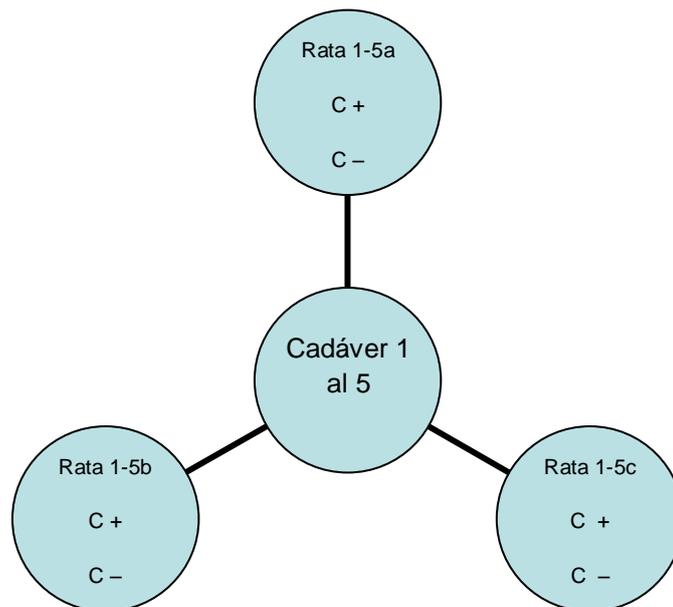


Figura 1

Los animales de laboratorio se mantuvieron en un bioterio que cumple con las normas vigentes en donde se les proporcionó de alimento y se mantuvieron en cajas individuales durante 14 días, lapso que duró esta fase del experimento. Los primeros animales (Letra A) fueron

sacrificados de forma humanitaria permitida mediante una sobre dosis de pentobarbital sódico intraabdominal a los 3 días desde la colocación de la cubierta cutánea (fase 6). Los segundos animales (Letra B) se sacrificaron a los 7 días (fase 7) y los terceros (Letra C) a los 14 días (fase 8), con el fin de estudiar el comportamiento de la cubierta cutánea en línea de tiempo, tomando en cuenta la capacidad de regeneración tisular mayor en roedores dado su acelerado metabolismo.

La obtención de la piel se llevó a cabo mediante su excisión con márgenes amplios a partir de los espacios que se realizaron previamente (margen de 0.5cm por lado), tanto el que se cubrió con piel cadavérica como los controles negativo y positivo se someterán a procesamiento histológico de inclusión, deshidratación en procesador automático de tejidos, emparafinado, teñido con la técnica hematoxilina – eosina (fase 6, 7 y 8) y realización de inmunohistoquímica con CD31 para todas las pieles obtenidas (fase 9), ambos, con el fin de cuantificar el tejido blando y la proliferación microvascular esperada en el proceso de reparación del modelo animal, además de comparar las diferentes condiciones de cubierta entre sí para medir su comportamiento .

## RESULTADOS.

Se obtienen muestras de piel provenientes de 5 cadáveres diferentes horas postmortem con las siguientes características:

Sujeto #1: Masculino de 71 años de edad con 10 hrs postmortem con la causa de muerte de acidosis mixta por insuficiencia respiratoria.

Sujeto #2: Femenino de 74 años de edad con 12 hrs postmortem con la causa de muerte de acidosis metabólica, desequilibrio hidroelectrolítico, Diabetes Mellitus tipo 2.

Sujeto #3: Femenino de 61 años de edad con 8 hrs postmortem con la causa de muerte de desequilibrio hidroelectrolítico, acidosis metabólica, Diabetes Mellitus tipo 2.

Sujeto #4: Masculino de 70 años de edad con 6 hrs postmortem con la causa de muerte de acidosis metabólica, insuficiencia renal.

Sujeto #5: Masculino de 58 años de edad con 8 hrs postmortem con la causa de muerte de edema agudo pulmonar, insuficiencia cardíaca, Diabetes Mellitus tipo 2.

**Fase 1:** Piel cadavérica inmediatamente fijada en formol después de obtenida previo a desinfección y criopreservación sometida a revisión histológica con tinción básica de Hematoxilina- Eosina.

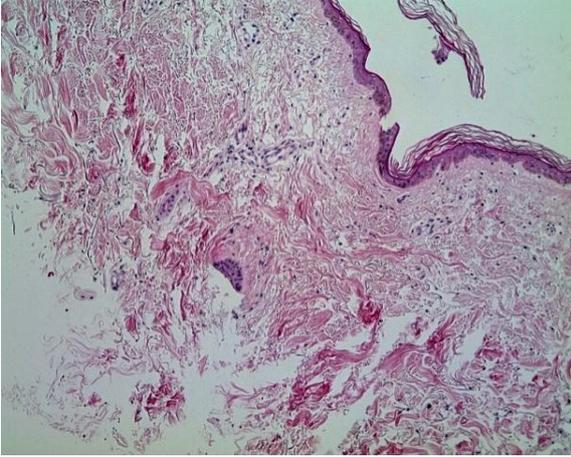
Piel del sujeto #1: ligera queratosis, con desprendimiento parcial del estrato córneo, la epidermis muestra espongiosis y atrofia importante manifestada por disminución importante de las capas superiores y prevalencia del estrato basal. La dermis superficial se muestra hipocelular con cambios líticos iniciales y con conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura, infiltrado inflamatorio crónico escaso,

Piel del sujeto #2: La epidermis muestra espongiosis y atrofia importante con prevalencia del estrato basal, algunas capas más superficiales y el estrato córneo. La dermis superficial se muestra hipocelular con cambios líticos y con conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura. Escasos linfocitos.

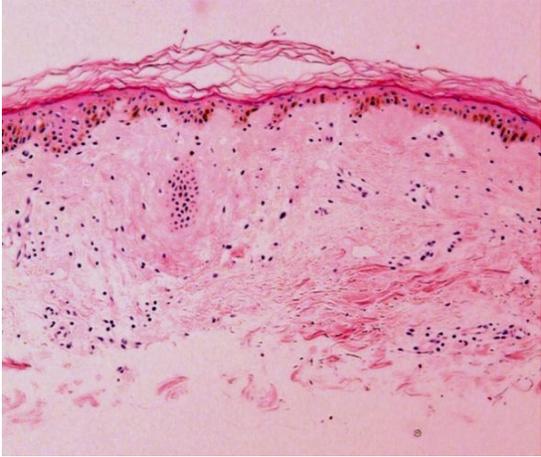
Piel del sujeto #3: La epidermis muestra espongiosis leve y atrofia con prevalencia del estrato basal y algunas capas superiores. La dermis superficial se muestra hipocelular con cambios líticos conserva fibras de colágeno formando fascículos y con conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura. Escasos linfocitos.

Piel del sujeto #4: La epidermis muestra espongiosis y atrofia con prevalencia del estrato basal y el córneo con algunas capas de estratos intermedios. La dermis superficial se muestra hipocelular con cambios líticos y con conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura. Escasos linfocitos dispersos.

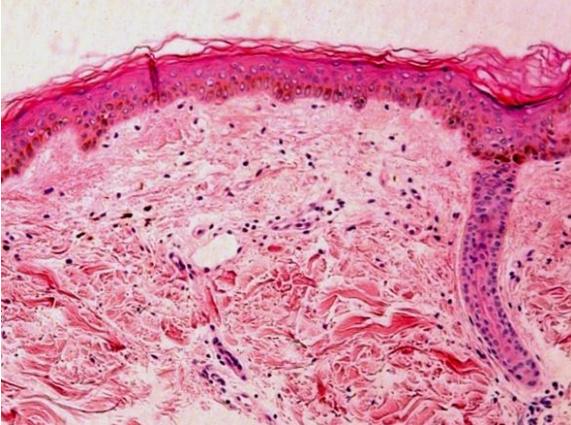
Piel del sujeto #5: La epidermis muestra espongiosis y atrofia, presencia del estrato basal y 3 a 4 capas de estratos superiores además de córneo. La dermis superficial se muestra hipocelular con cambios líticos y con conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura. Escaso infiltrado inflamatorio crónico perivascular.



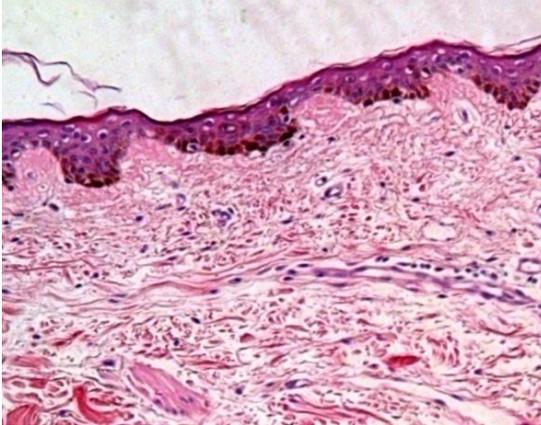
Sujeto 1.H&E 10X



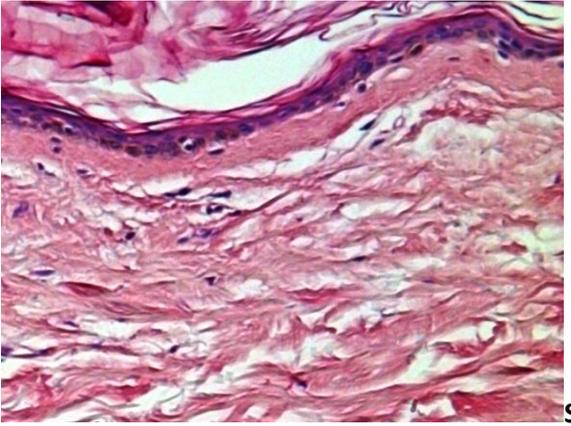
Sujeto 2.H&E 10X



Sujeto 3.H&E 10X



Sujeto 4.H&E 10X



Sujeto 5.H&E 10X

**Fase 2:** Resultados de los cultivos bacteriológicos de las pieles previos a desinfección y criopreservación.

Sujeto #1: En el cultivo bacteriológico muestra crecimiento de *Staphylococcus equorum* multiresistente, sensible a Linezonida, Tetraciclina, Rifampicina, Vancomicina.

Sujeto #2: en el cultivo bacteriológico, muestra crecimiento de *Enterobacter sp* multiresistente sensible a Sulfas y Penicilinas.

Sujeto #3: en el cultivo bacteriológico, muestra crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* multiresistente sensible a Aminoglicosidos e Imipenem.

Sujeto #4: en el cultivo bacteriológico, muestra crecimiento de *Staphylococcus haemolyticus* multiresistente sensible a Linezolid, Rifampicina y vancomicina.

Sujeto #5: en el cultivo bacteriológico, muestra crecimiento de *Staphylococcus gallinarum*, multiresistente, sensible a Linezonida, Rifampicina, Tmp/Smx y Vancomicina.

**Fase 3:** Piel cadavérica fijada en formol después del proceso de desinfección y criopreservación sometida a revisión histológica con tinción básica de Hematoxilina- Eosina.

Piel del sujeto #1: Epidermis con queratosis discreta, algo de desprendimiento del estrato córneo, escasa espongirosis y atrofia importante manifestada por disminución importante de las capas superiores y prevalencia del estrato basal. La dermis superficial esta hipocelular con cambios líticos tempranos. Ligera pérdida de organización de los fascículos de colágena y con conservación de los anexos cutáneos, infiltrado inflamatorio crónico escaso,

Piel del sujeto #2: La epidermis muestra espongirosis y atrofia con presencia del estrato basal y el corneo con algunas capas de estratos intermedios. La dermis superficial hipocelular con cambios líticos y Pérdida discreta de organización de los fascículos de colágena con conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura. Escasos linfocitos.

Piel del sujeto #3: La epidermis presenta espongirosis leve y atrofia con prevalencia del estrato basal y algunas capas superiores hasta el córneo. La dermis superficial hipocelular con cambios líticos discreto edema y pérdida ligera de fibras en los fascículos de colágena y con conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura. Escasos linfocitos.

Piel del sujeto #4: La epidermis muestra espongirosis y atrofia leve con prevalencia del estrato basal y algunas capas de estratos más superficiales incluido el córneo. La dermis superficial esta hipocelular con cambios líticos y con conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura. Escasos linfocitos.

Piel del sujeto #5: La epidermis muestra espongirosis y atrofia, presencia del estrato basal así como algunas capas de estratos más superficiales y el córneo. La dermis superficial se muestra hipocelular con cambios líticos y pérdida de algunos fascículos de colágena Escaso infiltrado inflamatorio crónico perivascular. Conservación de los anexos cutáneos (unidad pilocebácea), nervios y vasculatura.

**Fase 4:** Resultados de los cultivos bacteriológicos de las pieles posteriores a desinfección y criopreservación.

Sujeto #1: En el cultivo bacteriológico muestra crecimiento de *Enterobacter cloacae* multiresistente, sensible a Aminooglucosidos, Quinolonas y Sulfas.

Sujeto #2: en el cultivo bacteriológico, muestra crecimiento de *Enterobacter cloacae* multiresistente, sensible a Aminooglucosidos, Penicilinas y Quinolonas.

Sujeto #3: en el cultivo bacteriológico, muestra crecimiento de flora normal.

Sujeto #4: en el cultivo bacteriológico, no muestra crecimiento bacteriano.

Sujeto #5: en el cultivo bacteriológico, muestra crecimiento de *Enterobacter cloacae* multiresistente, sensible a Aminooglucosidos y Quinolonas.

**Fase 5:** Ensayo o prueba de MTT realizado con la técnica descrita en metodología. Los resultados se presentan tomando en cuenta el reporte del espectrofotómetro y se presentan de la siguiente manera:

Pozos	Testigo	Graft	Papel	Piel 1	Piel 2	Piel 3	Piel 4	Piel 5
1	0.074	0.16	0.075	0.127	0.124	0.186	0.149	0.154
2	0.069	0.108	0.073	0.142	0.117	0.226	0.159	0.127
3	0.067	0.106	0.085	0.13	0.115	0.179	0.112	0.084
4	0.07	0.116	0.073	0.174	0.197	0.127	0.173	0.122
5	0.07	0.122	0.072	0.157	0.281	0.148	0.148	0.125

### Simbología.

**Testigo:** Los pozos de la caja de ensayo se llenan con solución MDO, un medio nutritivo para las células, inerte para la prueba a fin de establecer un control "neutro" para el espectrofotómetro.

**Graft:** Se trata de una cubierta cutánea temporal sintética a base de intestino de cerdo la cual se encuentra acelular, por lo cual no debe presentar actividad mitocondrial y por ende no deberá existir reacción importante para el MTT.

**Papel:** De nueva cuenta debe aplicarse otro material no animal y acelular para el establecimiento de una línea base desde la cual se establecerá como actividad mitocondrial toda reacción producida desde éste punto.

**Piel 1 a la 5:** Piel cadavérica correspondiente a los 5 cuerpos que únicamente fue descongelada para la realización del ensayo MTT para establecer la actividad mitocondrial presente o no en el tejido después del proceso de desinfección y criopreservación.



Sistema para realización del ensayo MTT según la técnica establecida por Mosmann.

Se compilan los resultados y se les aplica prueba de significancia estadística ANOVA mediante el programa estadístico SPSS 16.0 tabulándose de la siguiente manera.

#### ESTADISTICAS DESCRIPTIVAS

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Estd.
TESTIGOS	5	.0670	.0740	.070000	.0025495
GRAFT	5	.1060	.1600	.122400	.0219727
PAPEL	5	.0720	.0850	.075600	.0053666
PIEL1	5	.1270	.1740	.146000	.0196087
PIEL2	5	.1100	.2810	.165400	.0736295
PIEL3	5	.1270	.2260	.173200	.0379302
PIEL4	5	.1120	.1730	.148200	.0225987
PIEL5	5	.0840	.1540	.121000	.0248797
Validos N	5				

## ANOVA

	SUMA DE CUADRADOS	df	MEDIA CUADRADA	F	Sig.
GRAFT Entre grupo	.002	3	.001	35.430	.123
Dentro del grupo	.000	1	.000		
Total	.002	4			
PAPEL Entre grupo	.000	3	.000	76.467	.084
Dentro del grupo	.000	1	.000		
Total	.000	4			
PIEL1 Entre grupo	.001	3	.000	3.215	.384
Dentro del grupo	.000	1	.000		
Total	.002	4			
PIEL2 Entre grupo	.018	3	.006	1.716	.499
Dentro del grupo	.004	1	.004		
Total	.022	4			
PIEL3 Entre grupo	.006	3	.002	8.366	.248
Dentro del grupo	.000	1	.000		
Total	.006	4			
PIEL4 Entre grupo	.002	3	.001	1.846	.485
Dentro del grupo	.000	1	.000		
Total	.002	4			
PIEL5 Entre grupo	.002	3	.001	183.074	.054
Dentro del grupo	.000	1	.000		
Total	.002	4			

**Fases 6, 7 y 8:** Las pieles retiradas de los animales de experimentación, fueron procesadas y marcadas de la siguiente forma: 1 al 5 inciso A son aquellas pieles del animal, obtenidas luego de 3 días desde la colocación de la piel cadavérica en la lesión causada al animal. 1 al 5 inciso B son aquellas pieles de animal obtenidas luego de 7 días desde la colocación de la piel cadavérica. 1 al 5 inciso C son aquellas pieles de animal obtenidas luego de 14 días desde la colocación de la piel cadavérica. La letra "L" se refiere a la lesión en la piel del roedor con cubierta cutánea cadavérica humana. La letra "C+" se refiere a la lesión cubierta con la propia piel de la rata. Por último la letra "C-" se refiere a la lesión sin cubierta alguna dejada a la evolución natural de la cicatrización.



Éstas imágenes son ejemplos de algunas de las pieles manejadas con el proceso ya descrito, arriba las lesiones in situ, las fotografías siguientes corresponden a las pieles obtenidas 3 días después de la aplicación del injerto, nótese la permanencia del mismo y la resolución de las pieles control negativo y positivo en orden descendente.

El procesamiento como ya se estableció consistió en la deshidratación, emparafinado, tinción con hematoxilina-eosina y por último su valoración histológica y fotografiado de cada una de las pieles de animales ya mencionadas.

A continuación se presenta la descripción de cada una de las pieles de animal y una composición fotográfica para mostrar de manera gráfica lo descrito.

Piel de rata con lesion con cubierta cutánea de cadáver, 3 días post procedimiento P1AL: Sobre el sitio de la lesion se identifica un fragmento de piel de cadáver lisada, debajo del mismo existen algunas zonas sin epidermis y otras con presencia de zonas de reparación desde los bordes de la lesión el

centro de la lesión observándose en dichas zonas pocas capas celulares de la dermis. Debajo de la lesión en la dermis superficial se identifican los fascículos de colágena organizados en una trama densa, abundantes accesorios dérmicos propios de la piel de roedor, infiltrado inflamatorio de mixto, vasos sanguíneos congestivos y hemorragia. A los 7 días P1BL: Los principales cambios son restitución parcial de la epidermis con presencia de homogeneización del espesor de los estratos intermedios, el infiltrado inflamatorio se hace más escaso. A los 14 días P1CL: Los cambios se concentran en la recuperación de la epidermis aunque con escasas capas de estratos intermedios el engrosamiento parcial de la dermis y la presencia de vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión con cubierta de su propia piel, 3 días post procedimiento P1AC+: La epidermis prolifera por debajo de el autoinjerto de manera uniforme en donde al menos se encuentra capa germinal o basal, en otras zonas existen más capas de la epidermis, infiltrado inflamatorio mixto presente y vasos sanguíneos congestivos. A los 7 días P1BC+: Los principales cambios son en el espesor de la epidermis con presencia de uniformidad del espesor de los estratos intermedios, el infiltrado inflamatorio se hace más escaso. A los 14 días P1CC+: Los cambios se concentran en el engrosamiento parcial de la dermis a expensas de fascículos de colágena y la presencia de algunos vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión sin cubierta cutánea, 3 días post procedimiento P1AC-: La epidermis no presenta pérdida de la continuidad observándose zonas en las que sólo prevalece la capa de células basales y una o dos capas de estratos superiores contando al córneo. La colágena está organizada en fascículos, los anexos cutáneos múltiples presentes, escasos vasos sanguíneos congestivos e infiltrado inflamatorio mixto leve. A los 7 días P1BC-: Los principales cambios son irregularidad del espesor de los estratos intermedios de la epidermis, el infiltrado inflamatorio se mantiene. A los 14 días P1CC-: Los cambios se concentran en el engrosamiento parcial de la dermis y la presencia de vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión con cubierta cutánea de cadáver, 3 días post procedimiento P2AL: sobre el sitio de la lesión se identifican restos de la piel de cadáver, por debajo se encuentran zonas sin epidermis sobre las cuales desde los bordes de la lesión se proyectan prolongaciones de epidermis en su porción germinal o basal en dirección del centro de la lesión. Debajo de la lesión en la dermis superficial se identifican los fascículos de colágena organizados en una trama densa, abundantes accesorios dérmicos propios de la piel de roedor, así como infiltrado inflamatorio de mixto y vasos sanguíneos congestivos. A los 7 días P2BL: Los cambios residen en la restitución parcial de la epidermis con presencia de uniformidad en el espesor de los estratos intermedios, el infiltrado inflamatorio es escaso. A los 14 días P2CL: existe engrosamiento parcial de la dermis a expensas de fascículos de colágena y la presencia de vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión con cubierta de su propia piel, 3 días post procedimiento P2AC+: la epidermis prolifera por debajo de los restos del autoinjerto de manera uniforme en donde hay adecuada proliferación de epidermis, no identificándose zonas de pérdida de la continuidad, en dermis superficial se observa infiltrado inflamatorio mixto muy escaso, vasos sanguíneos congestivos y hemorragia. A los 7 días P2BC+: Restitución parcial de la epidermis uniforme con incremento en el espesor de los estratos intermedios, el infiltrado inflamatorio se hace más escaso. A los 14 días P2AC+: existe engrosamiento moderado de la dermis e incremento de vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión sin cubierta cutánea, 3 días post procedimiento P2AC-: la epidermis no presenta pérdida de la continuidad observándose zonas en las que sólo prevalece la capa de células basales y una o dos capas de estratos superiores. La colágena está organizada en fascículos, los anexos cutáneos múltiples presentes, escasos vasos sanguíneos congestivos hemorragia e infiltrado inflamatorio crónico escaso. A los 7 días P2AC-: Regeneración de la epidermis de manera ligeramente desorganizada con cambios en el espesor de los estratos intermedios, el infiltrado inflamatorio es escaso. A los 14 días P2AC-: Se observa engrosamiento de la dermis a partir de los fascículos que proliferan en la zona superficial y presencia de vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión con cubierta cutánea de cadáver, 3 días post procedimiento P3AL: sobre el sitio de la lesión ya no se identifican restos de la piel de cadáver; en la zona afectada, se identifican restos de tejido propios de la cicatrización temprana y por debajo de los mismos se encuentra epidermis la cual presenta escasas capas celulares con predominio del estrato germinal. No hay pérdida de la continuidad. Debajo de la lesión en la dermis superficial se identifican los fascículos de colágena organizados en una trama densa, abundantes accesorios dérmicos propios de la piel de roedor, e infiltrado inflamatorio de mixto y vasos sanguíneos congestivos. A los 7 días P3BL: Los cambios son regeneración parcial de la epidermis con uniformidad en el espesor de los estratos intermedios, el infiltrado inflamatorio se hace más escaso. A los 14 días P3CL: la epidermis casi está regenerada aunque hipotrófica existe engrosamiento parcial de la dermis y la presencia de vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión con cubierta de su propia piel, 3 días post procedimiento P3AC+: la epidermis prolifera por debajo de los escasos restos del autoinjerto de manera uniforme en donde hay adecuada proliferación de epidermis, no se identifican zonas de pérdida de la continuidad, en dermis superficial se observan los anexos cutáneos propios de la piel de roedor, un infiltrado inflamatorio mixto muy escaso, vasos sanguíneos congestivos y hemorragia leve. A los 7 días P3BC+: Existe regeneración de la epidermis con suficiente uniformidad en el espesor de los estratos intermedios, escaso infiltrado inflamatorio. A los 14 días P3CC+: Epidermis casi regenerada hipotrófica con engrosamiento parcial de la dermis a expensas de fascículos de colágena proliferados y la presencia de vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión sin cubierta cutánea, 3 días post procedimiento P3AC-: por debajo de detritus celulares se identifica la epidermis que no presenta pérdida de la continuidad observándose zonas en las que sólo prevalece la capa de células basales y una o dos capas de estratos superiores. La colágena está organizada en fascículos, los anexos cutáneos múltiples presentes, escasos vasos sanguíneos congestivos, hemorragia, edema e infiltrado inflamatorio crónico, todos leves. A los 7 días P3BC-: Recuperación parcial de la epidermis con zonas uniformidad en el espesor de los estratos intermedios que alternan con otras de espesor irregular, infiltrado inflamatorio crónico escaso. A los 14 días P3CC-: Epidermis casi regenerada aunque con escasas capas intermedias, engrosamiento parcial de la dermis y vasos de neoformación.

Piel de rata con lesión con cubierta cutánea de cadáver, 3 días post procedimiento P4AL: sobre el sitio de la lesión se identifican restos de la piel de cadáver, por debajo se encuentra epidermis irregular con su estrato germinal o basal y 2 a 3 capas de células de estratos más superficiales. Debajo de la lesión en la dermis superficial se identifican los fascículos de colágena organizados en una trama densa, abundantes accesorios dérmicos propios de la piel de roedor, así como infiltrado inflamatorio de mixto y vasos sanguíneos congestivos. A los 7 días P4BL: Existe regeneración parcial de la epidermis con espesor constante, el infiltrado inflamatorio crónico es escaso. A los 14 días P4CL: epidermis casi regenerada aunque hipotrófica más engrosamiento de la dermis a expensas de fascículos de colágena

y la presencia de vasos de neoformación dispersos en la dermis.

Piel de rata con lesion con cubierta de su propia piel, 3 días post procedimiento P4AC+: la epidermis prolifera por debajo de los restos del autoingerto y detritus del coágulo sanguíneo primario, de manera uniforme, no identificándose zonas de pérdida de la continuidad, presentando estrato basal y una o dos capas adicionales del siguiente estrato. En dermis superficial se observa infiltrado inflamatorio mixto escaso, vasos sanguíneos congestivos, hemorragia y edema leves. A los 7 días P4BC+: Se observa regeneración de la epidermis uniforme en el espesor de los estratos intermedios, escaso infiltrado inflamatorio crónico. A los 14 días P4CC+: Epidermis con regeneración ligeramente hipotrófica, engrosamiento parcial de la dermis a expensas de fascículos de colágena proliferados y la presencia de vasos de neoformación dispersos e infiltrado inflamatorio casi nulo.

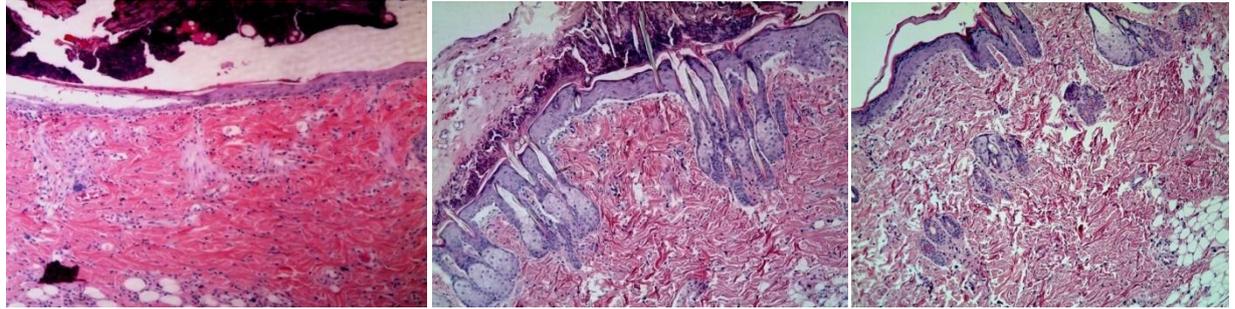
Piel de rata con lesion sin cubierta cutánea, 3 días post procedimiento P4AC-: la epidermis no presenta pérdida de la continuidad aunque irregular, observándose zonas en las que sólo prevalece la capa de células basales y una o dos capas de estratos superiores. La colágena está organizada en fascículos, los anexos cutáneos múltiples presentes, escasos vasos sanguíneos congestivos hemorragia, edema e infiltrado inflamatorio crónico escaso. A los 7 días P4BC-: se observa recuperación de epidermis de manera intensamente irregular el espesor de todos los estratos que alternan con zonas de espesor constante, infiltrado inflamatorio crónico escaso. A los 14 días P4CC-: Epidermis regenerada con escasas capas intermedias, engrosamiento parcial de la dermis por proliferación de fascículos de colágena y vasos de neoformación dispersos por la dermis.

Piel de rata con lesion con cubierta cutánea de cadáver, 3 días post procedimiento P5AL: sobre el sitio de la lesion se identifican restos celulares, por debajo se encuentra epidermis irregular con su estrato germinal o basal y 2 a 3 capas de células de estratos superiores y estrato córneo. Debajo de la lesion en la dermis superficial se identifican los fascículos de colágena organizados en una trama densa, abundantes accesorios dérmicos propios de la piel de roedor, infiltrado inflamatorio de mixto escaso. A los 7 días P5BL: Se observa regeneración parcial de la epidermis de manera uniforme e infiltrado inflamatorio crónico es escaso. A los 14 días P5CL: La epidermis casi regenerada e hipotrófica y hay engrosamiento de la dermis por proliferación fascículos de colágena y la presencia de vasos de neoformación dispersos en la dermis.

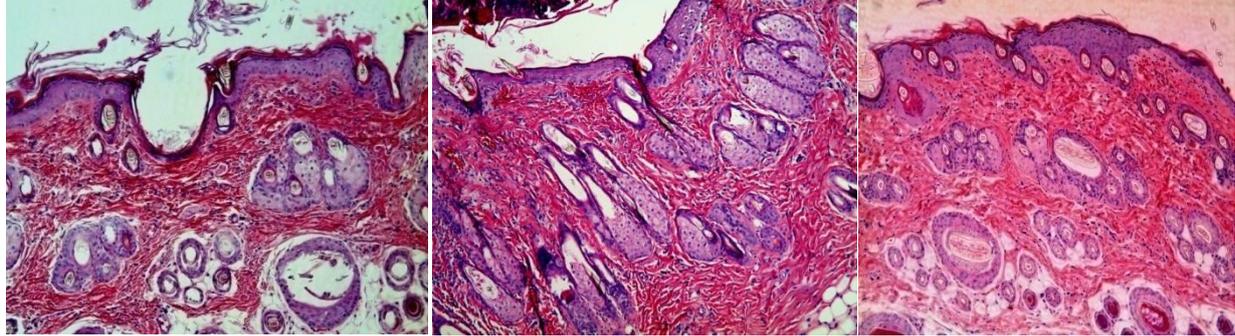
Piel de rata con lesion con cubierta de su propia piel, 3 días post procedimiento P5AC+: la epidermis prolifera de manera uniforme por debajo de los restos celulares y detritus del coágulo sanguíneo primario, sin zonas con pérdida de la continuidad, presentando estrato basal y una o dos capas adicionales del siguiente estrato además del córneo. En dermis superficial se observa infiltrado inflamatorio de crónico moderado, vasos sanguíneos congestivos, hemorragia y edema leves. A los 7 días P5BC+: Hay regeneración de la epidermis con heterogeneidad en el espesor de los estratos intermedios, escaso infiltrado inflamatorio crónico. A los 14 días P5CC+: Epidermis ligeramente hipotrófica casi regenerada, engrosamiento parcial de la dermis por fascículos de colágena proliferados y la presencia de vasos de neoformación dispersos e infiltrado inflamatorio ausente.

Piel de rata con lesion sin cubierta cutánea, 3 días post procedimiento P5AC-: la epidermis no presenta pérdida de la continuidad formando ondulaciones irregulares, observándose zonas en las que sólo prevalece la capa de células basales y una o dos capas de estratos superiores. La colágena está organizada en fascículos, los anexos cutáneos múltiples presentes, escasos vasos sanguíneos congestivos hemorragia, edema e infiltrado inflamatorio crónico escaso. A los 7 días P5BC+: Existe regeneración de la epidermis con espesor muy irregular de los estratos intermedios y moderado infiltrado inflamatorio crónico. A los 14 días P5CC+: Epidermis con regeneración hipertrófica, engrosamiento de la dermis a expensas de fascículos de colágena proliferados y vasos de neoformación e infiltrado inflamatorio presente.

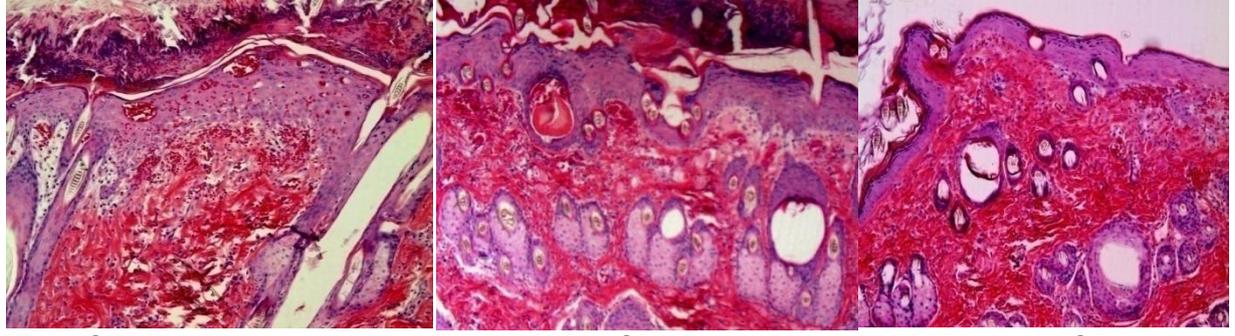
A continuación se presentan las zonas más representativas de lo descrito anteriormente en la siguiente composición fotográfica.



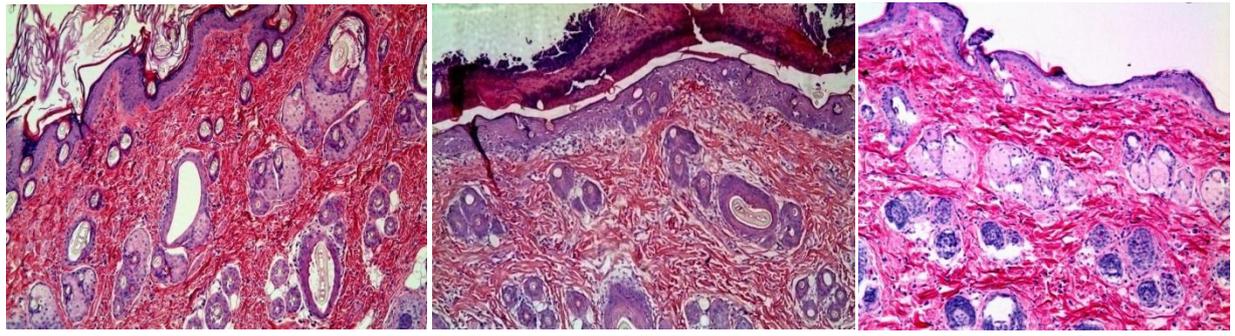
P1AL H&E 10X                      P1AC+ H&E 10X                      P1AC-                      H&E                      10X



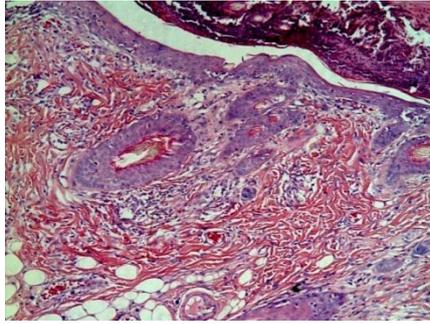
P2AL H&E 10X                      P2AC+ H&E 10X                      P2AC-                      H&E                      10X



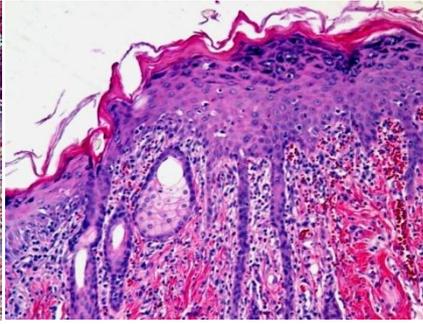
P3AL H&E 10X                      P3AC+ H&E 10X                      P3AC-                      H&E                      10X



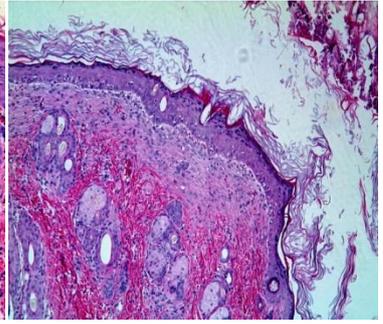
P4AL H&E 4X                      P4AC+ H&E 10X1                      P4AC-                      H&E                      10X



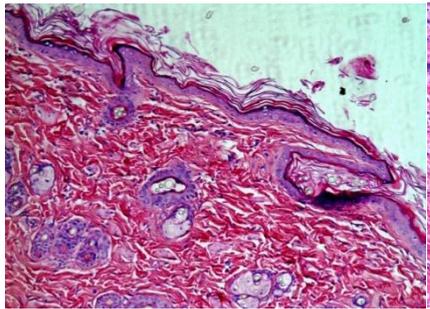
P5AL H&E 10X



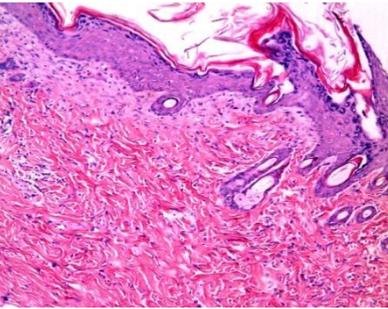
P5AC+ H&E 10X



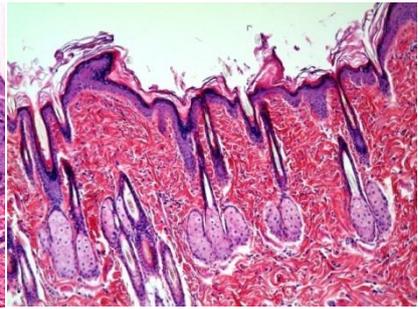
P5AC- H&E 10X



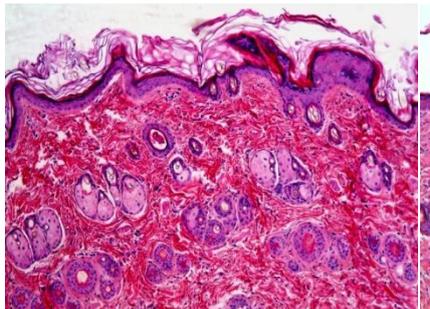
P1BL H&E 10X



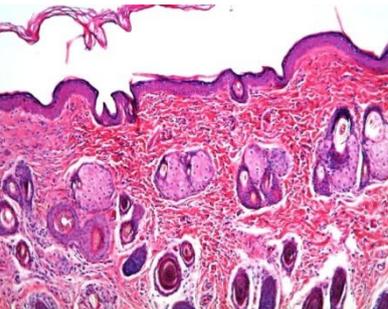
P1BC+ H&E 10X



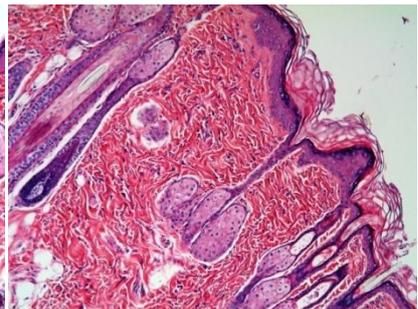
P1BC- H&E 10X



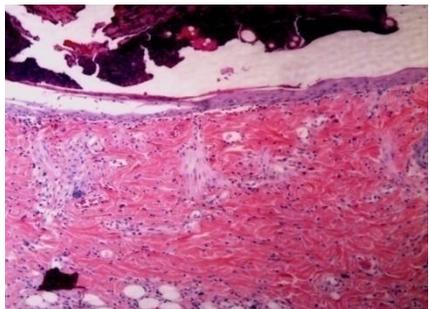
P2BL H&E 10X



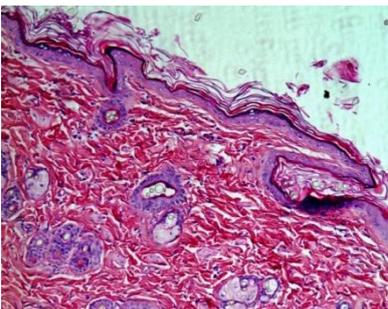
P2CC+ H&E 10X



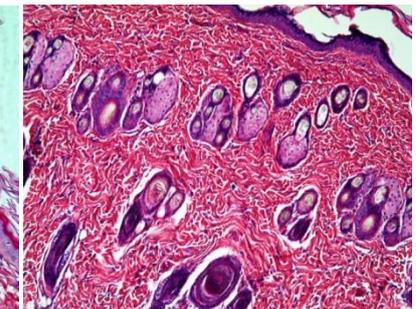
P2AC-H&E 10X



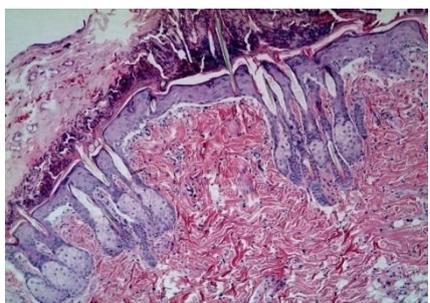
P1AL H&E 10X



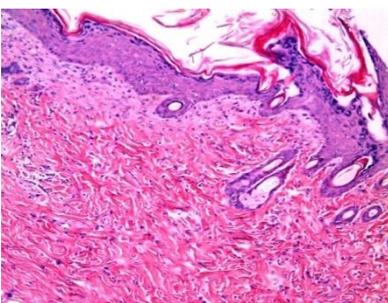
P1BL H&E 10X



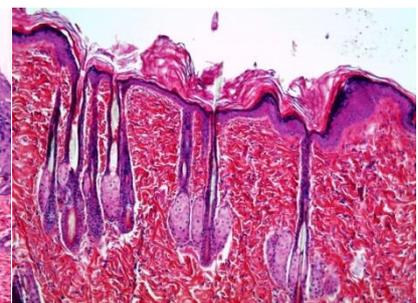
P1CL H&E 10X



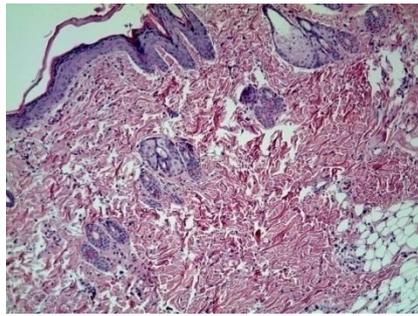
P1AC+ H&E 10X



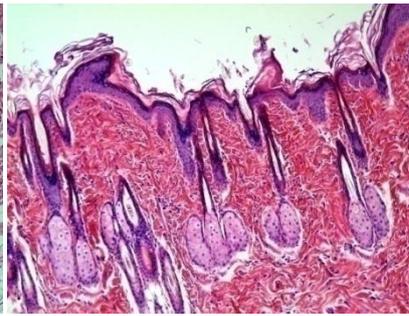
P1BC+ H&E 10X



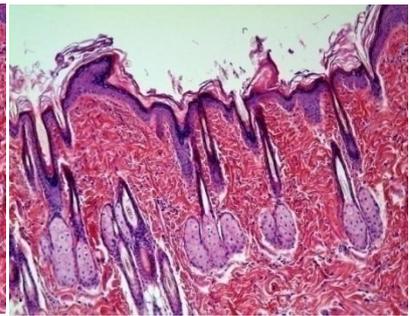
P1CC+ H&E 10X



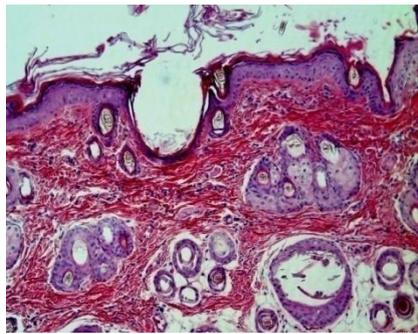
P1AC- H&E 10X



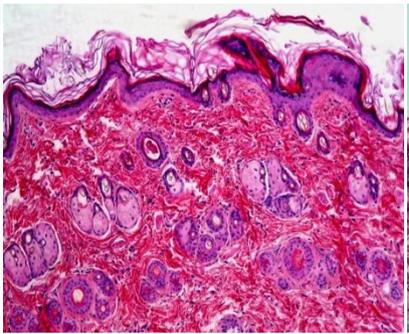
P1BC- H&E 10X



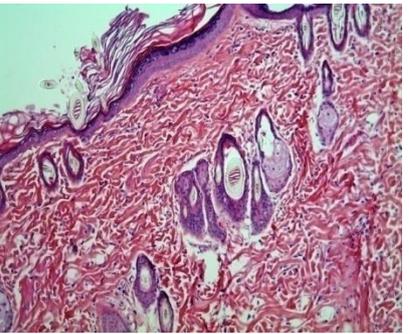
P1CC- H&E 10X



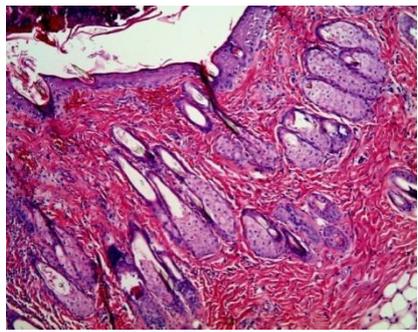
P2AL H&E 10X



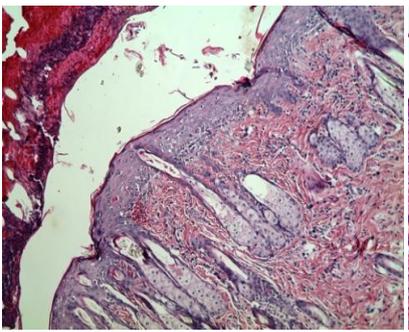
P2BL H&E 10X



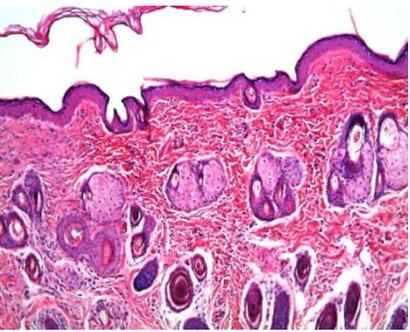
P2CL H&E 10X



P2AC+ H&E 10X



P2BC+ H&E 10X



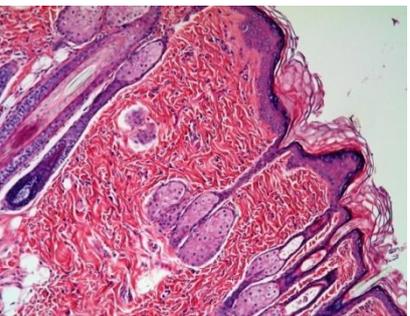
P2CC+ H&E 10X



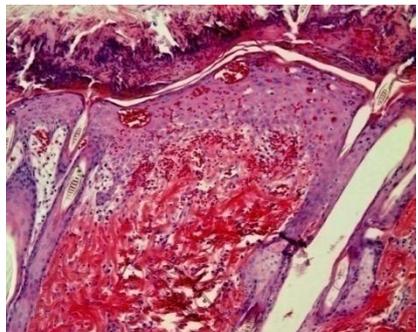
P2AC- H&E 10X



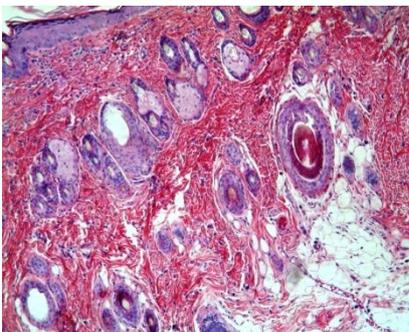
P2BC- H&E 10X



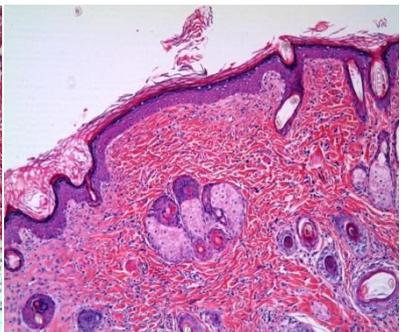
P2CC- H&E 10X



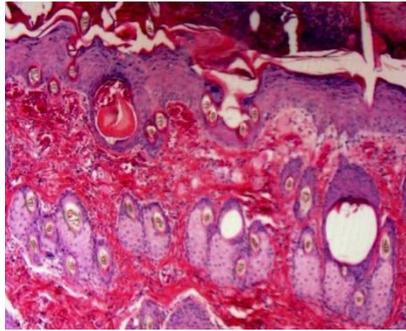
P3AL H&E 10X



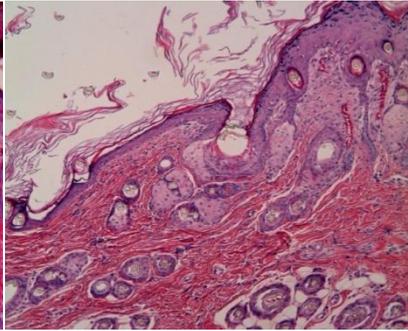
P3BL H&E 10X



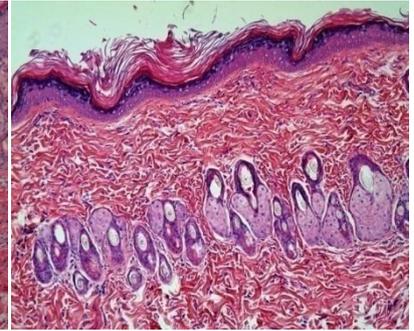
P3CL H&E 10X



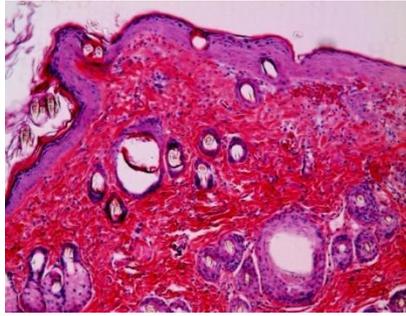
P3AC+ H&E 10X



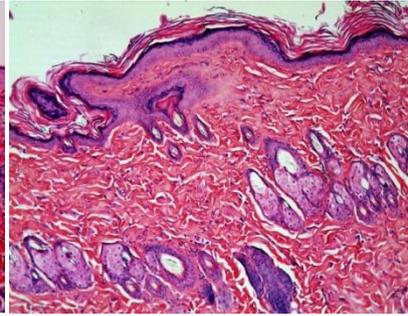
P3BC+ H&E 10X



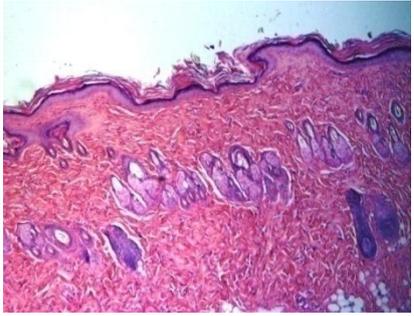
P3CC+ H&E 10X



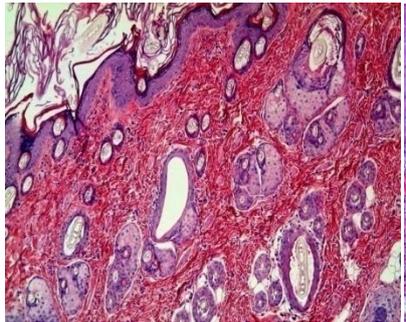
P3AC- H&E 10X



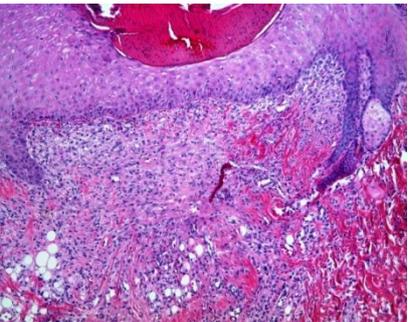
P3BC- H&E 10X



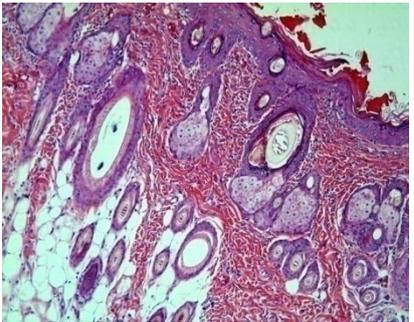
P3CC- H&E 10X



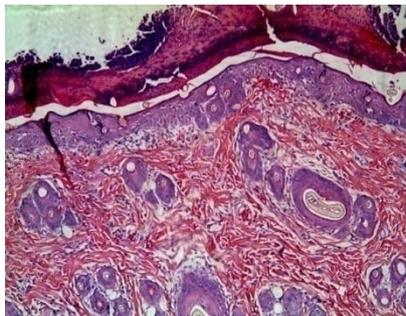
P4AL H&E 10X



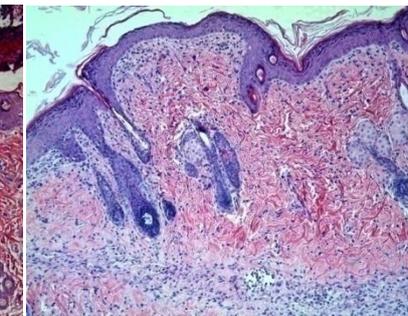
P4BL H&E 10X



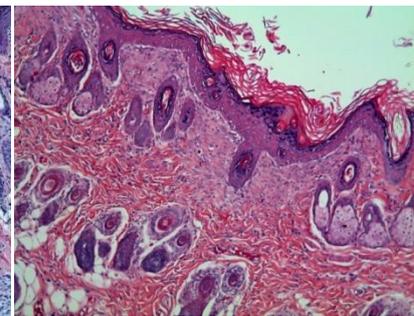
P4CL H&E 10X



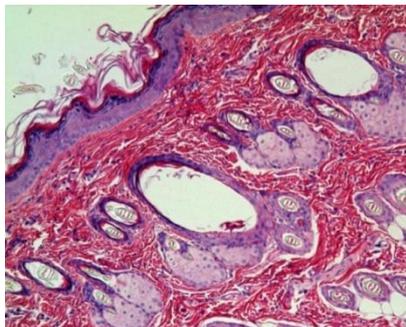
P4AC+ H&E 10X



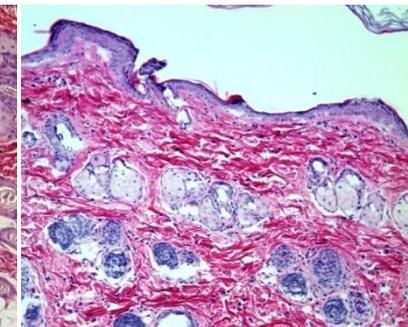
P4BC+ H&E 10X



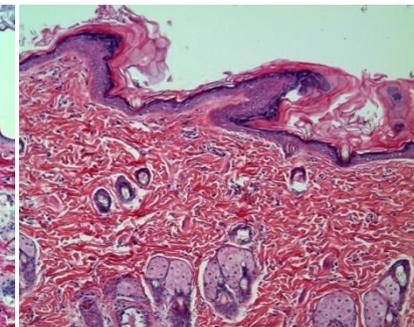
P4CC+ H&E 10X



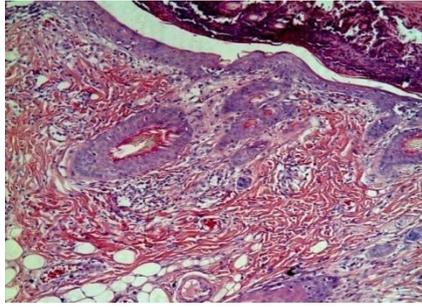
P4AC- H&E 10X



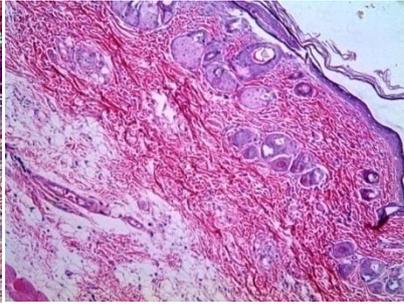
P4BC- H&E 10X



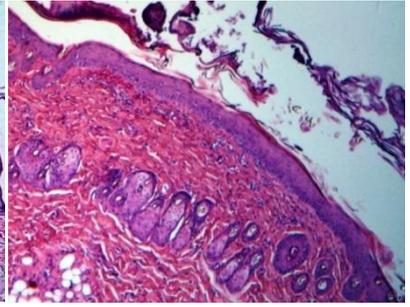
P4CC- H&E 10X



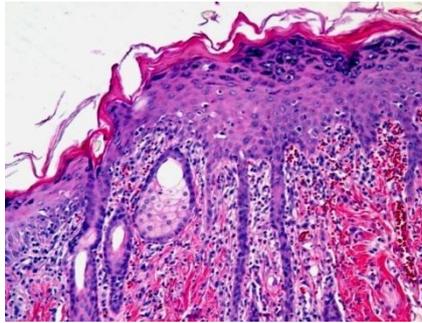
P5AL H&E 10X



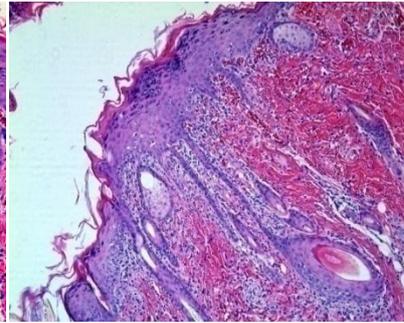
P5BL H&E 10X



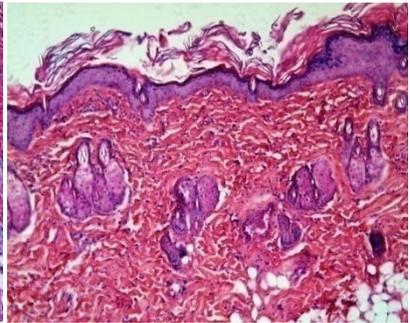
P5CL H&E 10X



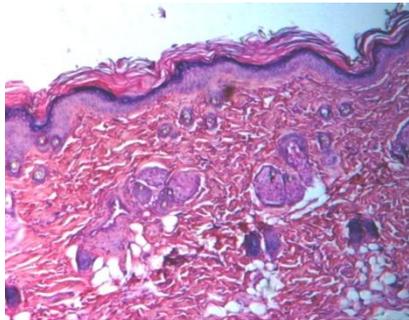
P5AC+ H&E 10X



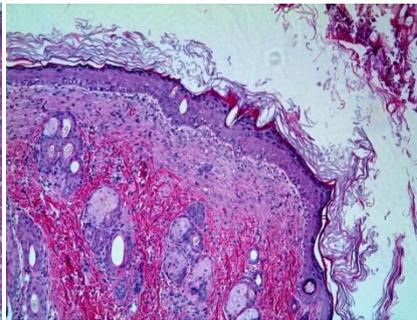
P5BC+ H&E 10X



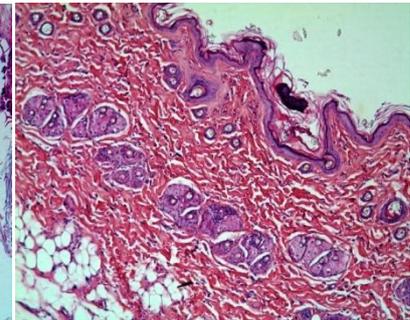
P5CC+ H&E 10X



P5AC- H&E 10X



P5BC- H&E 10X



P5CC- H&E 10X

Los hallazgos histológicos, se codifican, compilan, analizan y tabulan mediante el programa SPSS 16.0 y son presentados a continuación mediante tablas y gráficas.

**Tipo de Muestra Vs Número de Capas Celulares Estratos Intermedios de la Epidermis Vs Uniformidad del Espesor de la Epidermis**

			Número de Capas Celulares Estratos Intermedios de la Epidermis			Total
			DOS CAPAS CELULARES	TRES CAPAS CEULARES	4 Ó MÁS CAPAS CELULARES	
Uniformidad del Espesor de la Epidermis						
SUPERFICIE IRREGULAR	Tipo de Muestra:	Cubierta	0	2	4	6
		Cadáver				
		Autoinjerto	0	3	5	8
		Libre Evolución	2	6	6	14
Total			2	11	15	28
SUPERFICIE UNIFORME	Tipo de Muestra	Cubierta	2	3	4	9
		Cadáver				
		Autoinjerto	0	2	5	7
		Libre Evolución	0	1	0	1
Total			2	6	9	17

<b>Tipo de Muestra Vs Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo</b>		Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo			Total
		AGUDO LEVE: 11-20 CELS INFL. AGUDAS X 10CAP	AGUDO MODERADO: 21-40 CELS INFL. AGUDAS X 10CAP	AGUDO ABUNDANTE: >41 CELS INFL. AGUDAS X 10CAP	
Tipo de Muestra:	Cubierta Cadáver	6	6	3	15
	Autoinjerto	6	9	0	15
	Libre Evolución	4	6	5	15
Total		16	21	8	45
<b>Tipo de Muestra Vs Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico</b>		Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico			Total
		NULO: <10 CELS INFL. CRÓNICAS X 10CAP	CRONICO LEVE: 11-20 CELS INFL. CRÓNICAS X 10CAP	CRÓNICO MODERADO: 21-40 CELS INFL. CRÓNICAS X 10CAP	
Tipo de Muestra:	Cubierta Cadáver	1	7	7	15
	Autoinjerto	1	7	7	15
	Libre Evolución	0	7	8	15
Total		2	21	22	45

**Tipo de Muestra Vs Uniformidad del Espesor de la Epidermis Vs Número de Días Desde Intervención en la Piel de las Ratas**

Número de Días Desde la Intervención en la Piel de las Ratas.			Uniformidad del Espesor de la Epidermis		Total
			SUPERFICIE IRREGULAR	SUPERFICIE UNIFORME	
3 DÍAS	Tipo de Muestra:	Cubierta Cadáver	3	2	5
		Autoinjerto	4	1	5
		Libre Evolución	4	1	5
		Total	11	4	15
7<DÍAS	Tipo de Muestra:	Cubierta Cadáver	3	2	5
		Autoinjerto	3	2	5
		Libre Evolución	5	0	5
		Total	11	4	15
14 DIAS	Tipo de Muestra:	Cubierta Cadáver	0	5	5
		Autoinjerto	1	4	5
		Libre Evolución	5	0	5
		Total	6	9	15

**Tipo de Muestra Vs Proliferación de Fascículos Colágena en Dermis Vs Número de Días Desde Intervención en la Piel de las Ratas**

			Proliferación de Fascículos Colágena en Dermis			Total
			PROLIFERACION NULA: 0-20% DE LA DERMIS OCUPADA.	PROLIFERACIÓN LEVE: 21-30% DE LA DERMIS OCUPADA.	PROLIFERACIÓN MODERADA: 31-50% DE LA DERMIS OCUPADA.	
<b>Número de Días Desde Intervención en la Piel de las Ratas</b>						
3 DÍAS	Tipo de Muestra:	Cubierta				
		Cadáver	3	2	-	5
		Autoinjerto	3	2	-	5
		Libre Evolución	3	2	-	5
Total			9	6	-	15
7<DÍAS	Tipo de Muestra:	Cubierta				
		Cadáver	-	5	0	5
		Autoinjerto	-	5	0	5
		Libre Evolución	-	4	1	5
Total			-	14	1	15
14 DIAS	Tipo de Muestra:	Cubierta				
		Cadáver	-	5	0	5
		Autoinjerto	-	4	1	5
		Libre Evolución	-	2	3	5
Total			-	11	4	15

**Número de Días Desde Intervención en la Piel de las Ratas Vs Tipo de Muestra Vs  
Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo**

Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo		Tipo de Muestra.			Total
		Cubierta Cadáver	Autoinjerto	Libre Evolución	
AGUDO LEVE: 11- 20 CELS INFL. AGUDAS X 10CAP	7<DÍAS	1	2	0	3
	14 DIAS	5	4	4	13
Total		6	6	4	16
AGUDO MODERADO: 21-40 CELS INFL. AGUDAS X 10CAP	3 DÍAS	2	5	2	9
	7<DÍAS	4	3	4	11
	14 DIAS	0	1	0	1
Total		6	9	6	21
AGUDO ABUNDANTE: >41 CELS INFL. AGUDAS X 10CAP	3 DÍAS	3		3	6
	7<DÍAS	0		1	1
	14 DIAS	0		1	1
Total		3		5	8

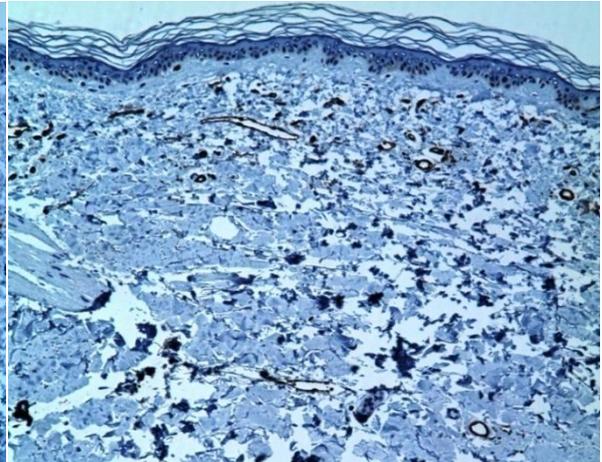
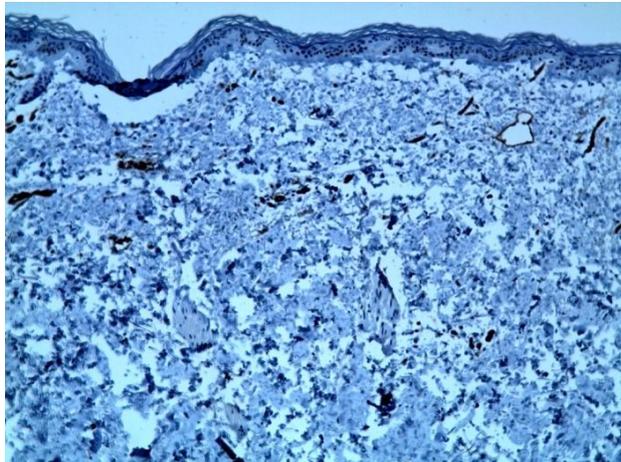
**Número de Días Desde la Intervención de la Piel de las Ratas Vs Tipo de Muestra Vs Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico**

Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico		Tipo de Muestra:			Total
		Cubierta Cadáver	Autoinjerto	Libre Evolución	
NULO: <10 CELS	14 DIAS	1	1		2
INFL. CRÓNICAS X					
10CAP	Total	1	1		2
CRÓNICO LEVE:	3 DÍAS	2	1	0	3
11-20 CELS INFL.					
CRÓNICAS X	7<DÍAS	2	2	2	6
10CAP					
	14 DIAS	3	4	5	12
	Total	7	7	7	21
CRÓNICO	3 DÍAS	3	4	5	12
MODERADO: 21-40					
CELS INFL.	7<DÍAS	3	3	3	9
CRÓNICAS X					
10CAP	14 DIAS	1	0	0	1
	Total	7	7	8	22

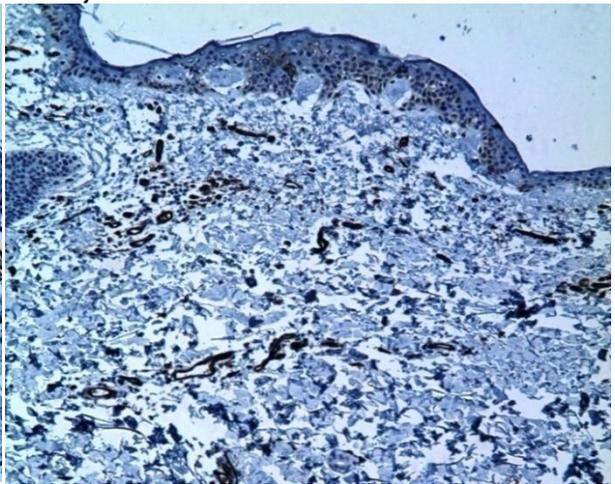
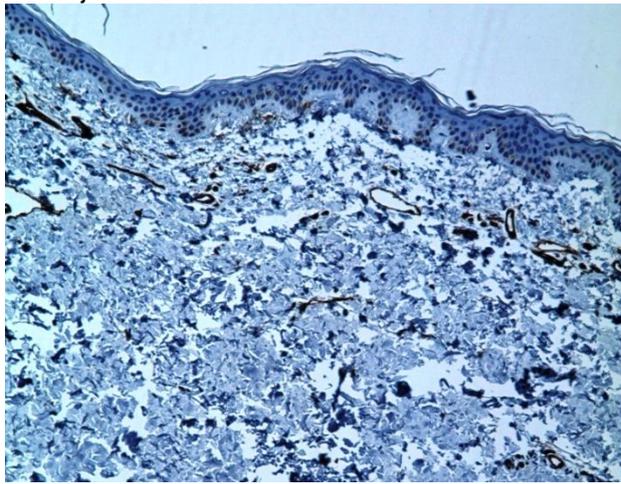
**Remanentes Tisulares de la Cicatrización Primaria Vs Número de Capas Celulares Estratos Intermedios de la Epidermis Vs Uniformidad del Espesor de la Epidermis**

		Número de Capas Celulares Estratos Intermedios de la Epidermis			Total
		DOS CAPAS CELULARES	TRES CAPAS CEULARES	4 Ó MÁS CAPAS CELULARES	
Uniformidad del Espesor de la Epidermis					
SUPERFICIE IRREGULAR	SIN REMANENTES TISULARES	0	2	6	8
	ESCASOS REMANENTES TISULARES	1	6	5	12
	ABUNDANTES REMANENTES TISULARES	1	3	4	8
	Total	2	11	15	28
SUPERFICIE UNIFORME	SIN REMANENTES TISULARES	0	3	6	9
	ESCASOS REMANENTES TISULARES	0	0	2	2
	ABUNDANTES REMANENTES TISULARES	2	3	1	6
	Total	2	6	9	17

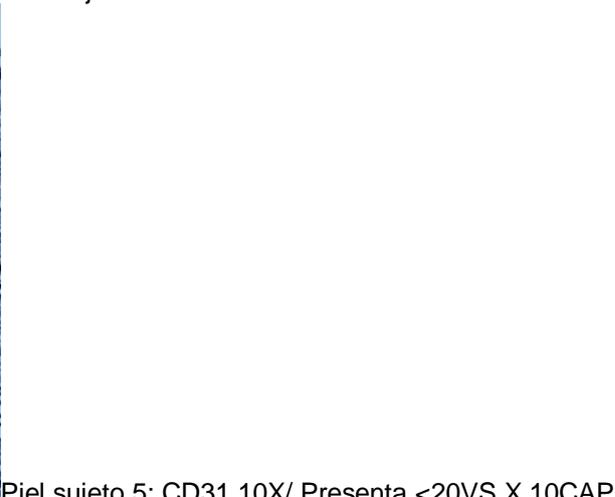
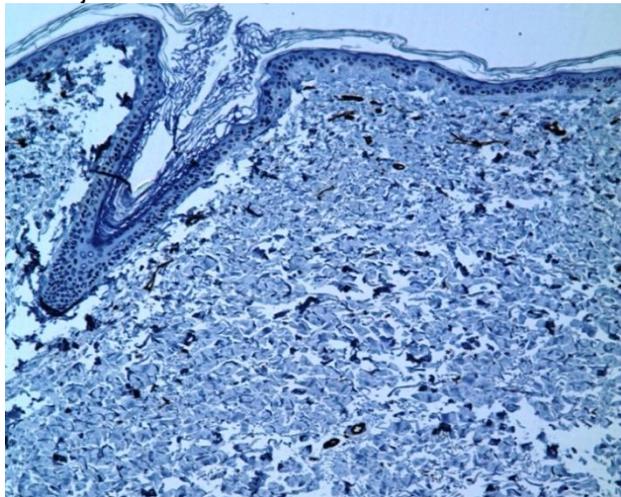
**Fase 9:** Se realiza tinción por inmunohistoquímica CD 31 la cual marca entre otras las células endoteliales de vasos de neoformación presentes en procesos de regeneración. Con la finalidad de establecer un método para cuantificar la proliferación de vasos sanguíneos, se cuentan los vasos sanguíneos marcados con el antígeno CD31 presentes en 10 campos de alto poder (CAP) con el objetivo seco fuerte ó 40X. Posteriormente se realiza un análisis de los resultados, que se tabulan en tablas para la consulta más práctica.



Piel sujeto1: CD31 10X/ Presenta <20VS X 10CAP Piel sujeto 2: CD31 10X/ Presenta<20VS X 10CAP

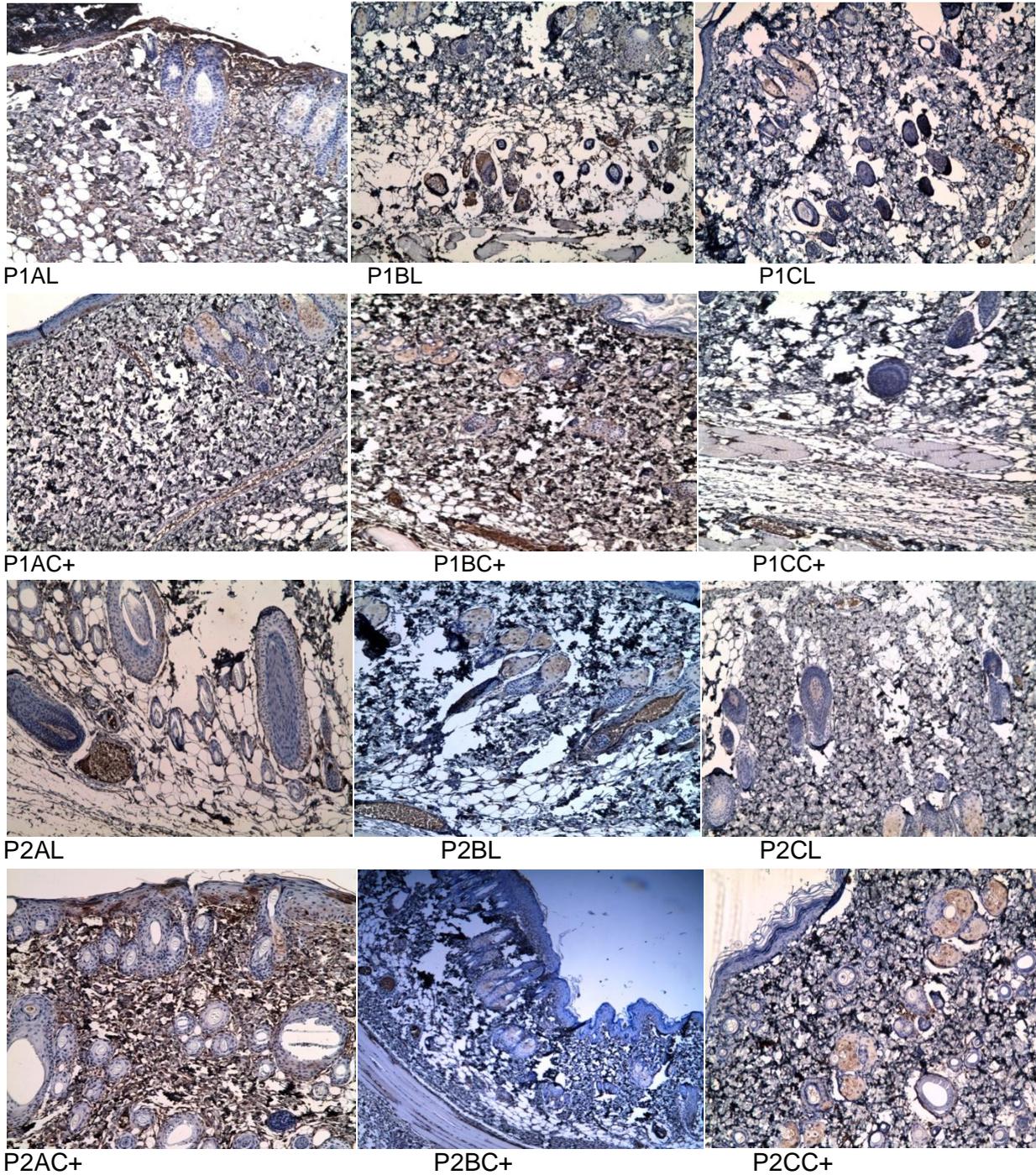


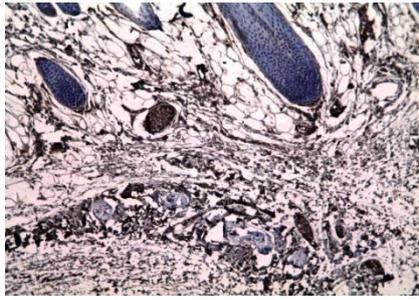
Piel sujeto 3: CD31 10X/ Presenta<20VS X 10CAP Piel sujeto 4: CD31 10X/ Presenta<20VS X 10CAP



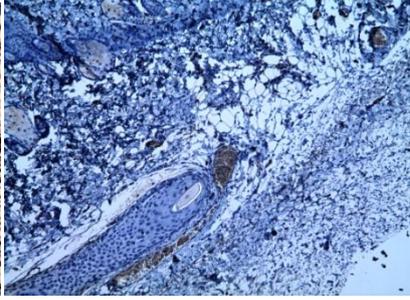
Piel sujeto 5: CD31 10X/ Presenta <20VS X 10CAP

Los campos más representativos de cada una de las pieles de roedor con marcaje para CD31 se presentan en la siguiente composición fotográfica, en donde la "P" y el número que le sigue del 1 al 5 se refiere al número de cadáver, la letra siguiente de la "A" a la "C" se refiere al tiempo entre la aplicación del injerto hasta el día en que se sacrificó al animal de laboratorio para obtener el tejido presentado (piel), A=3 días, B=7 días, C=14 días. Y por último, L= Cubierta cadavérica, C+= Autoinjerto y C-= Libre evolución sin cubierta.

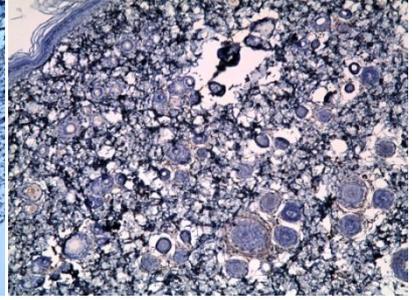




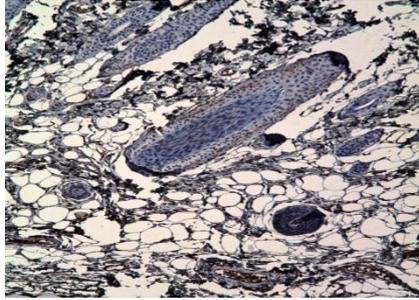
P2AC-



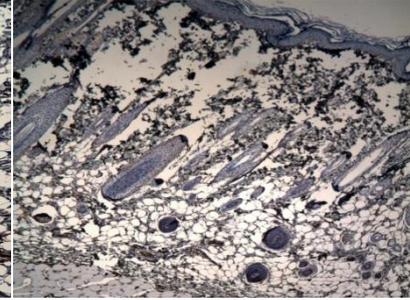
P2BC-



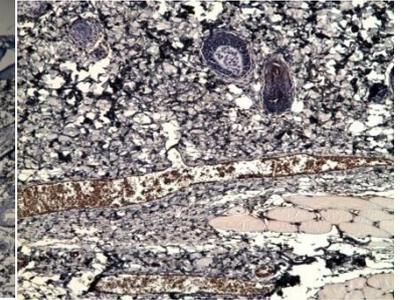
P2CC-



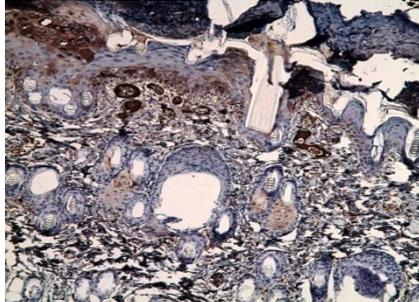
P3AL



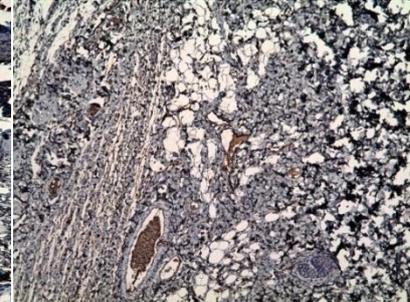
P3BL



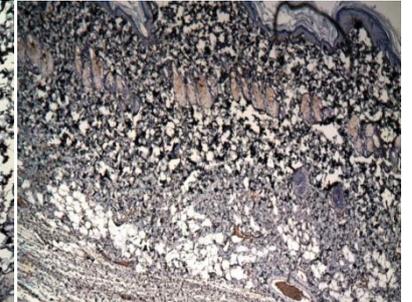
P3CL



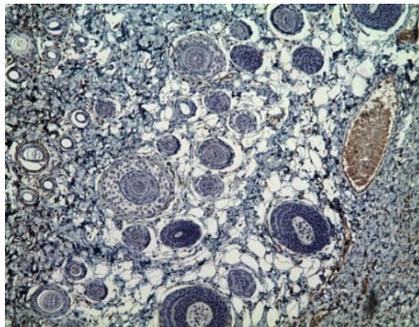
P3AC+



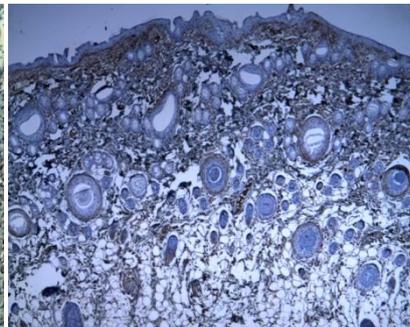
P3BC+



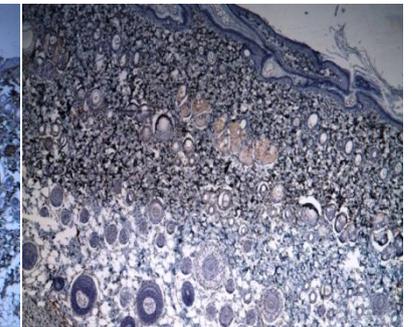
P3CC+



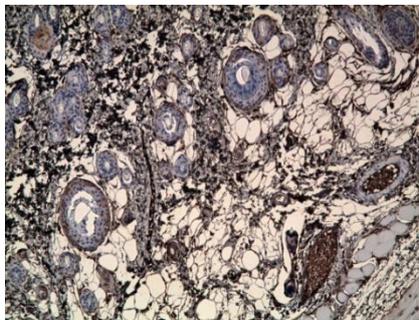
P3AC-



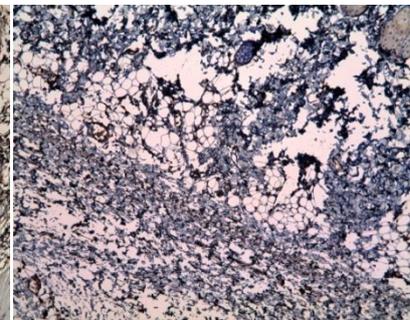
P3BC-



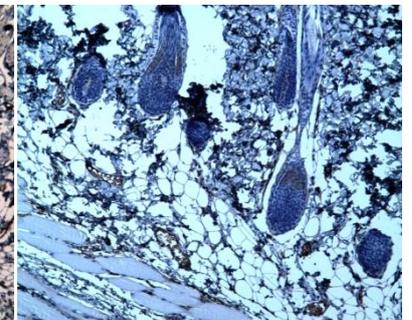
P3CC-



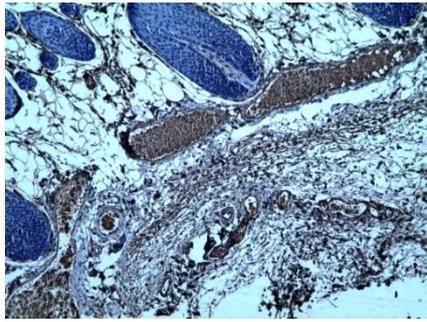
P4AL



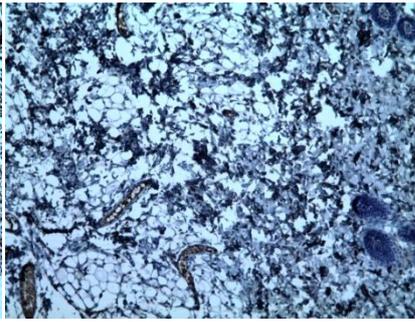
P4BL



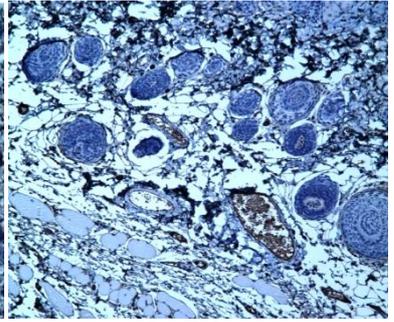
P4CL



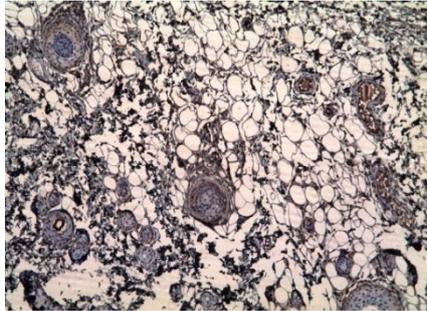
P4AC+



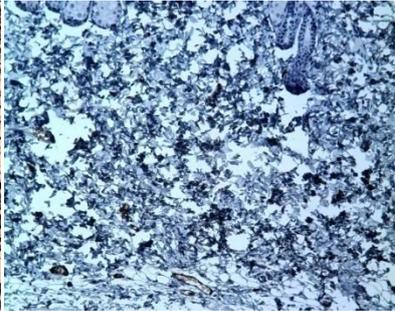
P4BC+



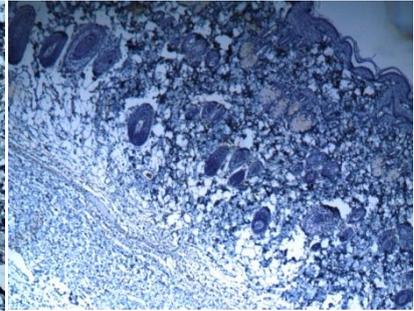
P4CC+



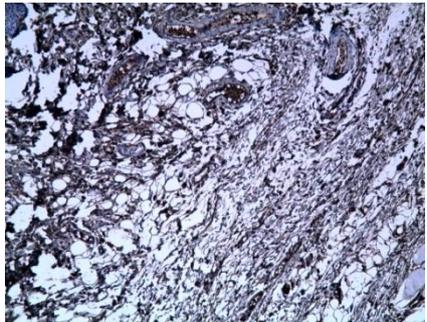
P4AC-



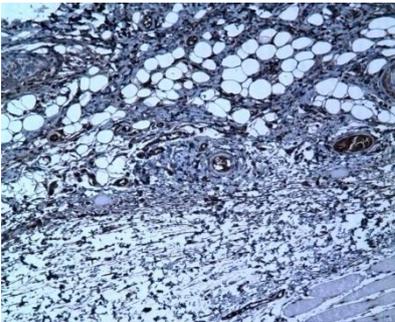
P4BC-



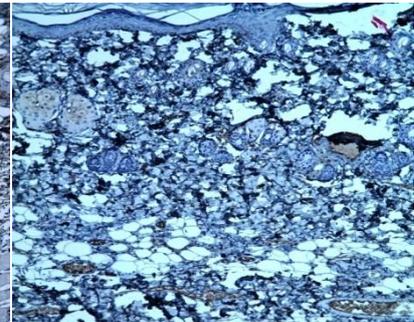
P4CC-



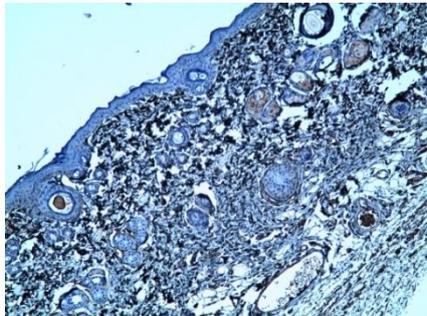
P5AL



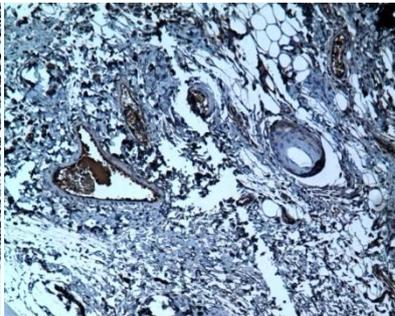
P5BL



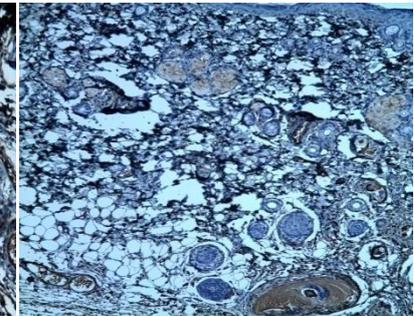
P5CL



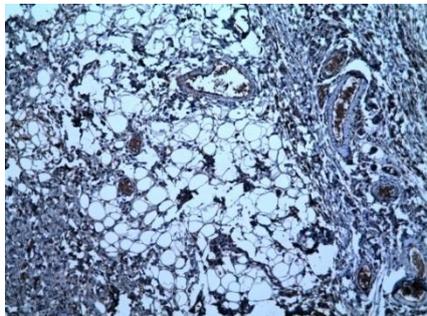
P5AC+



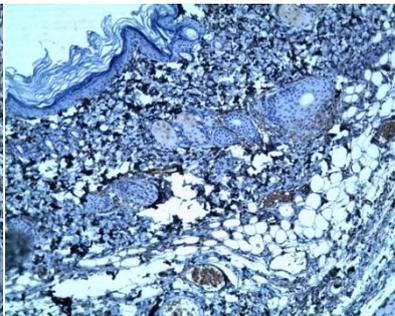
P5BC+



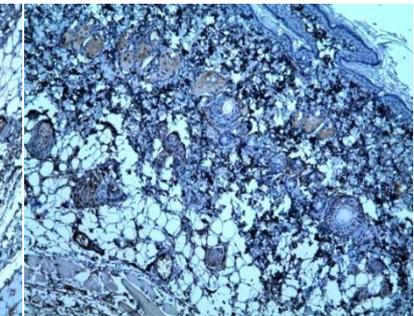
P5CC+



P5AC-



P5BC-



P5CC-

La cuantificación de los vasos sanguíneos de neoformación marcados con CD31 se dispone en la siguiente tabla cruzada con diferentes variables.

Tipo de Muestra Vs Proliferación de V.S. de Neoformación (CD31).		Proliferación de V.S de Neoformación (CD31)			Total
		0-5 VASOS DE NEOFORMACIÓN N X 10 CAP.	6-10 VASOS DE NEOFORMACIÓN N X 10 CAP	11 A 20 VASOS DE NEOFORMACIÓN N X 10 CAP	
Tipo de Muestra.	Cubierta Cadáver	6	6	3	15
	Autoinjerto	6	9	0	15
	Libre Evolución	7	8	0	15
Total		19	23	3	45

Número de Días Desde Intervención en la Piel de las Ratas Vs Proliferación de V.S de Neoformación ( CD31)		Proliferación de V.S de Neoformación ( CD31)			Total
		0-5 VASOS DE NEOFORMACIÓN X 10 CAP.	6-10 VASOS DE NEOFORMACIÓN X 10 CAP	11 A 20 VASOS DE NEOFORMACIÓN X 10 CAP	
Número de Días Desde Intervención en la Piel de las Ratas	3 DÍAS	10	5	0	15
	7<DÍAS	1	11	3	15
	14 DIAS	8	7	0	15
Total		19	23	3	45

## ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

La información recabada de los procedimientos llevados a cabo en éste protocolo y que fue codificada y analizada se somete a diversas pruebas estadísticas mediante el programa SPSS 16.0, con el fin de establecer la significancia real de lo realizado. Los datos se presentan en las siguientes tablas. Las comparativas se realizaron en base a 3 grupos principales: Cubierta Cadáver, Autoinjerto y Libre Evolución.

ANOVA

		Suma de Cuadrados	df	Media Cuadrada	F	Sig.
Uniformidad del Espesor de la Epidermis	Entre Grupos	2.311	2	1.156	5.871	.006
	Dentro del Grupo	8.267	42	.197		
	Total	10.578	44			
Número de Capas Celulares Estratos Intermedios de la Epidermis	Entre Grupos	1.244	2	.622	1.463	.243
	Dentro del Grupo	17.867	42	.425		
	Total	19.111	44			
Remanentes Tisulares de la Cicatrización Primaria	Entre Grupos	.933	2	.467	.656	.524
	Dentro del Grupo	29.867	42	.711		
	Total	30.800	44			
Presencia de Vasos Congestivos	Entre Grupos	.044	2	.022	.113	.894
	Dentro del Grupo	8.267	42	.197		
	Total	8.311	44			
Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo	Entre Grupos	1.644	2	.822	1.650	.204
	Dentro del Grupo	20.933	42	.498		
	Total	22.578	44			
Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico	Entre Grupos	.178	2	.089	.250	.780
	Dentro del Grupo	14.933	42	.356		
	Total	15.111	44			
Proliferación de Fasciculos Colágena en Dermis	Entre Grupos	.578	2	.289	.929	.403
	Dentro del Grupo	13.067	42	.311		
	Total	13.644	44			
Proliferación de V.S de Neoformación ( CD31)	Entre Grupos	.578	2	.289	.771	.469
	Dentro del Grupo	15.733	42	.375		
	Total	16.311	44			

**MEDICIONES DIRECCIONALES**

			Valor	Estad. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.	
Nominal por Nominal	Lambda	Simétricas	.103	.107	.935	.350	
		Remanentes					
		Tisulares de la Cicatrización Primaria Dependiente	.071	.119	.580	.562	
	Goodman y Kruskal tau	Tipo de Muestra. Dependiente		.133	.139	.902	.367
			Remanentes				
			Tisulares de la Cicatrización Primaria Dependiente	.031	.036		.600 <sup>c</sup>
			Tipo de Muestra. Dependiente	.033	.038		.573 <sup>c</sup>
Ordinal por Ordinal	Somers' d	Simétricas	-.141	.133	-1.060	.289	
		Remanentes					
		Tisulares de la Cicatrización Primaria Dependiente	-.141	.133	-1.060	.289	
		Tipo de Muestra. Dependiente	-.141	.133	-1.060	.289	

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on chi-square approximation

### Mediciones Direccionales

			Valores	Estad. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Nominal por Nominal	Lambda	Simétricas	.024	.116	.209	.835
		Presencia de Vasos Congestivos. Dependiente	.000	.000	. <sup>c</sup>	. <sup>c</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.033	.157	.209	.835
	Goodman y Kruskal tau	Presencia de Vasos Congestivos. Dependiente	.005	.021		.889 <sup>d</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.003	.010		.889 <sup>d</sup>
Ordinal por Ordinal	Somers' d	Simétricas	.057	.132	.433	.665
		Presencia de Vasos Congestivos. Dependiente	.044	.103	.433	.665
		Tipo de Muestra. Dependiente	.080	.185	.433	.665

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Cannot be computed because the asymptotic standard error equals zero.

d. Based on chi-square approximation

**Mediciones Direccionales**

			Valores	Estad. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Nominal por Nominal	Lambda		.093	.122	.734	.463
		Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo. Dependiente	.000	.144	.000	1.000
		Tipo de Muestra. Dependiente	.167	.146	1.055	.291
	Goodman y Kruskal tau	Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo. Dependiente	.051	.034		.348 <sup>c</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.068	.035		.201 <sup>c</sup>
Ordinal por Ordinal	Somers' d	Simétricas	.138	.147	.933	.351
		Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo. Dependiente	.133	.143	.933	.351
		Tipo de Muestra. Dependiente	.142	.152	.933	.351

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on chi-square approximation

### Mediciones Direccionales

			Valores	Estd. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Nominal por Nominal	Lambda	Simétricas	.019	.141	.132	.895
		Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico Dependiente	.000	.230	.000	1.000
		Tipo de Muestra. Dependiente	.033	.127	.258	.796
Ordinal por Ordinal	Somers' d	Simétricas	.072	.134	.537	.591
		Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico Dependiente	.065	.121	.537	.591
		Goodman y Kruskal tau				
		Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico Dependiente	.004	.009		.988 <sup>c</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.012	.007		.900 <sup>c</sup>

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on chi-square approximation

**MEDICIONES DIRECCIONALES**

			Valor	Estad. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Nominal por Nominal	Lambda	Simétricas	.091	.040	2.095	.036
		Proliferación de Fascículos Colágena en Dermis Dependiente	.000	.000	. <sup>c</sup>	. <sup>c</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.133	.062	2.095	.036
	Goodman y Kruskal tau	Proliferación de Fascículos Colágena en Dermis Dependiente	.054	.050		.311 <sup>d</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.067	.041		.206 <sup>d</sup>
Ordinal por Ordinal	Somers' d	Simétricas	.166	.136	1.200	.230
		Proliferación de Fascículos Colágena en Dermis Dependientes	.142	.119	1.200	.230
		Tipo de Muestra. Dependiente	.200	.161	1.200	.230

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Cannot be computed because the asymptotic standard error equals zero.

d. Based on chi-square approximation

**Mediciones direccionales**

			Valores	Estad. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Nominal por Nominal	Lambda	Simétricas	.077	.117	.635	.525
		Proliferación de V.S de Neoformación ( CD31) Dependiente	.000	.157	.000	1.000
		Tipo de Muestra. Dependiente	.133	.164	.761	.447
Goodman y Kruskal tau		Proliferación de V.S de Neoformación ( CD31) Dependiente	.030	.031		.617 <sup>c</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.075	.018		.161 <sup>c</sup>
Ordinal por Ordinal	Somers' d	Simétricas	-.131	.142	-.910	.363
		Proliferación de V.S de Neoformación ( CD31) Dependiente	-.120	.132	-.910	.363
		Tipo de Muestra. Dependiente	-.144	.154	-.910	.363

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on chi-square approximation

**MEDICIONES DIRECCIONALES**

			Valores	Estad. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Nominal por Nominal	Lambda	Simétricas	.000	.000	. <sup>c</sup>	. <sup>c</sup>
		Número de Días desde la Intervención de la piel de las Ratas. Dependiente	.000	.000	. <sup>c</sup>	. <sup>c</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.000	.000	. <sup>c</sup>	. <sup>c</sup>
	Goodman and Kruskal tau	Número de Días desde la Intervención de la piel de las Ratas. Dependiente	.000	.000		1.000 <sup>d</sup>
		Tipo de Muestra . Dependiente	.000	.000		1.000 <sup>d</sup>
Ordinal by Ordinal	Somers' d	Simétricas	.000	.133	.000	1.000
		Número de Días desde la Intervención de la piel de las Ratas. Dependiente	.000	.133	.000	1.000
		Tipo de Muestra. Dependiente	.000	.133	.000	1.000

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Cannot be computed because the asymptotic standard error equals zero.

d. Based on chi-square approximation

**MEDICIONES DIRECCIONALES**

			Valores	Estad. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Nominal por Nominal	Lambda	Simétricas	.234	.134	1.652	.098
		Uniformidad del Espesor de la Epidermis. Dependiente	.176	.207	.780	.436
		Tipo de Muestra: Injerto, Control+, Control- Dependiente	.267	.128	1.856	.063
	Goodman y Kruskal tau	Uniformidad del Espesor de la Epidermis. Dependiente	.218	.096		.008 <sup>c</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.109	.054		.008 <sup>c</sup>
Ordinal por Ordinal	Somers' d	Simétricas	-.417	.111	-3.635	.000
		Uniformidad del Espesor de la Epidermis. Dependiente	-.356	.098	-3.635	.000
		Tipo de Muestra. Dependiente	-.504	.133	-3.635	.000

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on chi-square approximation

**MEDICIONES DIRECCIONALES**

			Valor	Estad. Error <sup>a</sup>	Aprox. T <sup>b</sup>	Aprox. Sig.
Nominal por Nominal	Lambda	Simétricas	.098	.142	.666	.506
		Número de Capas Celulares Estratos Intermedios de la Epidermis. Dependiente	.048	.168	.278	.781
		Tipo de Muestra. Dependiente	.133	.170	.735	.463
	Goodman y Kruskal tau	Número de Capas Celulares Estratos Intermedios de la Epidermis. Dependiente	.035	.042		.545 <sup>c</sup>
		Tipo de Muestra. Dependiente	.039	.027		.494 <sup>c</sup>
Ordinal por Ordinal	Somers' d	Simétricos	-.090	.145	-.621	.534
		Número de Capas Celulares Estratos Intermedios de la Epidermis. Dependiente	-.083	.134	-.621	.534
		Tipo de Muestra. Dependiente	-.098	.158	-.621	.534

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on chi-square approximation

## DISCUSION:

**Fase 1:** Las muestras obtenidas de los cadáveres fueron obtenidas bajo todas las medidas posibles apegadas a lo establecido, pese a la modestia de recursos materiales para esta investigación obligo a que el esmero puesto por el recurso humano en la metodología fuera lo más minucioso de éste protocolo.

La piel obtenida de éstos cadáveres reflejan condiciones extremas, pues se trataba de pacientes con enfermedades de larga evolución que han mermado tejidos, aunado a esto, la postración del mismo paciente previo a su fallecimiento se traduce en la atrofia o “adelgazamiento” de la piel en zonas de presión, sin embargo, la zona a muestrear siempre se encontró íntegra, característica indispensable.

**Fase 2:** La microbiología de los tejidos obtenidos presentaron por lo general flora bacteriana propia de la piel, no obstante su comportamiento ante los antibióticos, se considera anormal, presentando un comportamiento patógeno, esto debido a la multiresistencia a antibióticos, pudiendo en dado caso afectar a un paciente inmunodeprimido, situación común en personas con enfermedad de larga evolución.

Un solo resultado presenta crecimiento para *Klebsiella pneumoniae*, que la convierte en la muestra cutánea más “contaminada y contaminante”, no obstante el tratamiento con antibiótico que se le da a la piel más la criopreservación en glicerol permitió sólo en éste estudio la posibilidad de ser aplicada como cubierta cutánea.

La presencia de patógenos no será ajena a los cuerpos con isquemia prolongada. Los mecanismos de descomposición y la interrupción de los mecanismos inmunes tras la muerte propician la proliferación de algunos de los patógenos propios de la piel, que por los sistemas antes mencionados no se comportan de manera agresiva pues siempre se mantendrán en control.

Las infecciones y sobreinfecciones nosocomiales, propiciarán además la existencia de agentes que de manera normal están ausentes.

Los bancos de órganos y tejidos manejan estándares muy estrictos en los cuales los agentes que pueden representar un peligro aún leve de infección serán desechados aún cuando pudiesen fácilmente ser eliminados, incluso pese al gasto tan importante que representó obtenerlos, esto con el fin de no “holgar” en lo mínimo la seguridad de los tejidos preservados.

La finalidad de realizar el cultivo previo a desinfección y criopreservación será con el fin de probar la eficacia de los mismos mecanismos para eliminar dichos agentes.

**Fase 3:** Mediante el estudio histológico, en ésta etapa del estudio, se observa un cambio mínimo en la estructura del tejido, por ende una tolerancia bastante aceptable al proceso que pudiese parecer agresivo de someter la piel humana a sustancias agresivas como una cantidad importante de antibióticos y a temperaturas tan bajas como  $-70^{\circ}\text{C}$  y menores, no obstante, se corrobora que con la técnica adecuada y el apego estricto al proceso diseñado. Dicho en otras palabras el cuidado a los detalles como el amortiguar el pH de los antibióticos, el tiempo que debe llevarse cada grado centígrado al descender la temperatura, el criopreservante elegido, etc., marca la diferencia entre el éxito y su contraparte en el manejo y conservación de órganos y tejidos.

**Fase 4:** El comportamiento microbiológico de la flora encontrada en el tejido posterior a su desinfección y criopreservación se considera producto de dos factores principales, primero a la

resistencia cada vez mayor de la flora bacteriana nativa a distintos fármacos incluso a procesos como la ultracongelación, que es difícil y segundo la posibilidad de contaminación en el proceso de traslado y siembra, que pese a la minuciosidad de la técnica, es el factor más posible para la presencia de bacterias en los cultivos de la piel en cuestión.

**Fase 5:** La actividad mitocondrial aunque muy escasa, se considera que está presente, esto, pese a la gran cantidad de horas de isquemia que presentó incluso antes de ser obtenida y a los procedimientos a los que fue sometida. Es alentadora la resistencia de éste órgano, que mantiene su metabolismo activo mucho tiempo después de que otros órganos han perecido e incluso comienzan su descomposición y lisis. No obstante a lo obtenido, la piel no tiene la suficiente actividad mitocondrial para comportarse como un injerto en caso de ser esto posible y necesario, no obstante, si lo es para usarse como cubierta cutánea temporal.

Cabe mencionar que el análisis estadístico debe tomarse con reservas debido al tamaño de la muestra y que el estándar para comparar la actividad mitocondrial fue en base a los establecido en la literatura, pues por fines éticos y de logística, no se pudo conseguir piel humana sin isquemia o de minutos de isquemia para tener una línea base propia, que pudo ser más útil para este ensayo. Los estudios realizados previamente por otros autores nos fueron de gran provecho dar significado a nuestros resultados y pese a que desafortunadamente sólo pudo compararse con dichas fuentes la densidad óptica obtenida en el nuestro ensayo MTT, es un análisis válido.

**Fase 6 a la 8:** La histología de cada una de las situaciones de la piel de roedor (Cubierta cadavérica, autoinjerto y lesión a libre evolución) fue revisada y analizada, de las cuales se obtuvieron las variables pueden representar el comportamiento de la cubierta cutánea cadavérica y así poder ser comparada entre los distintos grupos representativos de los distintos cadáveres, tiempos y situaciones ya establecidas en la metodología.

De lo obtenido, se estableció que existe escasa diferencia estadística entre los grupos en la mayoría de las variables excepto la Uniformidad de la Epidermis y la Proliferación de Fascículos de Colágena de la Piel, que pudiese traducirse en la eficacia de la cubierta cadavérica para obtener una cicatriz más homogénea y reducida.

Visto de otro modo la cicatrización normal observada en la lesión cubierta con la piel del mismo roedor llamada autoinjerto distanció escasamente de la lesión con cubierta cadavérica que pudiese indicarnos positivamente la eficacia de la cubierta cutánea pues el autoinjerto tiene el beneficio de ser obtenido y colocado a los pocos minutos de isquemia además de provenir del mismo receptor lo que le confiere un rechazo nulo, características que deben ser consideradas como “ideales” para una cubierta cutánea incluso permanente, sin embargo, se encontró también poca diferencia contra la lesión dejada a libre evolución, que para algunos sería la peor de las circunstancias en cuanto la homeostasis, este fenómeno puede ser resultado de el tamaño de la lesión realizado que fue pequeña y en el mismo roedor donde se corrieron las otras situaciones, hechos que de otra forma hubiesen resultado en mayor número de animales involucrados y mayor sufrimiento a los mismos, objeto que se evitó a toda costa, por normatividad y por ética.

**Fase 9:** La presencia de vasos sanguíneos de neoformación pese a su baja diferencia estadística entre los diferentes grupos, su sola presencia puede ser considerada al igual que otras variables, un signo positivo de regeneración, que significa un punto a favor del comportamiento de la piel cadavérica como cubierta cutánea temporal.

## **CONCLUSIONES:**

**Fase 1:** Piel cadavérica inmediatamente fijada en formol después de obtenida previo a desinfección y criopreservación sometida a revisión histológica con tinción básica de Hematoxilina- Eosina.

Las pieles contaron con los estratos epidérmicos mínimos que son de 4 a 7 incluyendo el basal y el córneo.

Todas presentan infiltrado inflamatorio escaso.

Fascículos de colágena de predominio en dermis superficial.

Anexos cutáneos conservados, que incluye: unidades pilosebáceas escasas, vasos sanguíneos y nervios.

**Fase 2:** Resultados de los cultivos bacteriológicos de las pieles previos a desinfección y criopreservación.

Se presentan agentes que en su mayoría pertenecen a la flora nativa, no obstante presentan algunas bacterias resistencia a múltiples antibióticos, lo que la puede reclasificar en patógena.

Un solo resultado presenta crecimiento para *Klebsiella pneumoniae*, que de igual forma presenta un comportamiento de resistencia a antibióticos más comunes.

No se presentan otros patógenos.

**Fase 3:** Piel cadavérica fijada en formol después del proceso de desinfección y criopreservación sometida a revisión histológica con tinción básica de Hematoxilina- Eosina.

Las pieles, posterior a los procedimientos conservaron sus características histológicas casi por completo salvo la presencia escaso incremento en la espongirosis, no obstante en ningún otro elemento de los tejidos se observan cambios significativos.

**Fase 4:** Resultados de los cultivos bacteriológicos de las pieles posteriores a desinfección y criopreservación.

Los cultivos reportan en su mayoría con enterobacterias y flora propia de la piel sin embargo las primeras se presentan resistencia a múltiples antibióticos por lo que se pudiese llegar a considerarles patógenas en personas con compromiso inmune.

**Fase 5:** Piel cadavérica correspondiente a los 5 cuerpos que únicamente fue descongelada para la realización del ensayo MTT.

El análisis estadístico aplicado para este estudio tomando en cuenta el tamaño de la muestra se decide utilizar ANOVA, útil para estudios experimentales con muestras pequeñas y pocas variables.

El resultado obtenido del análisis de los resultados mostró que la densidad óptica captada por el espectrofotómetro tuvo diferencia significativa con el control negativo en donde la cual fue nula, que indica que no existe actividad mitocondrial, el graft, que es una cubierta cutánea temporal acelular a base de intestino de porcino mostró actividad mitocondrial nula y el papel mostró el mismo comportamiento. La mayoría de las pieles de los distintos cadáveres presentan poca diferencia positiva en la densidad óptica lo cual se traduce en escasa actividad mitocondrial, que persiste pese a la isquemia prolongada, tratamiento desinfectante y criopreservación, lo cual puede traducirse en que el manejo y la criopreservación fue realizada de manera adecuada.

**Fase 6 a la 9:** La revisión histológica de la piel con las características planteadas en la metodología reveló datos que fueron codificados para su análisis estadístico mediante el programa SPSS 16.0, con el que se aplicaron distintas pruebas estadísticas a éstos datos. La mayoría de las pruebas estadísticas realizadas presentan un comportamiento anormal debido al número reducido de la muestra lo que no permite una clara comparación entre los grupos estudiar. Debido a esto se decide utilizar la prueba estadística ANOVA, útil para realizar análisis comparativos entre pocas variables y muestra pequeña, presente en éste estudio.

Dados los resultados, mediante la prueba estadística ANOVA, se observa que el grupo con la cubierta cadavérica presenta mayor uniformidad en la epidermis, es decir, las zonas recuperadas luego de la lesión provocada es más regular y por ende quedan menos zonas denudadas.

Presenta también una diferencia estadística aceptable en la proliferación de fascículos de colágena que tiende a ser menor en el grupo de la cubierta cadavérica. Lo que se traduce en una resolución de la lesión más controlada que se reflejará en una cicatriz con menos proliferación que pudiese distorsionar la arquitectura de la piel.

En las demás variables como son, Tipos de Muestra y Número de Días Desde Intervención en la Piel de las Ratas, contra Remanentes Tisulares de la Cicatrización Primaria, Presencia de Vasos Congestivos, Características del Infiltrado Inflamatorio Agudo, Características del Infiltrado Inflamatorio Crónico, no presentan diferencia estadística importante, por otro lado en su análisis parcial por segmentos se observa que: hay mayor presencia de infiltrado inflamatorio agudo y crónico así como presencia de vasos congestivos en etapas tempranas de la aplicación de la cubierta cadavérica (3 y 7 días) y una mayor cantidad de capas celulares en la epidermis sobre la lesion en donde se aplicó la cubierta cadavérica y que se hace más evidente a los 7 y 14 días. Los remanentes celulares no jugaron un papel importante pues no se pudo relacionar con un mejor o peor comportamiento de la cubierta cutánea.

**Fase 9:** Proliferación de Vasos Sanguíneos de Neoformación (CD31), En cuanto a la proliferación de vasos sanguíneos marcados con CD31, el mayor pico se dio en las muestras con autoinjerto y en particular en aquellas con 7 días después de la intervención en la piel de las ratas, seguidas de las que se manejaron con la cubierta cadavérica en el mismo lapso de tiempo. En las pruebas de significancia estadística no presenta diferencia significativa con los grupos estudiados.

Teniendo en cuenta lo obtenido en éste protocolo, del cual puede concluirse que la piel cadavérica con isquemia prolongada pudiese muy posiblemente ser utilizada como cubierta cutánea temporal si se mejoran y contemplan estrictos estándares como los criterios de

exclusión, mejorando y apegándose estrechamente a la metodología para el manejo del tejido. Sin embargo considero que hace falta mucha más investigación en ésta línea, con el fin de encontrar cubiertas cutáneas temporales a bajo costo y en gran cantidad para cubrir las demandas que por desgracia son crecientes, queda entonces en la mesa el diseñar otros modelos de investigación y el presente protocolo para quien pueda y quiera ampliarlo con la meta única de mejorar las expectativas y la calidad de vida para aquellos que desafortunadamente han quedado desprovistos de éste complejo, hermoso y tan eficaz órgano que es la piel.

## **BIBLIOGRAFIA :**

1. Manimalha Balasubramani, T. Tavi Kumar, Mary Babu. Skin substitutes: a review. Burns 27 (2001) p.p. 534-544.
2. Mast BA, Schultz GS .Interactions of Cytokines, Growth Factors, and Proteases in Acute and Chronic Wounds. Wound Repair Regen. 1996 Oct;4(4) p.p. 411-20.
3. Junqueira J.C. Histología Básica. 6a Ed. 2006. P.P 359-36
4. Schultz G.S. Mast B.A. Molecular Analysis of the Enviroments of Healing and Chronic Wounds: Cytoquines, Proteases and Growth Factors, Primary Intention, 1999 Vol. 1 p.p. 7-14.
5. Shakespeare P. Burn wound healing and skin substitutes. Burns 27 (2001) p.p.517-522
6. Pramod Kumar. Classification of skin substitutes. Burns 34 (2008) p.p.148 – 149
7. Sheridan R. Tompkins. Skin Substitutes in Burns. Burns 25 (1999) p.p 97-103
8. S.T. Boyce. Desing Principles for Composition y Performance of Cultured Skin Substitutes. Burns 27 (2001) p.p 523-533
9. Naoki. Morimoto et.al. Viability and Function of Autologous and Allogenic Fibroblast Seeded in Dermal Substitutes After Implantation. Journal of Surgical Research 125,p.p.56-67
10. Kearney J. N. Clinical Evaluation of Skin Substitutes. Burns, Volume 27, Issue 5, August 2001, p.p. 545-551.
11. Pianigiani E. Et. Al. Skin Bank Organization. Clinics in Dermatology (2005) 23, p.p.353–356.
12. Woodroof e.a. The Search for an Ideal Temporary Skin Substitute: AWBAT. Open Access Journal of Plastic Surgery. www. eplasty.com. Feb. 2009 p.p. 95-104
13. Purna Sai K, Babu M. Collagen based dressings-a review. Burns 2000;26:54–62.
14. Shakespeare Gresham T. Ritcher. Histological comparison of implanted cadaveric and porcine dermal matrix grafts Otolaryngology–Head and Neck Surgery (2007) 137, 239-242
15. Van der Veen V. C. Et. Al. Biological Background of Dermal Substitutes. Burns 30 2009 p.p 1-17.

16. Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos p.p. 15.
17. Ley general de salud p.p. 106
18. Brown. Fryer. Postmortem Homografts as "Biological Dressings" for Extensive Buns and denuded Areas. *Annals of Surgery*. Oct. (1953) p.p 618-629.
19. Rodriguez C. Paredes A. Attitude of Health Professionals Toward Cadaveric Tissue Donation. *Transplantation Proceedings*.41 (2009). p.p 2064-2065.
20. Obeng M.K McCauley R.L. Cadaveric Allograft Discards as a Result of Positive Skin Cultures. *Burns* 27.(2001) p.p. 267-271.
21. Franchinini. M. Zanini.d. Evaluation of Cryopreserved Donor Skin Viability: The Experience of the Regional Tissue Bank of Verona. *Blood Transfus*. 7, (2009) p.p 100-105.
22. Vasiliev.A:V Kiseliiov.I.V. Preservation of Human Skin: Viability Criteria. *Annals of Burns and Fire Disasters*. XV, 3 (Sept 2002). p.p 1-9.
23. Manual de procedimientos del banco del piel del Instituto Nacional de Rehabilitación, 2004, p.p. 8,9.
24. Mosmann T. Rapid Colimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1983) p.p.55-63.
25. Bravo D. Rigley T. Effect of Storage and Preservation Methods on Viability in Transplantable Human Skin Allografts. *Burns* 26 (2000) p.p. 367-378.

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA.**

MEXICO D.F. A \_\_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_ DEL \_\_\_\_\_

Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado **EVALUACION DE LA EFICACIA DE LA PIEL DE CADAVERES CON ISQUEMIA PROLONGADA UTILIZADA COMO CUBIERTA CUTANEA TEMPORAL EN UN MODELO ANIMAL.**

Registrado ante el comité local de investigación con el número: 114.10 (UNAM/ISSSTE)

El objetivo del estudio es investigar el comportamiento de la piel cadavérica utilizada como cubierta cutánea temporal con el fin de ampliar los recursos terapéuticos a futuro para personas que tengan daño extenso en la piel.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en autorizar la toma de 1 biopsia de piel de 4.5 x 4.5cm en la zona paraescapular (espalda alta) del cuerpo de mi familiar con nombre:

---

Declaro que se me ha informado sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio que consiste en esperar 20 a 30 minutos para la entrega del cuerpo de mi familiar.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, previo a la toma de las muestras.

El investigador responsable me ha dado seguridades de que no se nos identificará ni a mí o a mi familiar en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a manejar el cuerpo de mi familiar de manera cuidadosa y respetuosa al momento de realizar la toma de las muestras arriba descritas.

---

Nombre y firma del familiar del paciente.

Dr. Julio Cesar Plascencia Beltran 4613442

Nombre y firma y matricula del investigador responsable.

---

Testigo 1

Testigo 2