



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

UNIDAD DE INGENIERÍA DE TEJIDOS TERAPIA CELULAR Y
MEDICINA REGENERATIVA

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN "LUIS
GUILLERMO IBARRA IBARRA"

**"Análisis histoquímico de una matriz acelular
obtenida de piel de cerdo adulto y neonato"**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA:

CARLOS DANIEL BAUTISTA OLIVIER

DIRECTOR DE TESIS: BIOL.SANDRA JULIETA GARCÍA LÓPEZ

ASESOR INTERNO: DRA. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA



Ciudad de México

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **BAUTISTA OLIVIER CARLOS DANIEL**, con número de cuenta **310098171**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **21 de agosto de 2018** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ
VÁZQUEZ

VOCAL BIÓL. SANDRA JULIETA GARCÍA LÓPEZ*

SECRETARIO Dra. ADRIANA GUTIÉRREZ HOYA

SUPLENTE Dra. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ

SUPLENTE M. en C. MARÍA DEL CARMEN LAGUNAS CRUZ

El título de la tesis que presenta es: **Análisis histoquímico de una matriz acelular obtenida de piel de cerdo adulto y neonato.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 07 de junio de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

AGRADECIMIENTOS

A la **Biol. Sandra Julieta García López**, por dirigir esta tesis, apoyarme, guiarme y sobre todo comprenderme en este trayecto, muchas gracias July, este es el resultado de nuestro esfuerzo.

A la **Dra. Adriana Gutiérrez Hoya**, por asesorar este trabajo, aconsejarme, compartir su conocimiento, y ser una pieza fundamental en mi formación académica, como profesora y como amiga.

A la **M. en C. María del Carmen Lagunas Cruz**, por su apoyo, consejos, comprensión y proporcionar todo lo necesario en la elaboración de este trabajo.

A la **Dra. Yolanda Córdova Galaviz** y al **M. en C. José Misael Vicente Hernández Vázquez**, por las aportaciones y observaciones otorgadas.

Un agradecimiento especial a la **Dra. María Cristina Velasquillo Martínez**, la asesora intelectual de este proyecto, quien me dio la oportunidad y la confianza de pertenecer a su equipo de laboratorio, sus consejos, motivación, y sobre todo su excelente calidez humana, que dejaron una huella en mi formación profesional y personal.

Al laboratorio de la **Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa**, y al laboratorio de **Biotecnología**, del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, por el apoyo y aprovechamiento de sus instalaciones.

Al **Dr. José Iván Sánchez Betancourt** de la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por la donación de los animales de laboratorio.

El presente trabajo fue realizado con apoyo del proyecto CONACyT S0008-2014-1-234450

DEDICATORIAS

En primer lugar a mis padres, **Juan Carlos Bautista Castorena** y **Griselda Olivier Juárez**, los cuales estaré eternamente agradecido, por su apoyo, enseñanzas, sacrificios y sobre todo el amor que me han brindado toda la vida, y a los cuales no puedo agradecer solo con palabras, este logro es de ustedes.

A mis hermanos **Oscar** y **Armando**, los cuales han hecho mi vida más amena, y con quienes seguiré compartiendo bellos momentos y experiencias a lo largo de mi vida.

A toda la familia **Bautista** y **Olivier**, que es muy grande y no puedo agradecer a uno por uno, pero quien cada uno de ellos ha aportado una experiencia y conocimiento único en mi persona.

A mis primos casi hermanos **Chucho**, **Chavo**, **Víctor** y **Omar**, con quienes pase momentos inolvidables y muchas alegrías, además de todas las enseñanzas de vida que inculcaron en mí.

A mis amigos de la ENP No. 7, **Tavo**, **Martin** y **Vladimir**, quienes a pesar del tiempo seguimos siendo amigos de toda la vida y que me han regalado hermosas y divertidas experiencias. A mi compañeros y amigos de la carrera, **Ángel**, **Edith**, **Elizabeth**, **Marco**, **David**, **Max** y **Azulon**, quienes hicieron más amenos mis estudios.

A todos mis compañeros de la UITTC y MR y de Biotecnología con quienes pase bellos y divertidos momentos e hicieron los experimentos de laboratorio, muy confortables, **Lesly**, **Vladimir**, **Edson**, **Mario**, **Violeta**, **Oswaldo**, **Max** y **Karen**.

Y por último y muy importante a mi prometida **Estefanía Vázquez Suárez**, muchas gracias mapachita, por todo tu amor, apoyo y comprensión que me has brindado todo este tiempo, sin ti nada de esto sería posible, gracias por acompañarme todo este tiempo, este logro, y todos los demás que vienen son nuestros.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESÚMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
1. PIEL	6
1.1 CAPAS DE LA PIEL	7
2. LESIÓN Y REPARACIÓN CUTÁNEA	10
3. TRATAMIENTOS PARA LESIONES CUTÁNEAS	12
4. INGENIERÍA DE TEJIDOS	13
5. SUSTITUTOS DE PIEL	14
6. TRASPLANTE DE PIEL	15
7. XENOINJERTOS DE PIEL	17
8. RECHAZO	18
9. DESCELULARIZACIÓN	18
10. MATRIZ EXTRACELULAR	20
11. MATRIZ ACELULAR	26
12. PIEL DE CERDO ADULTO	27
13. PIEL DE CERDO NEONATO	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
HIPÓTESIS	32

OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
MÉTODO	33
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	33
Piel de cerdo adulto	33
Piel de cerdo neonato	33
ANÁLISIS HISTOQUÍMICO	34
Procesamiento de la muestra	34
Cortes histológicos	35
Rehidratación y deshidratación de muestras	35
DESCELULARIZACIÓN DE LA MUESTRA	36
Descelularización de piel de cerdo adulto	36
Descelularización de piel de cerdo neonato	36
Espesor de piel de cerdo	37
CRITERIOS DE DESCELULARIZACIÓN	38
TINCIONES ESPECÍFICAS A MATERIAL NUCLEAR	38
Tinción Hematoxilina-Eosina	38
Tinción fluorescente Hoechst	38
ANÁLISIS DE REMANENTE DE DNA	39
Extracción de DNA	39

Cuantificación de DNA	39
Análisis de remanente de DNA	39
CUANTIFICACIÓN DE DNA DE DOBLE CADENA	40
ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA INTEGRIDAD DE LA MEC	40
COLÁGENA	40
Tricrómica de Masson	40
Herovici	41
FIBRAS ELÁSTICAS	41
Verhoeff-Van Gieson	41
TOMA DE FOTOGRAFÍAS	41
ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE LOS COMPONENTES DE LA MEC	42
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
RESULTADOS	43
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	43
Piel de cerdo adulto	43
Piel de cerdo neonato	44
DESCELULARIZACIÓN DE LA MUESTRA	45
Piel de cerdo adulto	45
Piel de cerdo neonato	46
Espesor de piel de cerdo	47

EVALUACIÓN DE CRITERIOS DE DESCELULARIZACIÓN	48
PIEL DE CERDO ADULTO	48
Tinciones específicas para material nuclear: Hematoxilina & Eosina y Hoechst	48
Cuantificación de DNA	51
Tamaño de remanente de DNA	51
Cuantificación de DNA de doble cadena	52
PIEL DE CERDO NEONATO	54
Tinciones específicas para material nuclear: Hematoxilina & Eosina y Hoechst	54
Cuantificación de DNA	56
Tamaño de remanente de DNA	56
Cuantificación de DNA de doble cadena	57
ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA INTEGRIDAD DE LA MEC	59
Piel de Cerdo Adulto	59
Piel de Cerdo Neonato	62
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	72
PROSPECTIVAS	73
REFERENCIAS	74

ABREVIATURAS

α - Alfa

α -Gal - galactosa- α -(1,3)-galactosa

Ad – Adipocitos

AHC – Antígenos de histocompatibilidad

DAPI - 4',6-Diamino-2-Phenylindole

ddH₂O – Agua bidestilada

DNA – Por sus siglas en ingles “Ácido Desoxirribonucleico”

DNAds - Por sus siglas en ingles “DNA de doble cadena”

EDTA – Por sus siglas en ingles “Ácido etilendiaminotetraacético”

EGF - Por sus siglas en ingles “Factor de Crecimiento Epidérmico”

EtBr – Por sus siglas en ingles “Bromuro de Etidio”

FC – Factor de Crecimiento

FDA - Food and Drug Administration

FGF - Por sus siglas en ingles “Factor de Crecimiento de Fibroblastos”

FMVyZ - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

GAG - Glucosaminoglicano

H&E – Hematoxilina y Eosina

HF - Por sus siglas en inglés “Folículo Piloso”

HGF – Por sus siglas en ingles “Factor de Crecimiento de Hepatocitos”

IFN – Interferón

Ig – Inmunoglobulina

IGF – Por sus siglas en ingles “Factor de Crecimiento de Insulina”

IL-1 – Interleucina 1

INR LGII – Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”

MA – Matriz Acelular

MAD – Matriz Acelular Dérmica

MEC – Matriz Extracelular

μ g – Microgramo

μ m - Micrómetro

MMP - Metaloproteinasa

ms – Milisegundo

MPM – Marcador de Peso Molecular

Mu - “Musculo erector de pelo”

nm - Nanómetros

NaOH - Hidróxido de Sodio

ng – Nanogramo

NOS – Por sus siglas en inglés “Sintasas de Óxido Nítrico”

PBS - Por sus siglas en inglés “Solución Buffer de Fosfatos”

PAA - Por sus siglas en inglés “Ácido Peracético”

pb – Pares de bases

PCA – Piel de Cerdo Adulto

PCN – Piel de Cerdo Neonato

PDGF – Por sus siglas en inglés “Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas”

PFA - Paraformaldehído

pH – Potencial de iones H⁺

RER – Retículo Endoplásmico Rugoso

rpm – Revoluciones por minuto

SCL – Superficie Corporal Lesionada

SDC - Por sus siglas en inglés “Desoxicolato de Sodio”

SDS - Por sus siglas en inglés “Duodecil Sulfato de Sodio”

SwG - Por sus siglas en inglés “Glándula sudorípara”

TE – Tris-EDTA

Tespa – Por sus siglas en inglés “3-aminopropiltrióxido de silina”

TGF α y TGF β – Por sus siglas en inglés “Factor de Crecimiento Transformante – α y – β ”

TIMP - Inhibidor de Tejido de Metaloproteinasas

TNF α - Por sus siglas en inglés “Factor de Necrosis Tumoral α ”

UITTC y MR - Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa

UPP – Ulceras por Presión

UV – Ultravioleta

VEGF - Por sus siglas en ingles “Factor de Crecimiento Endotelial Vascular”

VHC - Virus de la Hepatitis C

VIH - Virus de Inmunodeficiencia Humana

VPH - Virus del Papiloma Humano

XNA – Xenoreactivo

RESÚMEN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, mide 2 m² y pesa 5 kg aproximadamente. Entre sus principales funciones se encuentran la de protección, regulación térmica, excreción, síntesis y discriminación sensorial. Se compone principalmente de tres capas siendo la epidermis la más superficial, seguida de la dermis y la hipodermis como la más profunda. También posee una matriz extracelular (MEC), la cual está conformada por un conjunto de macromoléculas que provee un andamio físico que es crucial en la bioquímica y biomecánica del tejido para su morfogénesis, diferenciación y homeostasis. Los principales componentes de la MEC son en su mayoría fibras de colágena, fibras elásticas, proteoglicanos y glicoproteínas.

La piel es la primera barrera entre un organismo y el medio que lo rodea, por lo que tiende a sufrir lesiones como resultado de la disrupción en su continuidad y homogeneidad. Los métodos para tratar estas lesiones varían dependiendo de la extensión y el grado de profundidad de la lesión, pero en la mayoría de los casos se recurre a injertos de piel siendo la matriz acelular (MA), una de las mejores opciones para estos tratamientos. En este trabajo se estandarizó el proceso de descélularización de piel de cerdo adulto y neonato, como una fuente de MA que pueda contribuir al proceso de recuperación de lesiones cutáneas.

En los resultados obtenidos, se comprobó la completa descélularización de estas matrices acelulares (MA), mediante criterios de descélularización establecidos por Crapo *et al.*, 2011, con la ausencia de núcleos mediante las tinciones específicas a material nuclear H&E y Hoechst, siendo menor a 200 pb los remanentes de DNA, y menor a 50 ng de DNAs por mg de tejido descélularizado.

Mientras que mediante las tinciones específicas a proteínas de matriz extracelular y su análisis semicuantitativo, corroboramos que no existen diferencias significativas entre la muestra control y acelular para la colágena total ni para la colágena tipo I y III, mientras que en las fibras elásticas, si existe diferencia significativa, aunque se sigue conservando un porcentaje óptimo de estas.

Concluyendo el estudio, se pudo estandarizar el protocolo de descelularización para la piel de cerdo adulto y neonato, comprobando la ausencia de DNA, mediante criterios de descelularización, además de que la disposición de colágena no se ve afectada significativamente mediante el proceso de descelularización en la matriz acelular de piel de cerdo adulto y neonato, y las fibras elásticas se siguen conservando en las matrices acelulares elaboradas.

INTRODUCCIÓN

1. PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo, en el ser humano ocupa aproximadamente 2 m², su espesor varía entre los 0.5 mm (en los párpados) y 4mm (en el talón), y su peso aproximado es de 5 kg (Ross & Pawlina, 2006).

Las principales funciones que desempeña son:

- **Protección.** Evita la entrada de patógenos, al ser semipermeable al agua y a sustancias de uso externo.
- **Regulación térmica.** Ayuda a conservar la temperatura corporal.
- **Excreción.** Mediante el sudor libera sustancias tóxicas.
- **Síntesis.** Producción de vitamina D y melanina.
- **Discriminación sensorial.** Posee receptores para el tacto, presión, calor, frío y dolor, proporcionando información al individuo sobre el medio ambiente que lo rodea (Portas *et al.*, 2002).

La piel se compone de tres capas (**Figura 1**), las cuales son:

- **Epidermis**
- **Dermis**
- **Hipodermis**

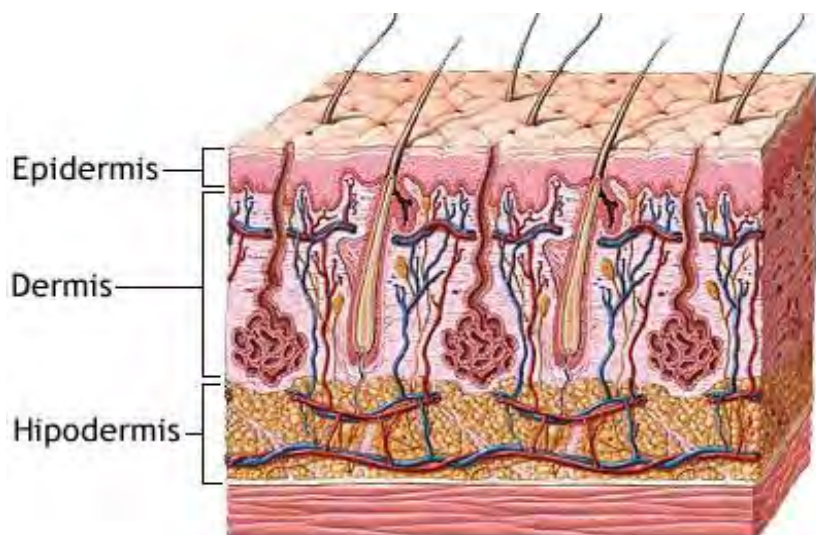


Figura 1. Estructura de la piel, obtenida de Khavkin & Ellis, 2011.

1.1 CAPAS DE LA PIEL

1.1.1 EPIDERMIS

Es un epitelio plano estratificado y queratinizado, que no posee vasos sanguíneos, se nutre por difusión de la dermis, es la parte más externa de la piel y tiene contacto con el medio ambiente, cubriendo la totalidad de la superficie corporal, y protegiéndola de factores externos. Posee 4 principales tipos de células las cuales son:

- **Queratinocitos:** Constituyen alrededor del 90% de las células de la epidermis, producen la proteína fibrosa llamada queratina, con efecto protector sobre la piel.
- **Melanocitos:** Son el 8% de las células epidérmicas, producen melanina, que es un pigmento marrón-negro, contribuye al color de la piel y absorbe la luz ultravioleta, poseen prolongaciones con los que transfieren melanina a los queratinocitos, protegiendo su núcleo para evitar daños a la cadena de DNA.
- **Células de Langerhans:** Son células dendríticas que se originan en médula ósea y emigran a la epidermis, donde actúan en la respuesta inmune innata.
- **Células de Merkel:** Se encuentran en la capa basal, ligados a los queratinocitos, hacen contacto con la terminal nerviosa de neuronas sensitivas y ayudan en la sensación de tacto (Le Vay, 2004; Hsu *et al.*, 2014; Hsu, 2014).

1.1.2 DERMIS

Es la capa que confiere soporte, resistencia y elasticidad a la piel. Compuesta de tejido conectivo en el cual se encuentra la matriz extracelular, es una red de fibras de proteínas como la colágena, elastina, glucosaminoglicanos y proteoglicanos, posee vascularización. La dermis posee diferentes tipos de células (**Figura 2**), siendo en mayor proporción los fibroblastos, y en menor proporción macrófagos, linfocitos, eosinófilos, monocitos y células cebadas. Los fibroblastos sintetizan y liberan precursores de colágena, elastina y proteoglicanos para formar la matriz extracelular (Fox, 2008).

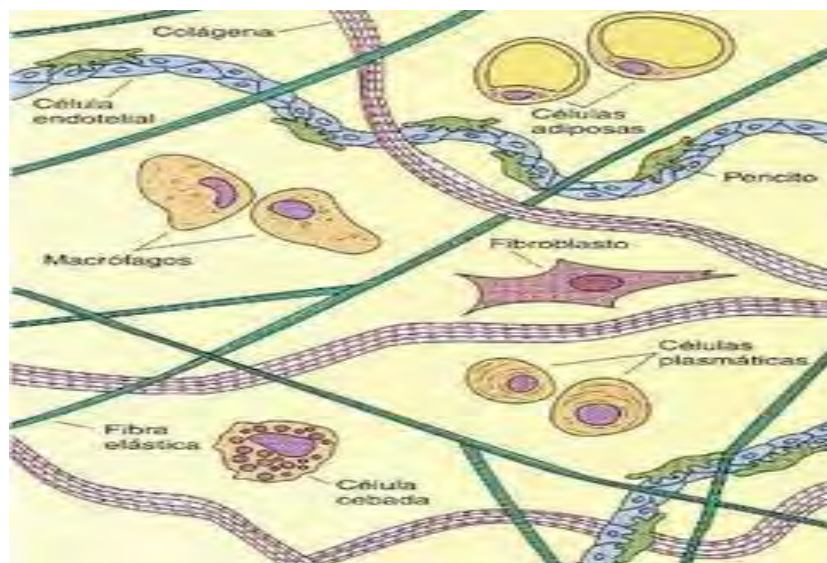


Figura 2. Principales tipos celulares que componen a la dermis, obtenida de Gartner *et al.*, 2015.

La dermis se divide en dos estratos (**Figura 3**), que son:

- **Estrato papilar:** Se llama así por las proyecciones hacia la epidermis llamadas papilas dérmicas, donde se encuentran las asas capilares, que proporciona los nutrientes a la epidermis.

- **Estrato reticular:** Es más grueso que el estrato papilar, por la gran cantidad de fibras de colágena que se entrelazan con fibras elásticas, este proporciona principalmente elasticidad (Freinkel & Woodley, 2001; Le Vay, 2004).



Figura 3. Estratos de la dermis donde se observa el estrato papilar que es más compacto y el estrato reticular que es más laxo.

1.1.3 HIPODERMIS

Es la capa inferior de la piel, sirve de almacén de energía, aislante térmico y protector mecánico frente a golpes. Está compuesta de tejido adiposo, sus fibras se fijan a la dermis, por lo cual no hay límite definido entre la dermis y la hipodermis (Fitzpatrick, 2009).

Su espesor varía dependiendo de la localización, peso, sexo o edad, formada principalmente de adipocitos, que son células grasas (de ahí el nombre de grasa subcutánea), forma lobulillos separados de tejido conectivo, por donde discurren vasos sanguíneos y nervios (Le Vay, 2004).

2. LESIÓN Y REPARACIÓN CUTÁNEA

La lesión cutánea es la pérdida de la continuidad y homogeneidad de la piel, resultado de una herida aguda o crónica, los principales tipos de heridas crónicas son úlceras por presión, úlceras venosas y arteriales, úlceras de pie diabético, úlceras neoplásicas y dehiscencias, en cuanto a las heridas agudas son aquellas causadas por traumatismo, intervención quirúrgica o quemaduras (Federal, 2016).

La reparación de la herida cutánea es dividida en cuatro fases que son (**Figura 4**): (Dreifke *et al.*, 2015).

Homeostasis: Después de la lesión cutánea hay múltiples repuestas fisiológicas para detener la pérdida de sangre. El músculo liso contrae sus vasos sanguíneos para reducir el flujo de sangre, se produce la activación de las plaquetas y factores coagulantes, que en conjunto con fibrina, favorecen el cierre de la lesión y migran leucocitos, queratinocitos y fibroblastos (Clark, 2001).

Inflamación: Se da inmediatamente después de la lesión por mediadores derivados de plaquetas, secretan quimioatrayentes. Hay infiltrado de neutrófilos, que favorecen la eliminación de las bacterias y de la MEC dañada (R. Ross & Odland, 1968). Después de 24 horas se infiltran monocitos, que se diferenciarán a macrófagos, y favorecerán la eliminación de microorganismos, residuos de tejido, remanentes de neutrófilos y secretarán factores para favorecer la angiogénesis (Koh & DiPietro, 2011).

Proliferación: Los macrófagos, dan inicio a la fase de proliferación, al liberar factores de crecimiento que promueven la proliferación de fibroblastos y queratinocitos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento transformante $-\alpha$ y $-\beta$ (TGF α y TGF β), que inducen migración, proliferación celular, y formación de MEC (Werner & Grose, 2003).

Remodelación: Células troncales epidérmicas, comienzan la remodelación diferenciándose a queratinocitos y reparando la capa epidérmica, además también

se comienzan a formar nuevos vasos sanguíneos, gracias a la proliferación de fibroblastos, macrófagos y proteínas de MEC, principalmente colágena tipo I y III (Gill & Parks, 2008; Ito *et al.*, 2005).

La curación de una lesión varía por el tipo de herida y la extensión del tejido perdido. Lesiones superficiales como epitelio dañado, sanaran más rápidamente que lesiones que abarquen capas más profundas de la piel, donde discurren vasos sanguíneos (**Figura 5**) (Dealey, 2008).

Las lesiones cutáneas afecta a una amplia población de todas las edades, ya que requieren diferentes intervenciones para asegurar el cuidado óptimo de los pacientes que las presentan. Se estima que en todo el mundo son realizadas 234 millones de cirugías al año, con una mortalidad del 10% al 45% (Borges *et al.*, 2016), teniendo un impacto negativo en la salud, la economía, las dimensiones física, social y psicológica de las personas que las padecen y de sus cuidadores. (González *et al.*, 2016).

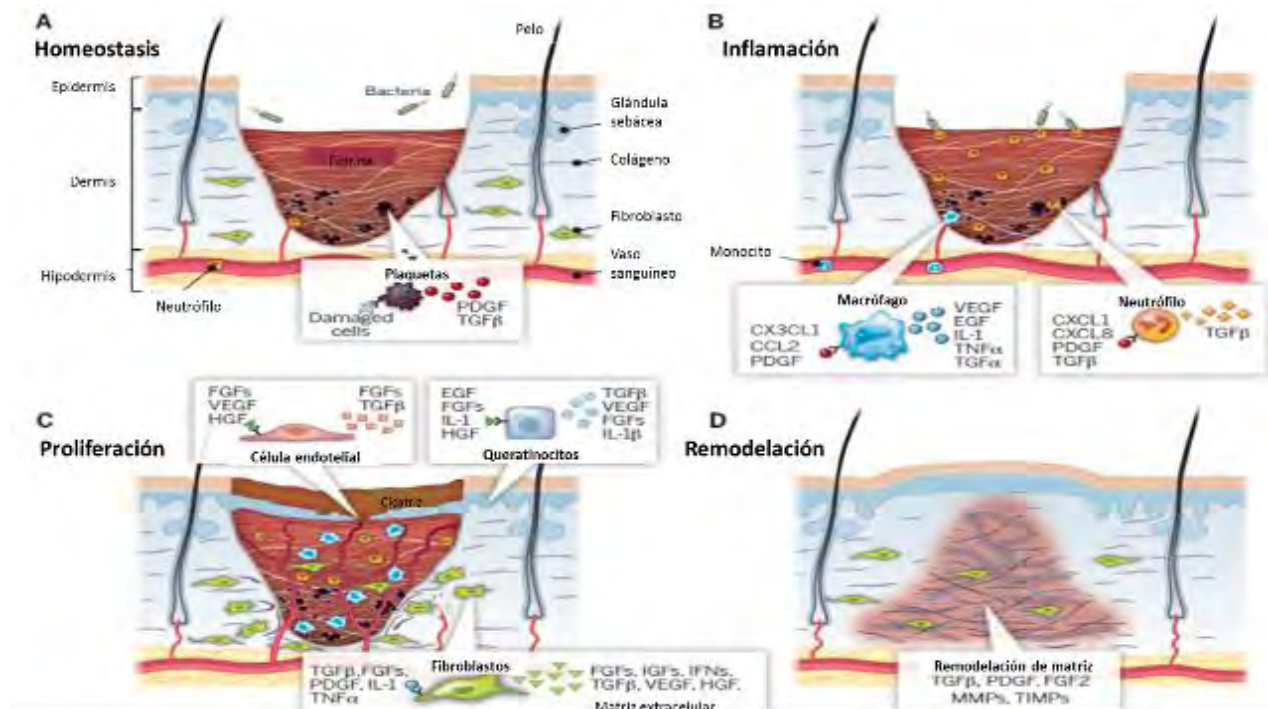


Figura 4. Etapas de la reparación de una lesión cutánea. (A) Homeostasis, activación de plaquetas y factores coagulantes, que en conjunto con fibrina favorecen el cierre de la lesión; (B) Inflamación, infiltrado de neutrófilos y macrófagos eliminan patógenos y residuos de tejido; (C) Proliferación, los fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales liberan factores de crecimiento que ayudan a la migración y proliferación celular; (D) Remodelación, formación de vasos sanguíneos, proteínas de matriz extracelular y de la capa epidérmica, imagen obtenida y modificada de Sun *et al.*, 2014.

3. TRATAMIENTOS PARA LESIONES CUTÁNEAS

Para seleccionar un tratamiento, que ayude a la rápida reparación de la lesión cutánea, es importante entender los diferentes tipos de heridas y el desarrollo de su patofisiología, por ejemplo los tipos de lesiones crónicas más comunes son úlceras por presión, venosas y arteriales y de pie diabético, además de heridas por traumatismo y quemaduras. Entre algunos factores importantes que afectan la sanación de la herida, son los *locales* como la oxigenación, infección y disrupción de vasos sanguíneos, *sistémicos* como edad, estrés, obesidad, inmunosupresión, fumar y nutrición. Entre los tratamientos utilizados, varían, en cuanto la profundidad y la extensión de la lesión. Lesiones de primer grado no requieren de atención médica, en cambio lesiones segundo grado profundo a tercero, requieren atención hospitalaria, y el uso de trasplantes de piel o sustitutos biológicos, naturales o sintéticos (Federal, 2016).

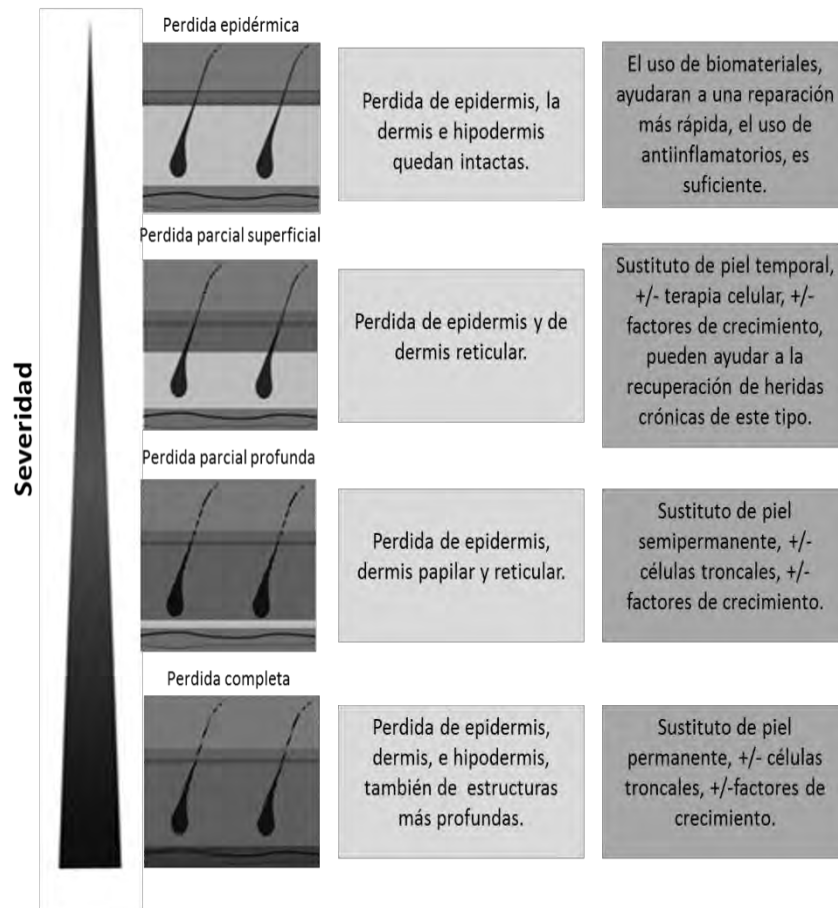


Figura 5. Profundidad de la herida y capas de la piel que se pierden imagen obtenida y modificada de Ho *et al.*, 2017.

4. INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos es una técnica innovadora, cuyo objetivo es restituir la función de tejidos dañados o lesionados se utiliza para originar tejidos *de novo*, que dota a la medicina regenerativa de herramientas que permiten afrontar los retos de diferentes enfermedades y lesiones, y así finalmente otorgar mejora en la calidad de vida del paciente (Durán *et al.*, 2012). Esta herramienta se compone de tres ejes, el primero es la generación y uso de materiales biocompatibles fabricados a partir de componentes de origen natural o sintético, cuya función es imitar a la MEC de los tejidos a reparar. El segundo es el uso de diversas células, entre ellas, autólogas o heterólogas; y el tercero comúnmente opcional, es el uso de factores de crecimiento, que permiten a las células diferenciarse hacia el tipo celular necesario para la terapia, y permite la comunicación celular para que el constructo funcione como acarreador celular (Fabres, 2010).

5. SUSTITUTOS DE PIEL

Un sustituto de piel es cualquier material o andamio, que se encargue de compensar los déficits funcionales y fisiológicos provocados por la lesión cutánea. Los problemas con la cicatrización de la lesión, y la falta de autoinjerto y aloinjerto de piel en pacientes con lesiones de extensión amplia, motivaron el desarrollo de sustitutos de piel (Nyame *et al.*, 2014).

Se dividen en dos grandes tipos: **biológicos** o **sintéticos** con dos subdivisiones, **temporales** o **permanentes**.

Sustituto temporal biológico: Ventaja de ser accesible, abundante, económico y con MEC natural, que ayuda a la reepitelización, entre algunos son:

- **Membrana amniótica:** Cobertura en quemaduras de espesor parcial, es muy frágil, bajo costo en su almacenamiento, utilizado en países emergentes, este injerto es renovado cada dos días, tiene alto riesgo de transmisión de enfermedades, reduce la pérdida de proteínas y electrolitos, y acelera la cicatrización (Sheridan & Moreno, 2001).
- **Aloinjertos cadavéricos:** Aplicada como injerto de espesor grueso. Logra sellar la herida, proporciona además factores de crecimiento, y citocinas para la quimiotaxis y proliferación celular. Las desventajas son que los macrófagos siguen activos y el aloinjerto puede ser rechazado en siete o catorce días (Hansbrough *et al.*, 1997).
- **Xenoinjertos:** Procedente de piel animal, el más utilizado es el de porcino. Las ventajas son que se insertan bien al lecho de la herida y funciona como cubierta. Como desventaja es la incompatibilidad genética e inmunológica que provocan un rechazo agudo, actualmente el proceso de descelularización es utilizado, para reducir estos efectos (Holáñ *et al.*, 2005).

Sustitutos permanentes biológicos: Posee las mismas cualidades que los sustitutos temporales, son de difícil acceso por la importación y con costos elevados, perduran toda la vida del paciente (Chawla *et al.*, 2014).

1. **Apligraf®**: Compuestos de fibroblastos neonatales colocados en una matriz de colágena de bovino tipo I, que regenera la epidermis (Zauyanov & Kirsner, 2007).
2. **Matriderm®**: Matriz extracelular de colágena de bovino con elastina, para heridas profundas, se reabsorbe y desaparece permitiendo el crecimiento de la nueva dermis (Atherton *et al.*, 2010).
3. **Alloderm®**: Derivado de piel cadavérica, se fabrica un tejido acelular, que no ejerce una respuesta antigénica (Sculean *et al.*, 2014).

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, han optado por los andamios biológicos a los sintéticos, esto debido a que poseen la MEC nativa del órgano o tejido lesionado, la cual es muy importante para el soporte, reconocimiento de señales, reservorio de información molecular y mecánica en las células, además de promover la homeostasis, curación y reparación de una herida (Hynes, 2009). Esto gracias a que la MEC es muy importante para la migración, proliferación y señalización celular (Bissell & Aggeler, 1986).

6. TRASPLANTE DE PIEL

El trasplante es una manera de tratar daños severos a órganos y tejidos (Denner, 2014), cuando hay pérdida parcial o total de tejido, como la piel, un ejemplo son las quemaduras, en México se reportan anualmente alrededor de 114 mil casos al año, que requieren atención médica, y en las cuales en ocasiones requieren de trasplante de piel (Orlando, 2014).

El problema con las quemaduras y pérdidas cutáneas de extensiones mayores al 30% de superficie corporal lesionada (SCL), radica cuando no es posible conseguir la continuidad cutánea por sutura, entonces se opta por la mejor alternativa actual, que es recubrir el área perdida con piel, proceso al que se le denomina **trasplante de piel** (Ho *et al.*, 2017).

Existen diferentes tipos de trasplante de piel, uno de ellos es cuando la piel procede del mismo individuo, a esto se le conoce como **autoinjerto cutáneo**, el único problema del autoinjerto, es cuando la SCL es mayor al 30%, lo que no permite obtenerlo del paciente (Blanco & Diéguez, 1983), cuando esto pasa, se llega a recurrir a injertos procedentes de la piel de individuos donadores de la misma especie, incluyendo piel cadavérica, a este proceso se le conoce como **aloinjerto**, sin embargo, sus problemáticas consisten en la falta de donación de piel, razón por la cual no siempre se tiene abasto suficiente de injertos de este tipo, además de que el injerto puede ser rechazado y existe la posibilidad de ser infectados por virus como son el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), VPH (Virus del Papiloma Humano), VHC (Virus de la Hepatitis C), etc.; otra opción son los injertos de piel extraídos de animales de otra especie, proceso al que se le denomina **xenoinjerto**, la desventaja de esta terapia es la generación de respuesta inmune con el subsecuente rechazo del injerto, sin embargo esta problemática se ha logrado disminuir gracias al uso de **alo- y xenoinjertos descellularizados**, de tal manera, que se han implementado diversas terapias en las que se incluyen los **sustitutos biológicos de piel acelulares** (Lorente, 1998).

La demanda de órganos y tejidos es el principal problema en los centros de salud, ya que la demanda global crece a magnitudes muy grandes. En 2006 el costo para la terapia de reemplazo de órganos, tuvo el costo aproximado de 350 mil millones de dólares, se espera que en los próximos 10 años, sobrepase los 500 mil millones de dólares por año, por lo que la ingeniería de tejidos puede combatir este problema (Ducheyne *et al.*, 2015).

Dentro de estos problemas, tenemos que las lesiones cutáneas crónicas, toman meses para sanar, y se estima que aproximadamente 50 mil millones de dólares, son gastados por el sistema de salud de Estados Unidos cada año, para el tratamiento de estas lesiones (Fife & Carter, 2012). Estas lesiones tienen muchos efectos adversos, como infecciones microbianas, pérdida de líquidos vitales para el cuerpo humano como agua y sangre, que pueden provocar la muerte (Ho *et al.*, 2017).

7. XENOINJERTOS DE PIEL

La piel porcina es la más utilizada para lesiones cutáneas de espesor profundo y parcial con más del 30% de la SCL, debido a su similitud con la piel humana en cuanto a densidad de la piel, espesor de la dermis, composición y cantidad de grasa subcutánea, además de su disponibilidad y fácil manejo (Hermans, 2014).

La función de los xenoinjertos como cubierta biológica, constituye un enfoque práctico para la cobertura temporal de los defectos cutáneos que abarquen todo el espesor de la piel, dada su relativa facilidad de almacenamiento y disponibilidad. Este tipo de injertos se adhiere al lecho de la herida de forma similar a los aloinjertos. Su adherencia se relaciona con el contenido de colágena y elastina del injerto, si bien al principio el xenoinjerto puede incorporarse a la herida, puede ser rechazado (Cabezas *et al.*, 2009).

Los apósitos biológicos de piel de cerdo se preparan frescos, congelados y liofilizados, para posteriormente ser radioesterilizados (Dearth *et al.*, 2016). Pero estos injertos contienen restos celulares que pueden provocar la activación de la respuesta inmune con el subsecuente rechazo del injerto 7 días posteriores al trasplante, esto debido a la presencia de anticuerpos naturales xenoreactivos (XNAs) presentes en el suero humano, que se activan, incluso sin la exposición previa al antígeno (Galili *et al.*, 1993). La mayoría de estos anticuerpos son reactivos frente al epítipo α -Gal, que es una estructura glucosídica presente en tejidos normales y membranas celulares de algunos mamíferos como ratones, conejos, cerdos, etc.; sin embargo, no ha sido detectado en tejidos humanos normales, al aparecer esta modificación induce el reconocimiento por parte del sistema inmune con la subsecuente activación del sistema de complemento, lo que se traduce en el rechazo agudo del xenoinjerto (Galili *et al.*, 1993).

8. RECHAZO

El rechazo del trasplante, ocurre por el reconocimiento del sistema inmune de antígenos de histocompatibilidad (AHC), de cuerpos extraños, esto por moléculas en la superficie de las células del trasplante, especialmente péptidos que no son reconocidos, por las células presentadoras de antígenos. En la ausencia de terapia inmunosupresora, resulta en la inflamación que conlleva a la destrucción del tejido u órgano trasplantado (Goldman *et al.*, 2001).

El rechazo de los trasplantes xenogénicos, se da como respuesta ante la expresión de galactosa- α -(1,3)-galactosa terminal o epítomos (α -Gal), que son encontrados en tejidos de todos los mamíferos, excepto en humanos y algunos primates, la ausencia del epítomo α -Gal, provoca la inactivación del gen que codifica a la α -(1,3)-galactosiltransferasa, y resulta en la presencia de anticuerpos anti- α -Gal, que interactúan con epítomos α -Gal de células ubicadas en los trasplantes xenogénicos, provocando el rechazo. Una solución radica en elaborar MA, que retengan su MEC, y reduzca la respuesta al epítomo α -Gal, para así poder reparar el tejido nativo, sin provocar un rechazo (Xu *et al.*, 2009).

9. DESCELULARIZACIÓN

La eliminación de las células, es el paso inicial para la preparación de un xenoinjerto acelular, consiste en remover las células y mantener el tejido nativo o la MEC (Satish *et al.*, 2016). Además, es empleado dentro de los xenoinjertos para remover los componentes antigénicos celulares, específicamente antígenos α -Gal (Mathapati *et al.*, 2013).

La descelerización se logra generalmente usando métodos mecánicos, físicos, químicos y enzimáticos por ejemplo, duodecil sulfato de sodio (SDS), tritón X-100, desoxicolato de sodio (SDC), nucleasas y tripsina. Se deben realizar lavados exhaustivos entre estos tratamientos, debido a que componentes residuales de estos tratamientos pueden perjudicar la reparación cutánea (Gilbert, 2012; Mathapati *et al.*, 2010).

La completa descelularización debe mantener la elasticidad de la MEC, similar a la original, y alterar lo menos posible la estructura y la arquitectura del tejido nativo, además en la piel gracias a la radioesterilización se realizan enlaces cruzados de las fibras de colágena, lo cual le proporciona estabilidad al injerto (Galla *et al.*, 2010).

Para la descelularización la Food and Drug Administration (FDA), de los Estados Unidos de Norteamérica, no ha establecido límites de contenido de material genético, en tejidos u órganos descelualizados, por lo que sustitutos biológicos de piel acelulares, pueden llegar a contener material antigénico y contenido de DNA (Ambrosio *et al.*, 2010).

Diferentes trabajos han utilizado como referencia los criterios de Crapo *et al.*, 2011, que establecieron tres criterios mínimos para considerar que un tejido está completamente descelularizado, estos se muestran en la **Tabla 1**. Estos tres criterios son muy importantes, enfocándose principalmente sobre el material nucleico, debido a que el DNA se correlaciona directamente con las reacciones adversas del huésped, ya que si hay DNA existe la presencia de componentes celulares dentro de la MEC (Crapo *et al.*, 2011).

CRITERIOS PARA LA DESCELULARIZACIÓN
1. Ausencia de núcleos por tinción Hematoxilina y Eosina, o DAPI
2. Menor a 50 ng de DNA de doble cadena (ds), por mg de peso de tejido descelularizado
3. Remanentes de DNA <200pb

Tabla 1. Criterios establecidos por Crapo *et al.*, 2011 para una descelularización de un tejido u órgano, imagen

obtenida y modificada de Londono & Badylak, 2015.

El proceso de descelularización además de cumplir con los criterios mencionados, debe mantener las proteínas principales de la MEC de piel para que sirvan de andamio y promueva la recelularización.

En 1995, Wainwright describió el uso de Alloderm, una matriz acelular dérmica (MAD) humana, (desprovista de epitelio, y fibroblastos), usada como cobertura para quemaduras de 2° grado superficial en pacientes, los resultados fueron la infiltración de fibroblastos del huésped, neovascularización y epitelización (Wainwright *et al.*, 2009). Aunado a estos resultados, se profundizó en la investigación de andamios acelulares derivados de tejidos para la regeneración de tendones, ligamentos, peritoneo, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas, cartílago, y tejido facial (Liu & Wang, 2014).

Actualmente, existen amplias técnicas para poder descelularizar tejidos, sin embargo, a veces estas no logran la completa eliminación de los componentes celulares, por lo que es importante realizar técnicas que nos ayuden a comprobar la completa descelularización, como las establecidas por Crapo *et al.*, 2011 y así poder mantener los componentes de la matriz extracelular.

10. MATRIZ EXTRACELULAR

La MEC, incluye los componentes no celulares, formada por macromoléculas presente en todos los tejidos y órganos animales, provee un andamio físico y es crucial en la bioquímica y biomecánica que requiere el tejido para su morfogénesis, diferenciación y homeostasis (Frantz *et al.*, 2010).

Es una estructura altamente dinámica que está en constante remodelación, otorga organización morfológica y función fisiológica gracias a la interacción célula-receptor de superficie de factores de crecimiento, que da lugar a la transducción de señales y a la regulación de la transcripción de genes (Silvera & Barrios, 2002).

Las macromoléculas que constituyen a la MEC son de cuatro grandes tipos (**Figura 6**).

- **Fibras de colágena.**
- **Fibras elásticas.**
- **Proteoglicanos**
- **Glicoproteínas**

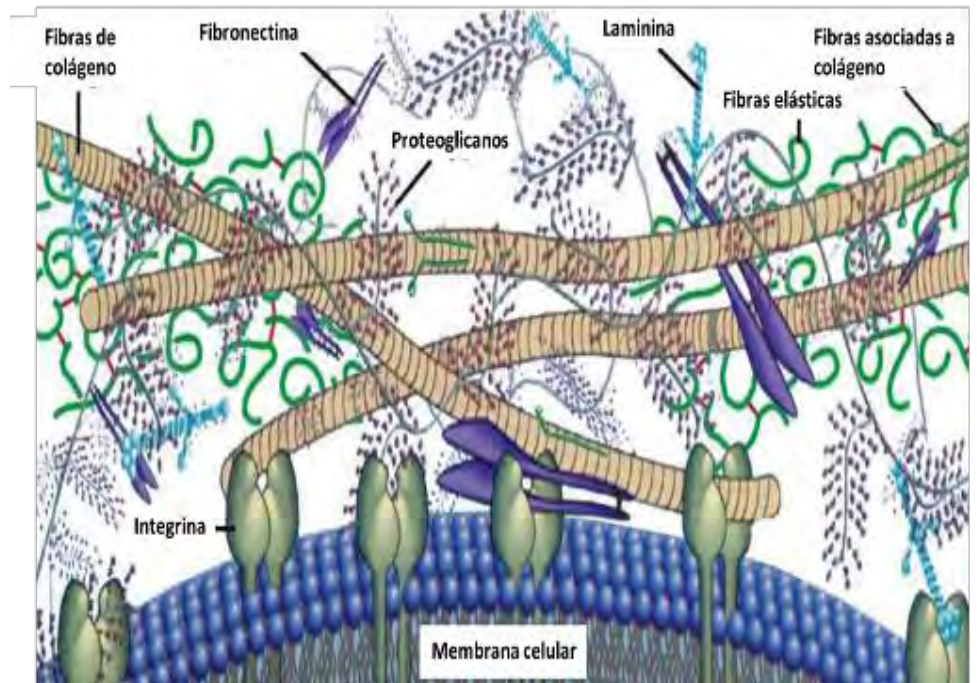


Figura 6. Componentes principales de la matriz extracelular de piel, obtenida y modificada de Aamodt & Grainger, 2016.

10.1 FIBRAS DE COLÁGENA

La colágena es la proteína más abundante en los mamíferos, llega a constituir la tercera parte del contenido proteico de un animal. La piel es constituida por 74% de colágena, el cual es el principal elemento de la MEC, proporciona la forma, fuerza y flexibilidad (Iracheta, 2001).

Los aminoácidos que constituyen a la colágena, presentan la secuencia característica: *Prolina-Hidroxiprolina-Glicina*, importante para la formación de la hélice de tres hebras. Las moléculas de colágena se componen de cadenas polipeptídicas, denominadas cadenas α (alfa). La unión de tres cadenas α da como resultado procolágena, en ellas se encuentran dos regiones terminales (carboxilo y amino), una vez secretado al espacio extracelular, las moléculas de procolágena, se ensamblan entre 10-20 unidades formando fibras de colágena (**Figura 7**) (Torra i Bou *et al.*, 2000; Iracheta, 2001).

Existen al menos 20 isomorfos de colágena, en la piel humana se encuentran el tipo I (80-90%) y tipo III (8-12%), además de colágena tipo V y VI, pero estos en cantidades muy pequeñas y en zonas muy específicas (Fitzpatrick, 2009; Fox, 2008).

Colágena tipo I: Provee principalmente fuerza de tensión a la piel y es el principal componente fibrilar, forma redes gruesas.

Colágena tipo III: Contribuye a la propiedad extensible de la piel, también llamada colágena fetal por su abundancia en tejidos fetales, que abarca la mitad de colágena total en la piel, forma redes delicadas. En la piel adulta la concentración de colágena total es 5-6:1 (Tipo I:III) y se concentra mayormente, en la dermis papilar que la reticular (Hay, 2013; Uitto *et al.*, 1989).

Por esta razón, las fuentes alogénicas y xenogénicas de colágeno tipo I se han reconocido durante mucho tiempo como soporte útil para la reparación de tejidos con un bajo potencial antigénico. La colágena tipo I es quizás el material biológico más utilizado para aplicaciones terapéuticas debido a su fuente abundante y su historial de uso exitoso (Badylak, 2002).

Otros tipos de colágena, existen en la MEC natural, aunque en cantidades mucho menores. Estos tipos alternativos de colágena proporcionan cada una propiedades mecánicas y físicas distintas a la MEC y contribuyen como un andamio para la reparación de tejidos (Van der Rest & Garrone, 1991).

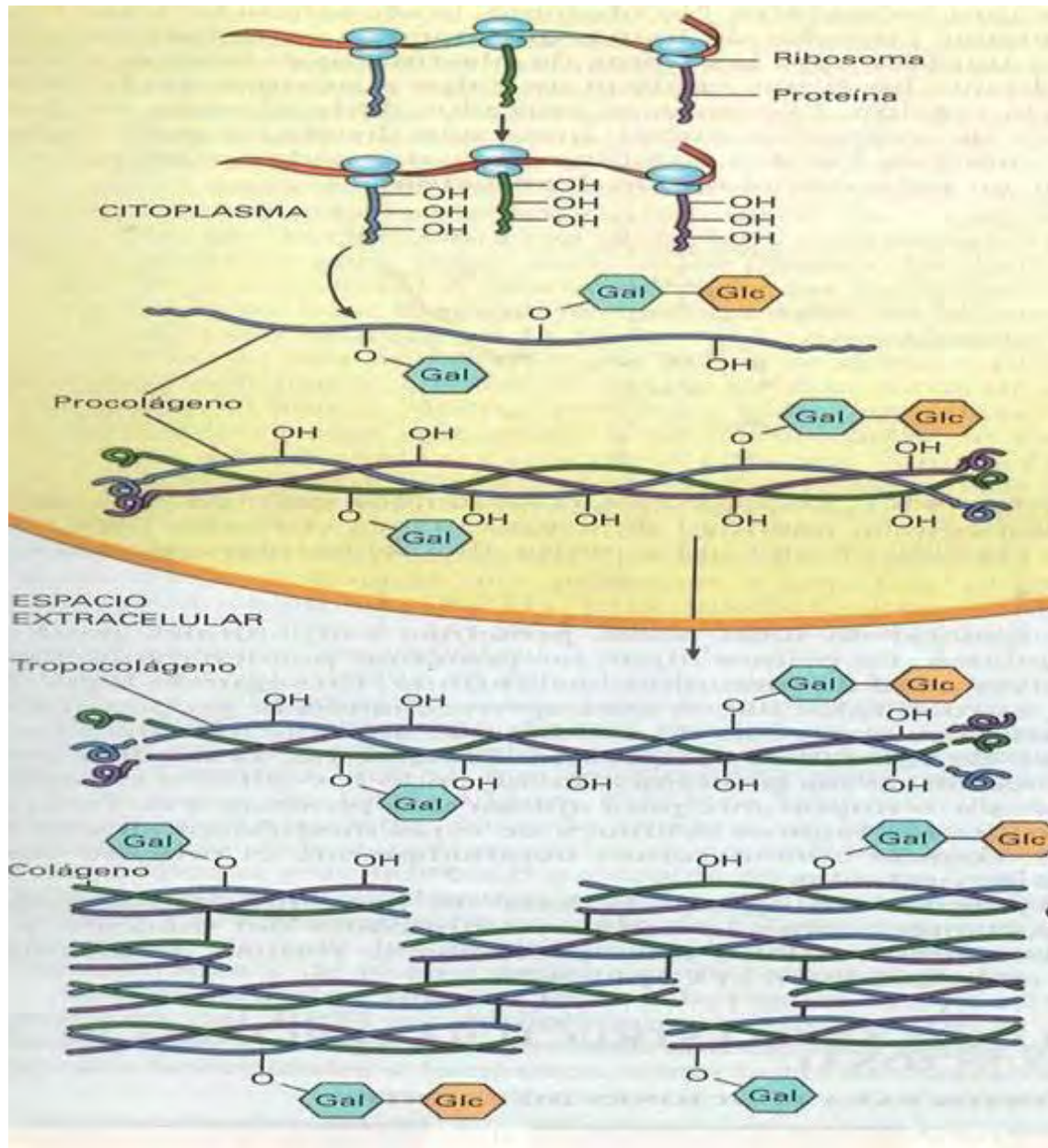


Figura 7. Síntesis de la colágena obtenida de (Prockop & Guzmán, 1981).

10.2 FIBRAS ELÁSTICAS

Las fibras elásticas juegan un importante rol en la estructura y función de la piel, proveen elasticidad y resistencia. Constituye del 2-4% del peso de la piel adulta (Uitto *et al.*, 1989). Posee muchas propiedades deseables en la reparación tisular que incluye ligandos para la adhesión de muchos tipos celulares (Miyamoto *et al.*, 1998).

Es un polímero insoluble, constituido por moléculas solubles de tropoelastina y una glicoproteína llamada fibrina. Durante el desarrollo de las fibras elásticas, se forma primero el componente fibrilar, seguido de depósitos de elastina, estos a su vez se unen por interacciones iónicas, como consecuencia de sus cargas opuestas. La cadena de tropoelastina se forma en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Las microfibrillas están compuestas de fibrina, la cual alinea las moléculas de tropoelastina, y forman el *cross-linking* (“enlaces cruzados” por su traducción en inglés), y con la maduración de la fibra comienza a formarse la elastina insoluble (**Figura 8**) (Hay, 2013; Silvera & Barrios, 2002).

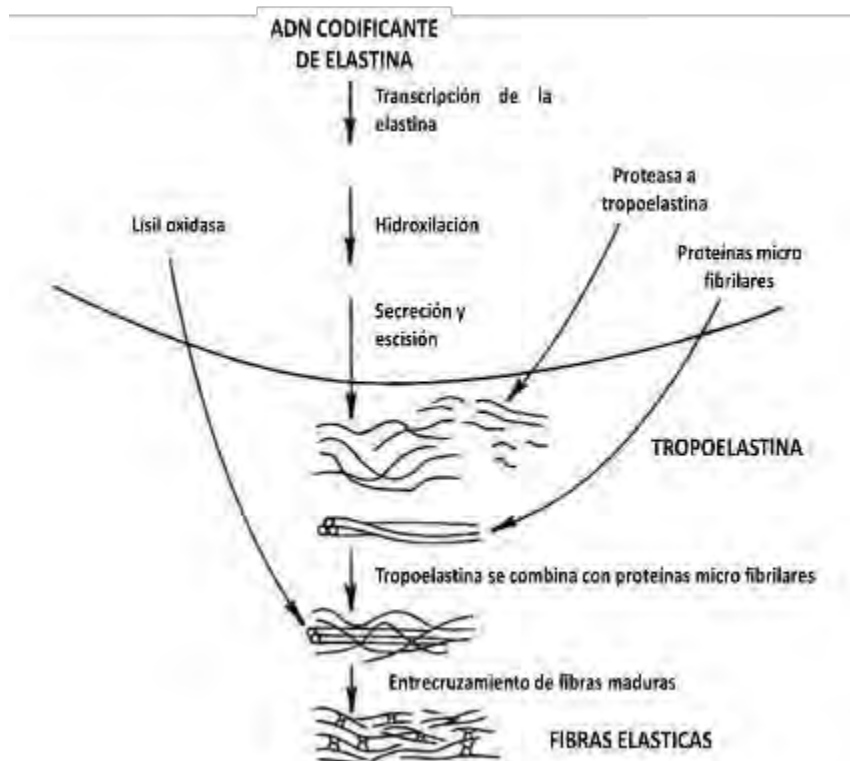


Figura 8. Formación de la elastina, obtenida y modificada de Rosenbloom, Abrams, & Mecham, 1993.

10.3 PROTEOGLICANOS

Los proteoglicanos, son glicoproteínas altamente glicosiladas. Las moléculas se encuentran formadas por un núcleo proteico que se encuentra unido covalentemente a polisacáridos denominados glucosaminoglicanos (GAG). Estas cadenas de GAG son largos polímeros de carbohidratos lineales que están cargados electronegativamente bajo condiciones fisiológicas, debido a la presencia de grupos sulfato y de grupos de ácido hialurónico, y mantienen a la piel hidratada (**Figura 6**) (Brooks *et al.*, 2002). Ayudan a la retención de citocinas y factores de crecimiento, y favorecen a una reparación dermal eficaz (Hodde *et al.*, 1996).

10.4 GLICOPROTEÍNAS

Son moléculas compuestas por proteínas unidas a uno o varios glúcidos, simples o compuestos; son muy importantes en la recuperación tisular, debido a que participan activamente en la reparación y manutención de estructuras vasculares (Ponce *et al.*, 1999). Las principales glicoproteínas encontradas en la MEC de la piel son: fibronectina y laminina (**Figura 6**).

Fibronectina: Formada por un dímero de unidades idénticas enlazadas entre sí por puentes disulfuros, es importante para la coagulación sanguínea, y la adhesión celular a fibras proteicas de la MEC.

Laminina: Compuesta de tres cadenas polipeptídicas diferentes, es importante para la adhesión y diferenciación celular (Silvera & Barrios, 2002).

En el proceso de descelularización, los principales componentes de la MEC que se conservan son la colágena, las fibras elásticas, fibronectina, laminina, y glucosaminoglicanos y, en menor medida, factores de crecimiento y citocinas (Londono & Badylak, 2015)

11. MATRIZ ACELULAR

Los andamios biológicos compuestos de MEC (Rosenbloom *et al.*, 1993), son usados en la medicina regenerativa que incluye a la ingeniería de tejidos, para el remplazo de órganos y tejidos, que fueron alterados o dañados, por un trauma, enfermedad, o anormalidades congénitas (Londono & Badylak, 2015).

El uso de tejidos descelularizados es más frecuente en la medicina regenerativa, llegándose a obtener gran variedad de ellos, tanto alogénicos como xenogénicos, entre los que se encuentran los de vejiga urinaria, intestino delgado, mesotelio, pericardio, válvulas cardíacas y dermis (Gilbert *et al.*, 2006).

La matriz acelular (MA) o descelularizada, es un material biológico, derivado de tejidos u órganos humanos o animales (bovinos, porcinos, etc.), estos tejidos son tratados con procesos específicos para remover células, antígenos y entrecruzar las fibras de colágena, obteniendo como resultado un material acelular, con la MEC intacta. Una de las características principales de la MA es su capacidad de promover el crecimiento celular, la neovascularización y su integración en los tejidos del huésped, su degradación es rápida y permite el recambio por tejido *de novo*, además proporciona flexibilidad y resistencia, al mismo tiempo que minimiza la respuesta inflamatoria y fomenta el crecimiento y la integración del tejido. Las matrices acelulares, se preparan utilizando técnicas asépticas o son esterilizadas para su uso (Zenn *et al.*, 2017).

La MA tiene gran importancia en la biomedicina, debido a que, permite el reconocimiento y la organización de las células del huésped, para la formación del tejido perdido o dañado (Chen *et al.*, 2004).

La composición y estructura de la MEC será diferente, dependiendo el tejido u órgano de procedencia, edad del donante y requerimientos fisiológicos. Órganos como el riñón, vejiga urinaria e hígado son pobres en MEC, en contraste, tejidos como tendones y ligamentos, poseen abundante cantidad de MEC y muy poco contenido celular, la submucosa y dermis son ricas en MEC y son muy

vascularizadas, contienen principalmente colágena tipo I, glucosaminoglicanos y factores de crecimiento (Badylak, 2002).

La MEC existe en todos los tejidos y órganos, puede ser utilizada para usos terapéuticos pero solo de pocas fuentes entre estas se encuentran, la dermis de la piel, submucosa de intestino delgado, vejiga urinaria, pericardio, membrana basal de hígado y tendón de Aquiles, estas son fuentes potenciales de MEC (Crapo *et al.*, 2011).

12. PIEL DE CERDO ADULTO

La piel de cerdo adulto, es el tejido animal más utilizado para la investigación biomédica y la medicina regenerativa como fuente para andamios biológicos (Turner *et al.*, 2014). Es muy similar a la piel humana, en cuanto a capas de la piel, y las proteínas de MEC son similares inmunohistoquímicamente e histológicamente, las diferencias más notables son: que la piel de cerdo adulto es más gruesa, posee menos folículos pilosos, hay mayor cantidad de tejido subcutáneo o hipodermis, mayor distribución de glándulas sebáceas y menor cantidad de glándulas sudoríparas (**Figura 9**) (Jacobi *et al.*, 2007; Debeer *et al.*, 2013).

Las MA porcinas han sido muy eficaces para la reconstrucción de tejidos como vejiga urinaria, esófago, tendones, vasos sanguíneos, hernias, lesiones gingivales, y principalmente, lesiones cutáneas (Chen *et al.*, 2004), debido a que su MEC, permite el recambio de colágena, la migración y proliferación celular (Parker *et al.*, 2006).

El uso de la MA de piel de cerdo adulto empezó a ser investigada como sustituto biológico para lesiones cutáneas, cuando Ge *et al.*, 2009 analizaron las similitudes entre una MA de piel de cerdo y de humano, concluyendo que ambas MA son similares inmunohistoquímicamente e histológicamente, a partir de esto se realizaron otras pruebas como la de Hoganson *et al.*, 2010 que evaluó el análisis de la retención de proteínas de MEC de la MA obtenida, en comparación a la MEC nativa, de piel de cerdo, observando que se retiene colágena tipo I, III y VII, así como factores de crecimiento importantes para la recuperación cutánea, como

VEGF, FGF y TGF- β , en la matriz acelular obtenida; uno de los trabajos más importantes realizados para la descellularización de la piel de cerdo adulto fue el realizado por Reing *et al.*, 2010, ellos se enfocaron en obtener un método de descellularización que cumplieran los requisitos establecidos por Crapo *et al.*, obteniendo como el mejor, el realizado con tripsina-tritón, y cumpliendo con los criterios de descellularización anteriormente descritos.

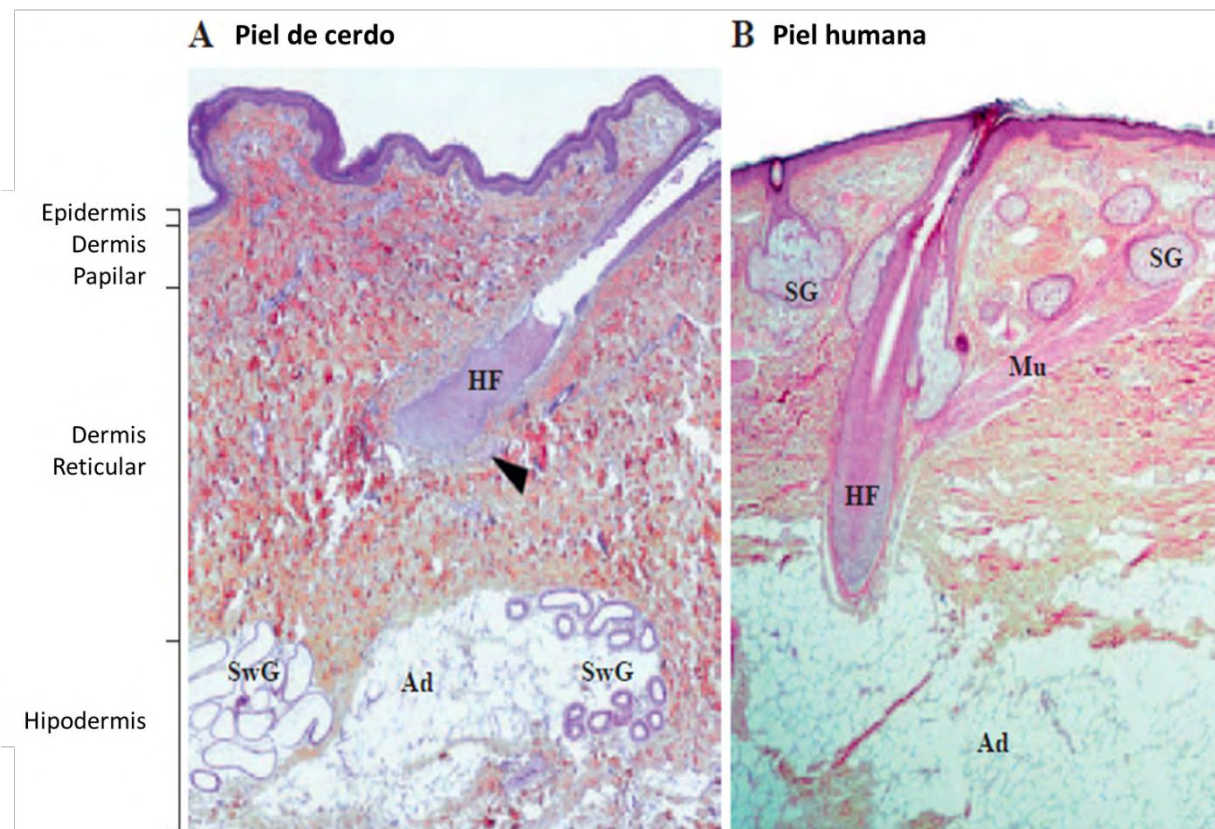


Figura 9. Comparación entre piel de cerdo adulto y piel humana, foliculo piloso(HF,) musculo erector de pelo (Mu y flecha), glándula sebácea (SG), glándula sudorípara (SwG), adipocitos (Ad), imagen obtenida y modificada de Debeer *et al.*, 2013.

13. PIEL DE CERDO NEONATO

La piel de cerdo neonato, ha sido utilizada como modelos principales de absorción cutánea. A diferencia del cerdo adulto, la piel de cerdo neonato, es más similar a la piel humana en el espesor del estrato corneo, la cantidad de folículos pilosos, y la elasticidad (Cilurzo *et al.*, 2007).

El cerdo neonato, comprende desde su nacimiento del lechón hasta el destete, variando de 21 a 28 días, un joven abarca hasta los 8 meses de edad, y un adulto, después de los 8 meses de edad (Campabadal, 2009).

La disponibilidad de piel porcina neonata es alta, esto debido a que esta especie presenta un porcentaje de mortalidad elevado en comparación con otras especies como la bovina, ovina o equina, a pesar de que la producción porcina cuenta con una de las más modernas tecnologías en producción animal. La mortalidad neonatal se refiere básicamente a las muertes que acontecen en la primera semana de vida del lechón, durante la cual se presentan el 90% de las bajas (Quiles, 2004).

La mitad de las muertes neonatales son debidas a la inanición y falta de alimento de los lechones (English & Smith, 1975), entre estas deficiencias se destacan el bajo peso al nacimiento en relación a su peso adulto (1%), la ausencia de una capa protectora de pelo, la cubierta de grasa subcutánea muy fina, las pocas reservas energéticas corporales, la mayor superficie corporal relativa con respecto a su estado adulto y un sistema de termorregulación inmaduro. Todo esto contribuye a ocasionar un importante número de muertes por pérdida de calor y por hipoglucemia (Dyck & Swierstra, 1987).

Chiarini *et al.*, 2007 analizaron la piel de cerdo neonato, para conocer su posible efecto en la reparación de lesiones cutáneas, ellos utilizaron la piel fresca y congelada por 6 meses, donde realizaron la cuantificación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TGF- β , y de un activador de macrófagos, como el GM-CSF, donde pudieron observar que conforme aumenta el día de cultivo, aumentan estas citocinas, pudiendo concluir que la piel de cerdo neonato sin descélularizar causa inflamación, pero induce una recuperación de la lesión *in vivo*.

Actualmente el uso de los cerdos neonatos es en el campo de drogas por absorción cutánea, en estudios de infecciones bacterianas, debido a su similitud con el sistema inmunológico de bebés humanos, pero los estudios más importantes, están relacionados a su mortalidad neonatal, el cual es el principal problema en la industria porcina (Busby *et al.*, 2014; Cilurzo *et al.*, 2007; Quiles, 2004), en la literatura actualmente no existen MA, obtenidas de piel de cerdo neonato, lo cual es un amplio campo para conocer su posible uso como sustituto biológico para reparaciones cutáneas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las lesiones cutáneas son un problema de salud pública debido a las secuelas psicológicas y económicas en el paciente, actualmente para el tratamiento de estas lesiones existe un amplio número de matrices acelulares (MA), las cuales son de difícil acceso, por ser importados, y con costos elevados. Además la presencia de material celular puede inducir el rechazo del injerto o no promover la reparación de la lesión cutánea. En este trabajo se pretende evaluar la descelularización de dos matrices acelulares, obtenidas de piel de cerdo y sus propiedades histoquímicas, para ser utilizados como xenoinjerto de fácil obtención, que conserve la MEC similar a la nativa.

HIPÓTESIS

El proceso de descelularización para piel de cerdo adulto y neonato, resulta en una matriz acelular, ausente de material nuclear, conservando la matriz extracelular similar a la nativa.

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar y evaluar el proceso de descelularización además de analizar la matriz extracelular de la piel de cerdo adulto y neonato.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer un protocolo de descelularización para piel de cerdo adulto y uno para piel de cerdo neonato.
- Corroborar la descelularización de la matriz acelular, mediante criterios de tinción nuclear y cuantificación de DNA.
- Evaluar el análisis histológico de componentes de matriz extracelular.
- Realizar el análisis semicuantitativo de las tinciones histológicas específicas a proteínas de matriz extracelular y de componentes nucleares.

MÉTODO

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Piel de cerdo adulto

Se obtuvo la piel de cerdo adulto (PCA) (*Sus scrofa domestica*) raza Landrace con Yorkshire, la edad oscilaba entre 8 a 12 meses, con una n=6, del rastro de San Juan, ubicado al oriente de la Ciudad de México, la muestra fue obtenida de la zona dorsal, de un cerdo con un tiempo de sacrificio menor a 8 horas.

La piel se mantuvo en PBS (Solución buffer de fosfatos) 1X pH 7.4 a 4°C, hasta su llegada al laboratorio de la UITTC y MR del INR LGII, donde la muestra se seccionó a un tamaño de 110 cm² y se seccionó otra muestra a un tamaño de 2 cm² que fue fijada con paraformaldehído (PFA) al 4%; la piel fue rasurada con navaja, lavada con cepillo quirúrgico, y posteriormente enjuagada con agua desionizada (Milli-Q®), la piel se mantuvo dentro de bolsas Ziploc®, con 400 ml de PBS 1X pH 7.4 hasta cubrir las y fueron congeladas en un ultracongelador REVCO® a -80°C x 24 horas.

Piel de cerdo neonato

La piel de cerdo neonato (PCN), se obtuvo de 6 cerdos neonatos, n=6 (*Sus scrofa domestica*), raza Landrace con Yorkshire donados por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVyZ), de la UNAM, con una edad de dos días de recién nacidos, sin importar el sexo, estos cerdos fueron seleccionados al no cumplir los criterios de supervivencia neonatal, fueron sacrificados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 por médicos veterinarios del INR LGII, con 6 ml de xilacina de forma intramuscular y sobredosis de Pentobarbital mediante punción cardíaca, la muerte fue confirmada con un estetoscopio.

Se colocó al animal en una charola de disección, para ser rasurado, se lavó con cepillo quirúrgico y enjuago con agua corriente, posterior a esto se procedió al afeitado, este se realizó en sentido contrario al crecimiento del pelo, al finalizar se retiró el exceso de jabón con agua Milli-Q® y se limpió con gasas estériles. Con marcador se delimitó la zona de disección, detrás de las axilas, frente a la ingle del animal y atravesando el vientre, se realizó una incisión con un bisturí del No. 4 y hojas del No. 22, levantando un poco la piel del animal para introducir las tijeras mayo con la punta cerrada y se abrieron una vez dentro. La piel fue colocada en una charola de disección, donde se extendió para lavarse con PBS 1x a pH 7.4, se seccionó una muestra de piel de 2 cm² la cual se fijó con PFA al 4% para pruebas histológicas.

ANÁLISIS HISTOQUÍMICO

Procesamiento de la muestra

Las muestras controles y acelulares, se fijaron durante mínimo 12 horas con PFA 4%, la muestra se pinchó con alfileres y se extendió sin estirarla en una base de parafina (**Figura 10**). Posteriormente las muestras se deshidrataron en alcohol etílico en concentraciones ascendentes (70%, 80%, 96% y 100%). Terminada la deshidratación se procedió al aclaramiento utilizando xilol. Por último se incluyeron las muestras en parafina (Paraplast®).

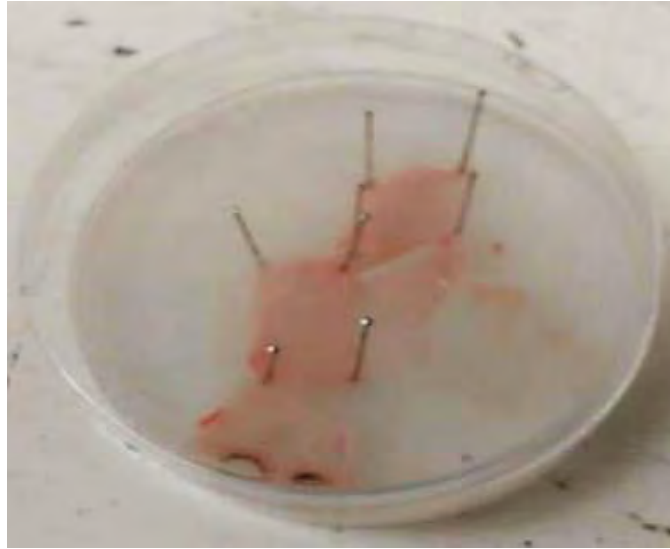


Figura 10. Fijación de muestras de piel. Las biopsias se sumergieron totalmente en PFA 4% y se expandieron completamente sin estirarlas.

Cortes histológicos

Se realizaron cortes de 5 μm utilizando un micrótopo Leica RM2135. Las laminillas fueron tratadas con una solución de tespa (3-aminopropiltriétoxissilina), para evitar que el tejido se desprendiera.

Rehidratación y deshidratación de muestras

Las laminillas se desparafinaron a 56°C posteriormente se pasaron por xilol, la rehidratación se realizó a concentraciones descendentes de alcohol etílico partiendo de 100%, 96%, 80% y 70% durante 30 segundos en cada uno, posteriormente con ddH₂O.

Después de realizar las respectivas tinciones, las muestras fueron deshidratadas con alcohol etílico a concentraciones ascendentes 70%, 80%, 96%, 100% y xilol, durante 30 segundos y montadas con resina (Merck).

DESCELULARIZACIÓN DE LA MUESTRA

Descelularización de piel de cerdo adulto

Transcurridas las 24 horas de congelación, la piel se descongeló, posteriormente se realizaron enjuagues. Se trató con Tripsina/EDTA (Invitrogen), se realizaron enjuagues, después la piel fue colocada en alcohol etílico al 70%.

Se realizó tratamiento con peróxido de hidrógeno, se realizaron enjuagues después se colocó la piel en solución Tritón X-100/EDTA/Tris Base, se realizaron enjuagues, y por segunda vez, se colocó la piel en solución Tritón X-100/EDTA/Tris Base.

Se realizaron enjuagues, y se obtuvo una muestra de 2 cm² para ser fijada en PFA 4% como muestra final de descelularización, las cuales fueron procesadas como se indicó anteriormente, el resto de piel (100 cm²), se guardó en PBS, y se congelaron a -80°C.

Descelularización de piel de cerdo neonato

Transcurridas las 24 horas de congelación, se descongeló, después de esto se realizaron enjuagues.

Se trató con Tripsina/EDTA (Ácido etilendiaminotetracético) (Invitrogen), se realizaron enjuagues, después la piel fue colocada en alcohol etílico al 70 %.

Se realizaron enjuagues después se colocó la piel en solución Tritón X-100/EDTA/Tris Base, se realizaron enjuagues, y por segunda vez, se colocó la piel en solución Tritón X-100/EDTA/Tris Base.

Se realizaron enjuagues, y se obtuvo una muestra de 2 cm² para ser fijada en PFA 4% como muestra final de descelularización, las cuales fueron procesadas como se indicó anteriormente, el resto de piel (100 cm²), se guardó en PBS, y se congelaron a -80°C.

Espesor de piel de cerdo

Se midió el espesor de la piel de cerdo adulto y neonato en dos ocasiones, cuando la muestra fue obtenida, y cuando esta fue procesada. Por lo tanto se obtuvieron dos mediciones de la piel que fueron control y matriz acelular.

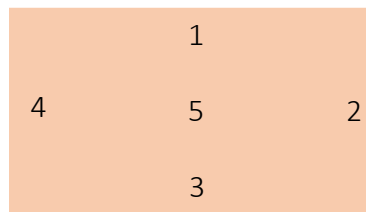
La medición se realizó con un micrómetro digital Mitutoyo 293-349-30 (**Figura 11**), el cual se calibró a partir de cero.



Figura 11. Micrómetro, con el cual se realizaron las mediciones del espesor de la piel de cerdo adulto y neonato.

Se midieron una $n=6$ tanto de piel de cerdo adulto como de neonato, a las cuales se le realizaron 5 mediciones, (**Figura 12**), el valor de las 5 mediciones del espesor de la piel fueron promediadas siendo el resultado en mm.

Figura 12. Esquema de las zonas de medición en la piel de cerdo adulto y neonato.



CRITERIOS DE DESCELULARIZACIÓN

TINCIONES ESPECÍFICAS A MATERIAL NUCLEAR

Tinción Hematoxilina-Eosina

Los cortes histológicos fueron rehidratados, se tiñeron con hematoxilina de Harris (Merck) por 10 min, se lavó el exceso de colorante con agua corriente, se llevó a solución de alcohol ácido, para diferenciar los núcleos, se realizó el enjuague con agua corriente, después a carbonato de litio (Li_2CO_3) por 5 seg, para virar los núcleos a azul, se realizó el enjuague con agua corriente y se llevó a la solución de alcohol etílico al 80% pre-eosina para posteriormente realizarse la contratinción con eosina, por 5 min, se deshidrataron las laminillas y se montaron con resina para su análisis.

Tinción fluorescente Hoechst

Los cortes histológicos se tiñeron con **Hoechst**, que es un marcador fluorescente, específico para DNA, tiene longitud de onda de 325 a 345 nm, correspondiente al espectro de luz azul, las laminillas se cubrieron con solución Hoechst (1:1000) (Invitrogen), durante 10 segundos en completa oscuridad. Las fotos fueron tomadas al instante para evitar perder la fluorescencia se realizó la toma de fotografías con un microscopio Axio Imager Z2 Zeiss, y con el programa Axio Vision Zeiss, se determinó el tiempo de exposición en milisegundos (ms), para así poder eliminar la autofluorescencia del tejido y permitiera observar solo la presencia de los núcleos, los tiempos de exposición se determinaron a partir de la muestra control para cada objetivo.

ANÁLISIS DE REMANENTE DE DNA

Extracción de DNA

Se seccionaron fragmentos de 1 cm² de piel fresca antes de descelularizar (*muestra control*), y de piel descelularizada (*muestra acelular*), se colocaron en una incubadora Kenton 303-2AS, a 37°C por 24 horas para su deshidratación, posterior a esto se pesaron 25 mg de piel, y se colocaron en 1 ml de DNAzol® (Invitrogen), se homogenizó con Polytron (Termo Fisher Scientific), se realizó la precipitación del DNA con alcohol etílico absoluto y lavados con alcohol etílico al 75%, se mantuvo el DNA en solución de NaOH 8 mM a -20°C.

Cuantificación de DNA

Se realizó la cuantificación, mediante absorbancia 260/280 en un NanoDrop 2000c (Termo Fisher Scientific), agregando 2 µl de muestra control y acelular de cada muestra, se realizó la lectura por triplicado, obteniendo la concentración y la pureza, que se promediaron y se obtuvo la desviación estándar.

Análisis de remanente de DNA

Para analizar la presencia, integridad y tamaño de remanente del DNA extraído, a partir de las muestras controles y acelulares, se corrió la muestra en un gel de agarosa al 2% en una cámara de electroforesis Mini-Sub® Cell GT (Bio-rad) a 100V por 45 min, para conocer la presencia, integridad y tamaño de remanente del DNA mediante la incorporación de bromuro de etidio (EtBr) UltraPure™ (Invitrogen), a la cadena de DNA, se utilizó un marcador de peso molecular AmpliSize™ 50-2,000 bp (BioRad), y se observó en un transiluminador para electroforesis UV ENDURO (Labnet).

CUANTIFICACIÓN DE DNA DE DOBLE CADENA

Para medir la cantidad de DNA de doble cadena (DNAs “por sus siglas en inglés”) se realizó, de acuerdo a las especificaciones del kit Quant-iT PicoGreen® dsDNA (Thermo Fisher Scientific), una curva estándar de DNAs, con concentraciones que van desde 1 ng/ml hasta 1 µg/ml, se colocaron las muestras experimentales, las cuales fueron el DNA de las muestras controles y acelulares, obtenidas mediante la extracción de DNA, se realizó por triplicado, con el reactivo PicoGreen el cual se une a las dos cadenas del DNAs; previamente diluido 1:200 en buffer-TE (Tris-EDTA), se dejó incubar la placa por 3 minutos a completa oscuridad, después se procedió a la lectura, en un espectrofotómetro de fluorescencia multi-modal synergy HTX (BioTek), con excitación de 480 nm y emisión de 520 nm, se interpolaron las muestras experimentales en la curva estándar de DNAs, y mediante la ecuación de regresión lineal, se obtuvo la concentración de las muestras.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA INTEGRIDAD DE LA MEC

COLÁGENA

Tricrómica de Masson

Con esta tinción se evaluó la presencia de colágena en la MEC. Se rehidrataron las laminillas, se fijaron con solución de Bouin durante 24 horas, se enjuagaron las laminillas, para teñir los núcleos celulares con hematoxilina de Weigert por 10 min, para la tinción de citoplasma y músculo se utilizó el colorante fucsina ácida – escarlata de Briebrich por 15 min, se utilizó ácido fosfotungstico-fosfomolibdico por 10 min, para que permitiera la carga catiónica a la colágena de la solución azul de anilina, que se dejó actuar por 10 min para que la colágena total se tiñera de color azul. Se deshidrataron las laminillas y se montaron con resina para su análisis.

Herovici

Para la evaluación de la presencia de colágena tipo I y tipo III, presente en la MEC de la piel. Se tiñó con azul de celestino por 5 min, y con hematoxilina de Regaud por 5 min, estos en conjunto, realizan la tinción nuclear, para la tinción de tejido conjuntivo como queratina y músculo se utilizó amarillo de metanilo por 2 min, y para la tinción de colágena tipo III o joven se utilizó azul de metilo, además de teñir proteoglicanos y glicoproteínas, y para colágena tipo I o madura se utilizó fucsina ácida, estos dos colorantes, vienen en conjunto en la solución picropolicrómica que se mantuvo por 2 min. Finalizado esto se deshidrataron las laminillas y se montaron con resina para su análisis.

FIBRAS ELÁSTICAS

Verhoeff-Van Gieson

Para la evaluación de la presencia de fibras elásticas en la MEC. Se realizó la tinción con solución diaria de fibras elásticas Verhoeff por 15 min, se enjuagaron las laminillas, se realizó la aclaración con cloruro férrico al 2%, y se realizó la contratinción con solución Van Gieson, hasta diferenciar las fibras elásticas. Se deshidrataron las laminillas y se montaron con resina para su análisis.

TOMA DE FOTOGRAFÍAS

La toma de fotos se realizó en un microscopio Axio Imager.Z2 Zeiss, para las tinciones histológicas se utilizó microscopia óptica, y para la tinción fluorescente Hoechst, se usó microscopia de fluorescencia. Las imágenes se tomaron a aumentos de 10X y 40X por triplicado para cada muestra.

ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE LOS COMPONENTES DE LA MEC

Para realizar el análisis semicuantitativo se utilizó el software de procesamiento y análisis de imagen *Image J* (National Image Health), fueron utilizadas las imágenes al aumento de 10X, donde se cuantificó el área total del tejido, y el área de las zonas de interés según la tinción evaluada, siendo para H&E los núcleos, para la tinción tricrómica de Masson la colágena total, para Herovici la colágena tipo I y III, y para Verhoeff – Van Gieson las fibras elásticas, esta zona de interés fue obtenida en porcentaje, y posteriormente graficada para la comparación de la muestra acelular con respecto a la muestra control.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó a cada uno de los resultados, para los experimentos de cuantificación de DNA de doble cadena, el análisis semicuantitativo de los componentes nucleares y de la MEC, empleando el programa estadístico IBM SPSS Statistics. Para determinar si hubo diferencias significativas entre la muestra acelular, con respecto a la muestra control, se realizó la prueba “t” de Student, con significancia de $p < 0.05$

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Piel de cerdo adulto

Se obtuvieron 6 muestras de PCA de aproximadamente un área total de 600 cm² cada una, con poco pelo, debido al proceso de escaldado y depilado, que se aplica para su comercialización, además no contaba con abundante tejido graso (**Figura 13**).



Figura 13. Piel de cerdo adulto (PCA), recién obtenida, de la zona dorsal.

Piel de cerdo neonato

Para la piel de cerdo neonato (PCN), se sacrificaron 6 cerdos, que no cumplieron con los requisitos de peso para la supervivencia neonatal. Después de ser sacrificados, se procedió a extraer la piel (**Figura 14**), obteniendo aproximadamente un área total de 600 cm² por animal sacrificado. La piel obtenida tenía bastante pelo, grasa subcutánea, alta elasticidad y alta labilidad.



Figura 14. Obtención de la piel de cerdo neonato (PCN), en quirófano.

DESCELULARIZACIÓN DE LA MUESTRA

Piel de cerdo adulto

Después del proceso de descongelación la piel tuvo la consistencia más rígida, que perduro hasta terminado el proceso de descelularización, después de este hubo pérdida de pelo y grasa. En la muestra control (**Figura 15**) observamos con tono rosado, el color típico de la piel y la consistencia rígida, mientras en la muestra acelular, podemos observar el cambio del color a uno blanco, por la eliminación de vasos sanguíneos, y la consistencia más lábil a comparación del control.

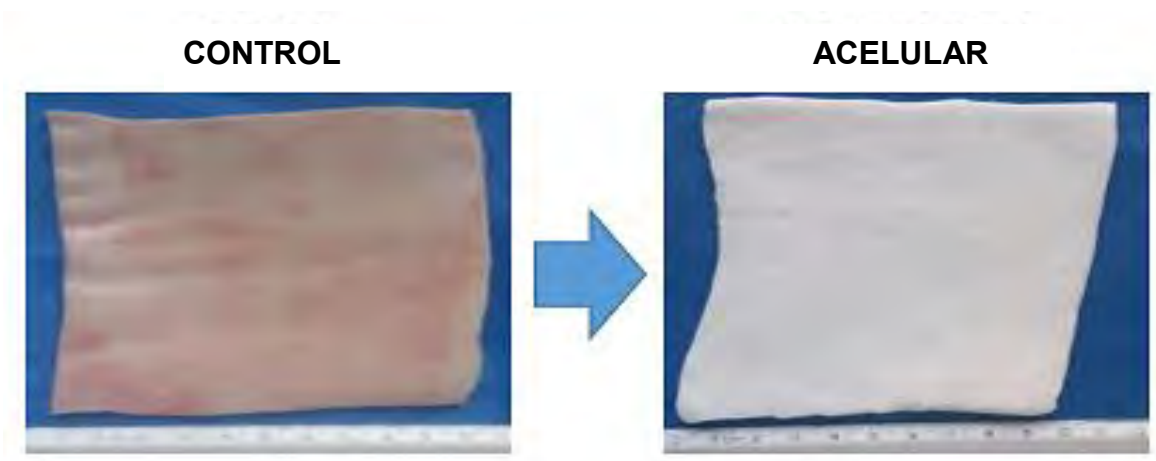


Figura 15. Características de la muestra. A la izquierda muestra la muestra control y a la derecha la muestra acelular, donde se observa un cambio en el color y en la consistencia.

Piel de cerdo neonato

Después del proceso de descongelamiento, la piel tenía el mismo aspecto físico, con el proceso de descelularización se retiró la epidermis de manera automática, y también se eliminó la grasa, gracias a los detergentes utilizados; en la muestra control la piel es rosada, mientras que al final del proceso de descelularización se observa un color blanco, además la piel al final del proceso es más lábil y su espesor disminuye, lo cual es consecuencia del proceso de descelularización (**Figura 16**).

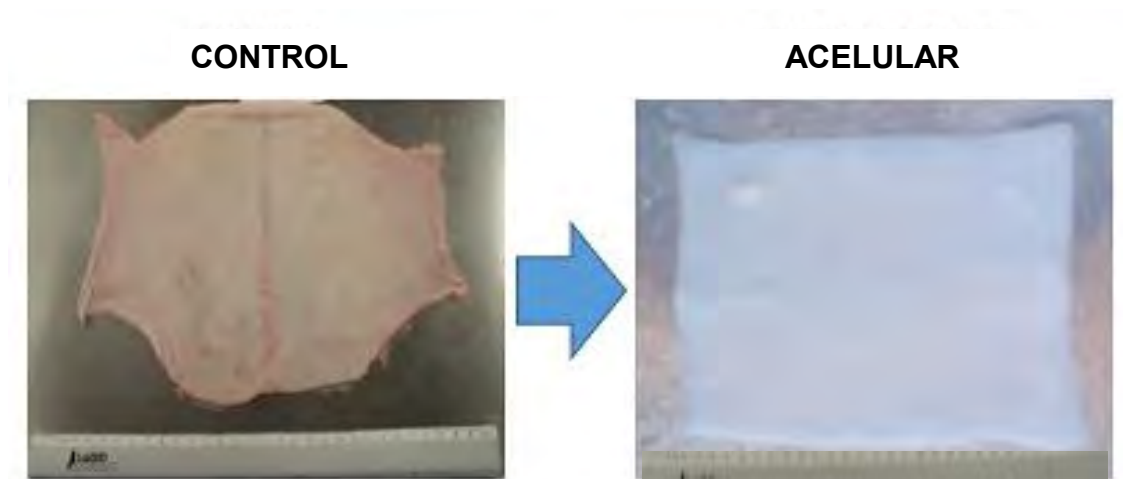


Figura 16. Características de la muestra. A la izquierda se ve la muestra control recién obtenida, a la derecha la muestra acelular, de un color blanco, más lábil y delgada, a comparación del control.

Espesor de piel de cerdo

Piel de cerdo adulto

Las muestras control de piel de cerdo adulto, presentaron en promedio un espesor de 2.87 mm, el cual disminuyó después del proceso de descelularización, con al menos 0.2 mm lo que nos indica que se removió tejido adiposo, debido a que no hay presencia de epidermis, la disminución del espesor fue mínima (**Tabla 2**).

Tabla 2. Promedio de espesor de piel de cerdo adulto, antes y después del proceso de descelularización.

Control	Acelular
2.87mm ± 0.61mm	2.58mm ± 0.44mm

Piel de cerdo neonato

El espesor de las muestras control en la piel de cerdo neonato fue de 1.86 mm, posterior al proceso de descelularización presentaron un espesor de 0.91 mm, esto es una disminución del doble. Cuando se retiró la piel del animal se mantuvo el tejido adiposo, pero en el proceso se fue eliminando así como la epidermis (**Tabla 3**).

Tabla 3. Promedio de espesor de piel de cerdo neonato, antes y después del proceso de descelularización.

Control	Acelular
1.86mm ± 0.22mm	0.91mm ± 0.25mm

EVALUACIÓN DE CRITERIOS DE DESCELULARIZACIÓN

PIEL DE CERDO ADULTO

Tinciones específicas para material nuclear: Hematoxilina & Eosina y Hoechst

Mediante la tinción H&E se aprecia en la muestra control los núcleos de color morado, redondos, e íntegros, además, de que los núcleos se muestran dispersos en todo el tejido, aunque, hay mayor congregación de estos en diferentes zonas donde se encuentran glándulas especializadas (**Figura 17,A**), esto se observa mejor con el aumento 40X (**Figura 17, B**), se confirma la ausencia de epidermis, hay presencia de folículos pilosos, y las fibras proteicas se ven más compactadas, en el análisis semicuantitativo del porcentaje nuclear para la tinción H&E se obtuvo el porcentaje de $14.03\% \pm 0.94\%$; en la muestra acelular (**Figura 17, C y D**) hay ausencia de núcleos, además de que las fibras proteicas se ven más separadas, disminuyó el porcentaje nuclear significativamente respecto al control con el porcentaje de $0.23\% \pm 0.30\%$ con $\alpha = 0.05$ (**Figura 17, I**).

Para la tinción Hoechst, se estableció el tiempo de exposición, con el motivo de exponer la fluorescencia de los núcleos en la muestra control y no la autofluorescencia de la MEC; con este mismo tiempo de exposición se tomaron fotos a las muestras acelulares, ya que en caso de haber núcleos, se observarían al mismo tiempo de exposición utilizada en la muestra control, cabe mencionar que el tiempo de exposición debe ser diferente a cada aumento (**Tabla 4**), esto debido a que a mayor aumento mayor es el acercamiento del objetivo.

Tabla 4. Tabla de tiempo de exposición utilizado para cada aumento.

Aumento	Tiempo de exposición (ms)
10X	1424
40X	140

En las muestras controles y acelulares se ocupa el mismo tiempo de exposición, dependiendo el aumento.

Mediante la tinción fluorescente Hoechst, podemos observar en la muestra control (**Figura 17,E y F**), la presencia de núcleos teñidos en color azul, los cuales se ven distribuidos en todo el tejido, aumentando su concentración en glándulas, anexos cutáneos y folículos pilosos, con un porcentaje nuclear de $16.13\% \pm 3.49\%$; en la muestra acelular (**Figura 17, G y H**), no hay presencia de núcleos, pero se pueden observar pequeños rezagos de fluorescencia, que no son íntegros como en la muestra control; respecto al porcentaje nuclear en la muestra acelular podemos indicar que es significativamente diferente respecto a la muestra control con un porcentaje de $1.71\% \pm 1.25\%$, con $\alpha=0.05$ (**Figura 17, J**), esto nos indica una correcta descelularización mediante tinciones específicas a material nuclear.

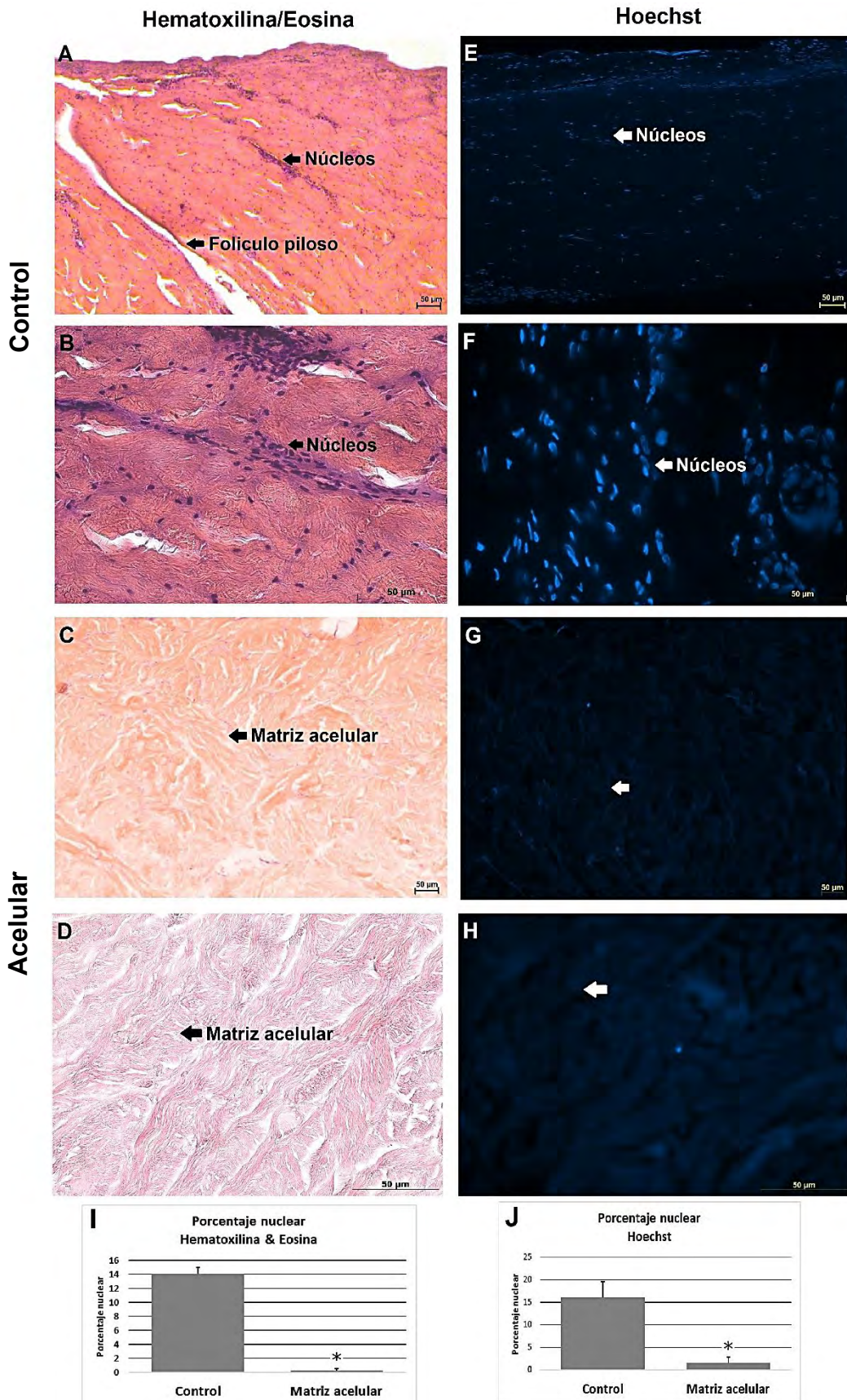


Figura 17. La matriz acelular de adulto no presenta núcleos visibles. Tinción H&E. Muestra control, se observa la ausencia de epidermis, la presencia de núcleos íntegros de color morado y una MEC compacta (A y B). Muestra acelular, se observa la ausencia de núcleos y fibras proteicas más separadas (C y D). Tinción fluorescente Hoechst. Muestra control, donde se observa la presencia de núcleos, en todo el tejido (E y F); muestra acelular, donde hay ausencia de núcleos (G y H). Análisis semicuantitativo de la tinción H&E y tinción fluorescente Hoechst, muestras controles y acelulares, con diferencias significativas *, mediante la prueba "t" de Student con $\alpha=0.05$ (I y J). Escala = 50 µm.

Cuantificación de DNA

Se realizó la lectura obteniendo la concentración y pureza del DNA (Nanodrop 2000c), n=6, por triplicado, obteniendo mayor concentración de DNA en la muestra control que en la muestra acelular, y la pureza resulto muy similar en la muestra control y acelular. La pureza indica que las muestras no están contaminadas con otros componentes, siendo un buen valor entre 1.8 y 2.0. (**Tabla 5**).

Tabla 5. Concentración y pureza de las muestras control y acelular de PCA.

Muestra	Concentración (ng/ μ l)	Pureza 260/280 nm
Control	72.73 \pm 8.43	1.91 \pm 0.10
Acelular	5.38 \pm 2.27	1.93 \pm 0.11

Tamaño de remanente de DNA

Podemos observar que la muestra control (**Figura 18**) posee gran cantidad de DNA genómico que no migra debido a su alto peso molecular, mientras que en la muestra acelular, no se observa el remanente de DNA, lo que indica que es muy pequeño, menor a 50 pares de bases (pb), comparándolo con el marcador de peso molecular.

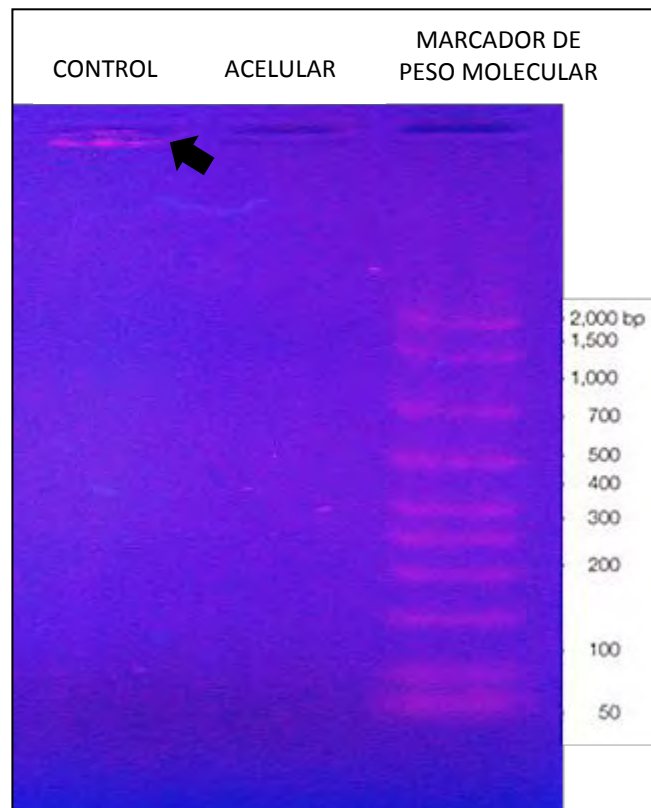


Figura 18. La matriz acelular presenta un remanente de DNA por debajo de los 200 pb. Se observa el DNA de alto peso molecular en la muestra control (Flecha negra), seguido de la ausencia de DNA, de la muestra acelular, y por último el marcador de peso molecular (MPM) que va desde 2000 hasta 50 pb.

Cuantificación de DNA de doble cadena

Para la curva patrón se obtuvo una R^2 de 0.9989, lo que indica que tiene tendencia lineal y es confiable para extrapolar los datos obtenidos en la muestra problema (**Figura 19, A**).

Para la muestra control se obtuvo la concentración de DNAs de $201.26 \text{ ng/mg} \pm 31.58 \text{ ng/mg}$ de peso, lo que nos indica gran concentración de DNA; mientras que en la muestra acelular, se obtuvo la concentración de $14 \text{ ng/mg} \pm 18.58 \text{ ng/mg}$ de peso indicando que la cantidad de DNAs es menor a 50 ng, que es el límite máximo de DNAs y siendo significativamente diferente a la muestra control con $\alpha = 0.05$ (**Figura 19, B**).

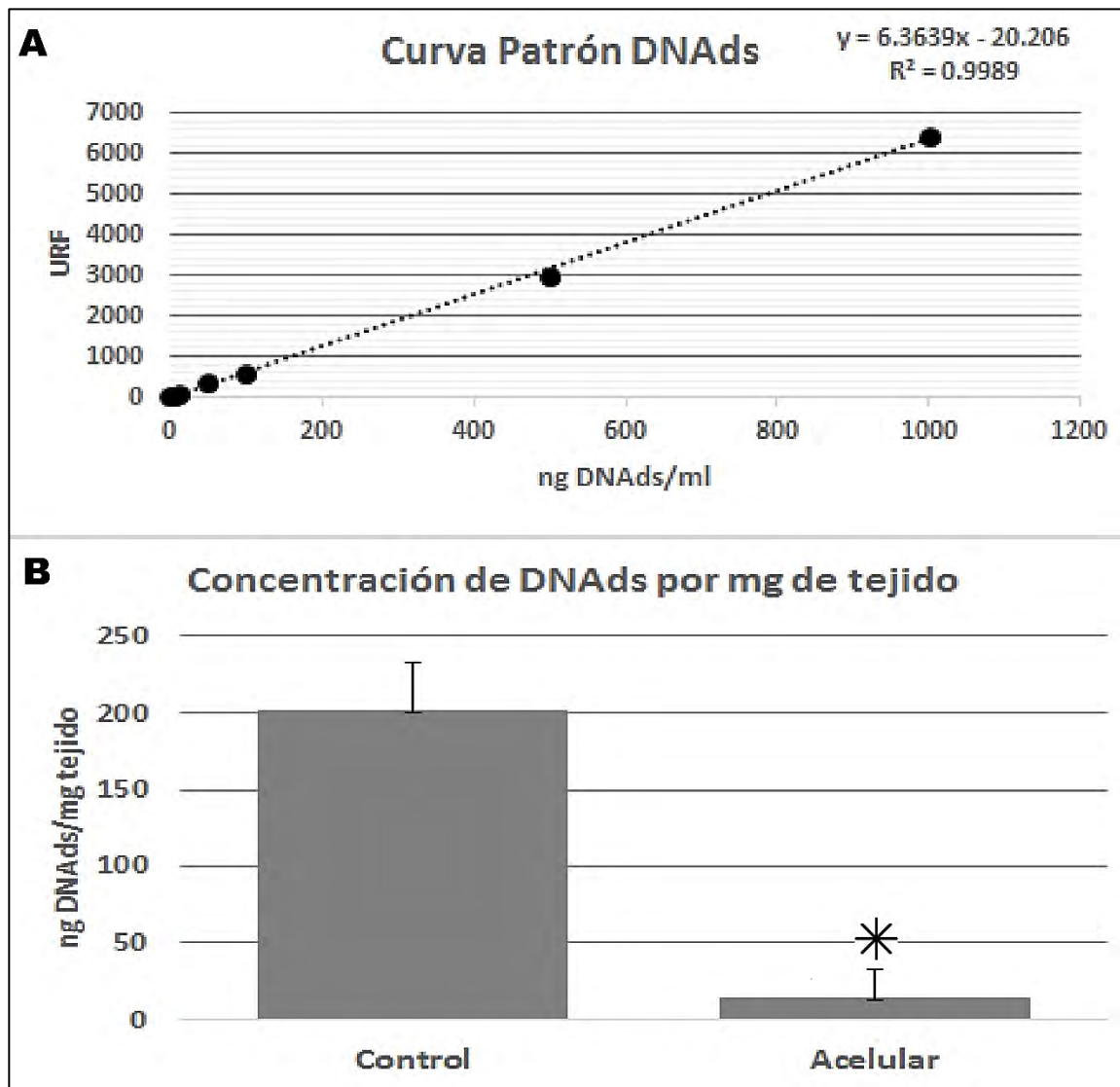


Figura 19. La concentración de DNAds es menor a 50 ng en la matriz acelular. (A) Curva patrón de DNAds, URF – Unidades Relativas de Fluorescencia. (B) DNAds obtenido en la muestra control y acelular, la concentración es significativamente diferente *, mediante la prueba “t” de Student, $\alpha=0.05$

PIEL DE CERDO NEONATO

Tinciones específicas para material nuclear: Hematoxilina & Eosina y Hoechst

En la muestra control (**Figura 22, A**) se observan las estructuras típicas de la piel, como la epidermis, folículos pilosos, glándulas sebáceas y una gran cantidad de núcleos de color morado con morfología redonda dispersos en todo el tejido, observándolos mejor al aumento de 40 X (**Figura 20, B**), siendo más abundantes en folículos pilosos y glándulas; presentando un porcentaje nuclear de $33.66\% \pm 3.04\%$; mientras que en la muestra acelular (**Figura 20, C**) no hay presencia de núcleos en el tejido, se observan los espacios vacíos de las glándulas y folículos pilosos, lo que indica que estas estructuras perdieron sus componentes celulares, además con un aumento de 40X se puede observar la separación de las fibras proteicas (**Figura 20, D**), debido al proceso de descelularización. El porcentaje nuclear es significativamente diferente al de la muestra control, con el porcentaje de $2.95\% \pm 1.62\%$ con $\alpha = 0.05$ (**Figura 20, I**). Al igual que la PCA, para la PCN se establecieron tiempos de exposición (**Tabla 6**).

Tabla 6. Tiempo de exposición determinado para la PCN, muestra control y acelular.

Aumento	Tiempo de exposición (ms)
10X	757
40X	100

La tinción fluorescente con Hoechst en la muestra control (**Figura 20, E y F**), muestra la presencia de núcleos redondos y ovalados, en todo el tejido, además de epidermis y folículos pilosos con un porcentaje nuclear del $38.34\% \pm 3.63\%$; mientras que en la muestra acelular (**Figura 20, G y H**), hay ausencia de núcleos, con un porcentaje nuclear de $1.99\% \pm 1.54\%$, lo cual es estadísticamente significativo con respecto a la muestra control $\alpha = 0.05$ (**Figura 20, I**).

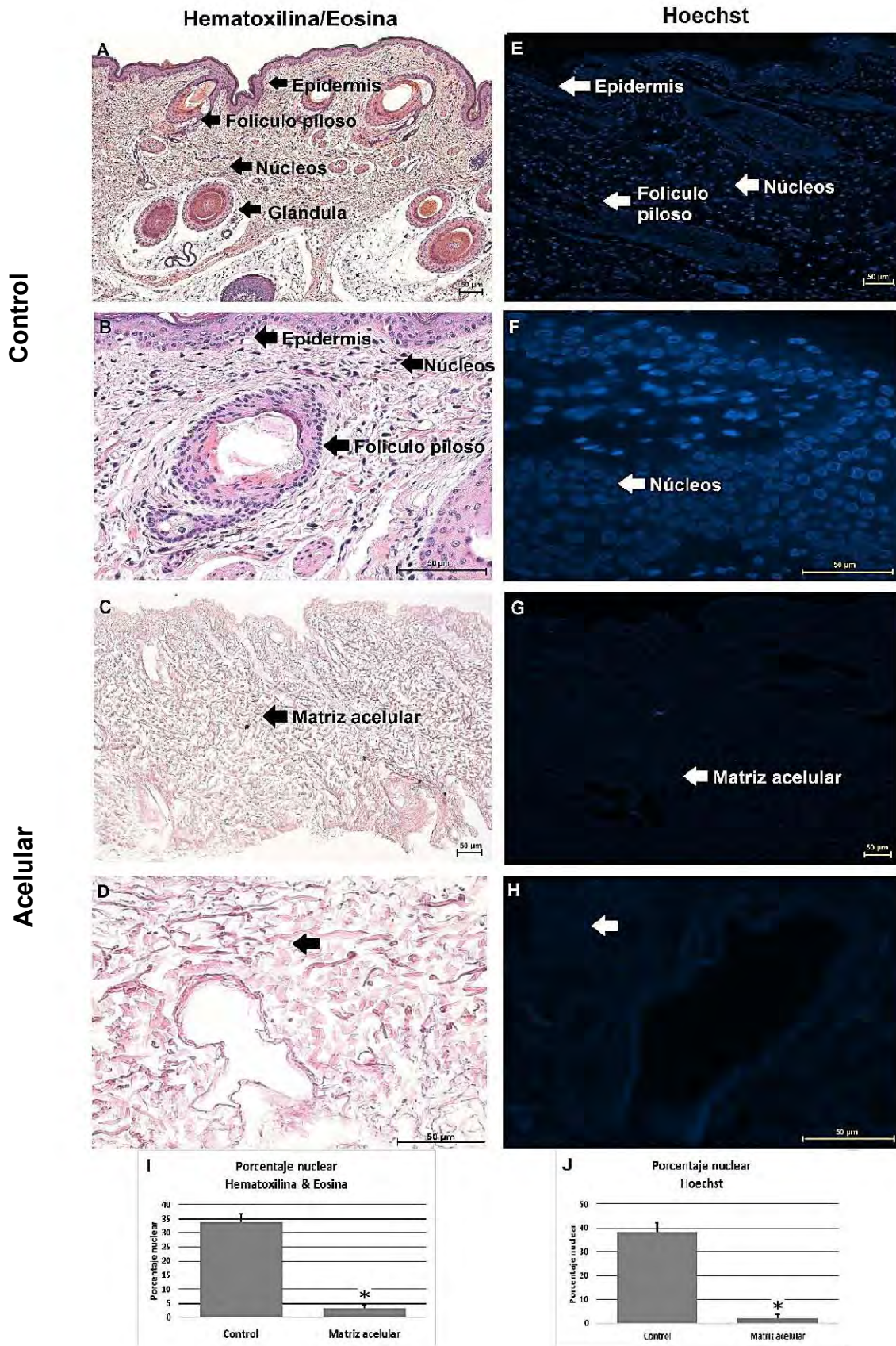


Figura 20. La matriz acelular de neonato no presenta núcleos visibles. Tinción H&E. Muestra control, donde se observa la presencia de núcleos principalmente con morfología redondeada e íntegros, además de epidermis, folículos pilosos y glándulas (A y B). Muestra acelular, donde se observa la ausencia de núcleos y fibras proteicas más separadas, además de ausencia de epidermis (C y D). Tinción fluorescente Hoechst. Muestra control, donde se observa la presencia de núcleos íntegros y en todo el tejido (E y F); muestra acelular, donde hay ausencia de núcleos (G y H). Análisis semicuantitativo, tinción H&E y tinción fluorescente Hoechst, muestras controles y acelular, con diferencias significativas *, mediante la prueba “t” de Student con $\alpha=0.05$ (I y J). Escala = 50 μm .

Cuantificación de DNA

Se determinó la concentración y pureza del DNA, n=6, por triplicado (**Tabla 7**), obteniendo mayor concentración de DNA en la muestra control (84.88 ± 7.23), que en la muestra acelular (9.05 ± 1.73), obteniendo una pureza muy similar en la muestra control y acelular, lo que nos indica que las muestras no están contaminadas con otros componentes.

Tabla 7. Concentración y pureza de las muestras control y acelular de PCN.

Muestra	Concentración (ng/ μ l)	Pureza 260/280 nm
Control	84.88 ± 7.23	1.87 ± 0.12
Acelular	9.05 ± 1.73	1.87 ± 0.05

Tamaño de remanente de DNA

Se pudo observar que el control (**Figura 21**) posee gran cantidad de DNA genómico que no migra debido a su alto peso molecular, mientras que en la muestra acelular no se observa el tamaño de remanente de este DNA, lo que indica que es muy pequeño, menor a 50 pares de bases (pb), comparándolo con el marcador de peso molecular.

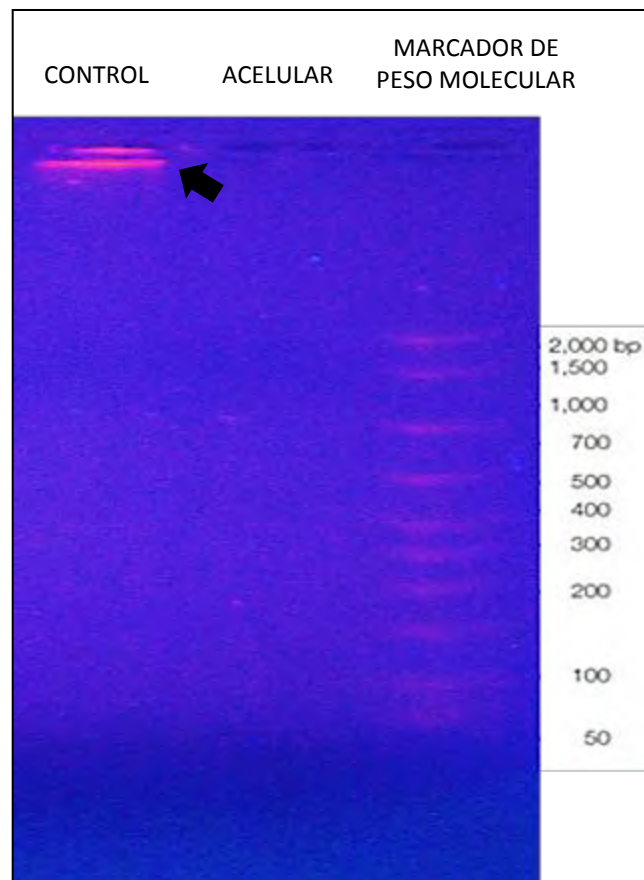


Figura 21. La matriz acelular presenta remanente de DNA por debajo de los 200 pb. Se observa el DNA de alto peso molecular en la muestra control (Flecha negra), seguido de la ausencia de DNA, de la muestra acelular, y por último el marcador de peso molecular (MPM) que va desde 2000 hasta 50 pb.

Cuantificación de DNA de doble cadena

Para la curva patrón se obtuvo una R^2 de 0.9989, lo que indica que tiene tendencia lineal y es confiable para extrapolar los datos obtenidos en la muestra problema (**Figura 22, A**).

En la muestra control se obtuvo la concentración de DNAs de $190.99 \text{ ng/mg} \pm 10.81 \text{ ng/mg}$ de peso, siendo la concentración muy alta, respecto a la muestra acelular, con la concentración de DNAs de $4.22 \text{ ng/mg} \pm 1.17 \text{ ng/mg}$ de peso de tejido descelularizado, lo que nos indica que la cantidad de DNAs es menor a los límites establecidos de 50 ng/mg de peso de tejido descelularizado, y siendo significativamente diferente, respecto a la muestra control con $\alpha = 0.05$ (**Figura 22, B**).

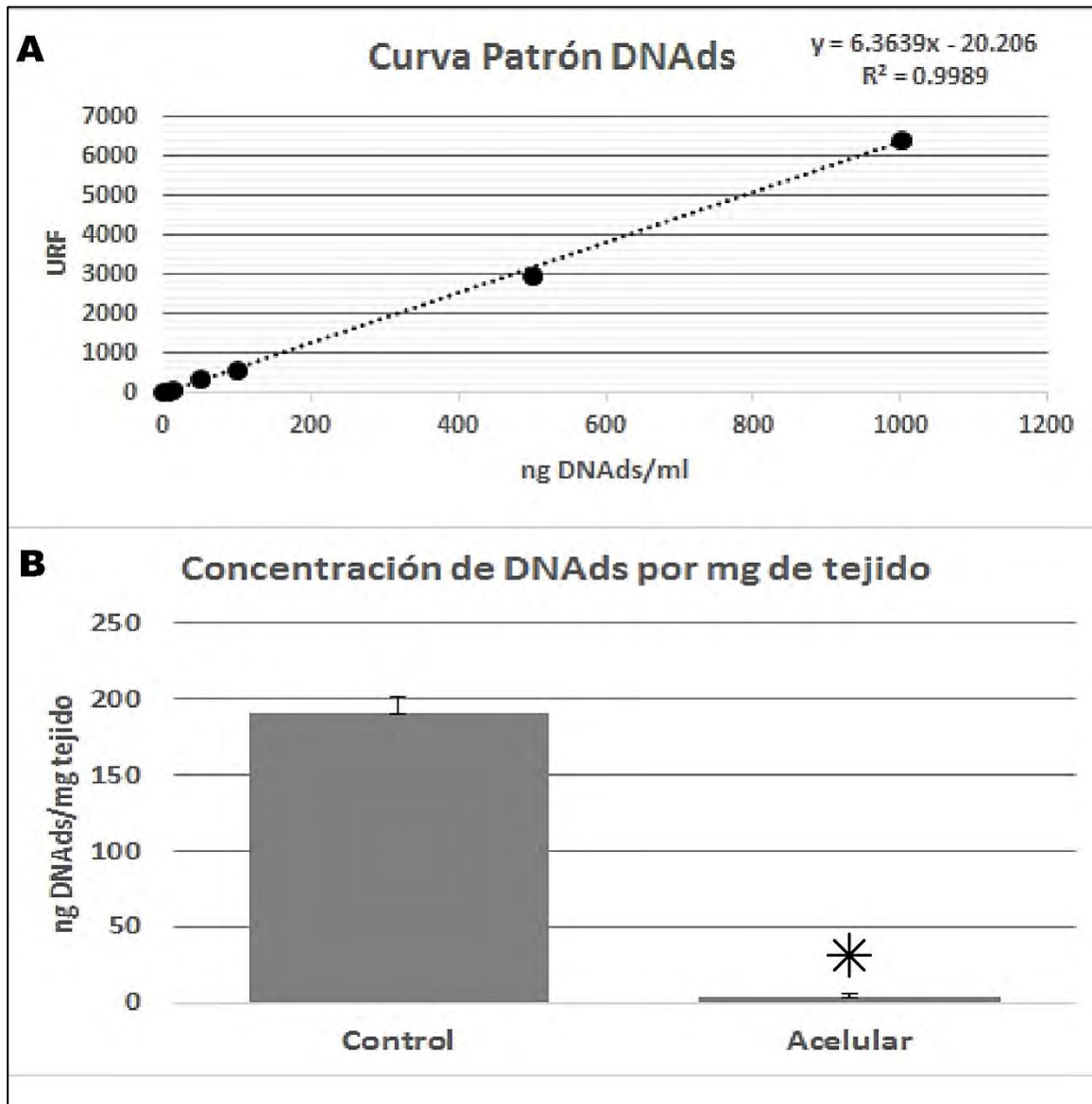


Figura 22. La concentración de DNAds es menor a 50 ng en la matriz acelular. (A) Curva patrón de DNAds, URF – Unidades Relativas de Fluorescencia. (B) DNAds obtenido en la muestra control y acelular, la concentración es significativamente diferente *, mediante la prueba “t” de Student, $\alpha=0.05$

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA INTEGRIDAD DE LA MEC

Piel de Cerdo Adulto

Tricrómica de Masson

Para observar la presencia de colágena total, se utilizó la tinción Tricrómica de Masson, como se puede observar en la muestra control (**Figura 23, A y B**), la colágena total en azul se ve muy homogénea, también se logran apreciar los núcleos de color marrón oscuro y algunas glándulas especializadas en todo el tejido, mientras que en la muestra acelular (**Figura 23, C y D**) no se observan núcleos, pero se observa la misma homogeneidad en la colágena, aunque las fibras de colágena están más separadas entre sí debido al procesamiento al que fue sometida la MEC, lo que nos indica la retención de colágena de la matriz acelular, observándolo de igual manera mediante el análisis semicuantitativo (**Figura 23, E**), con un porcentaje de la muestra control de $81.76\% \pm 5.85\%$ y de la muestra acelular de $80.37\% \pm 7.6\%$.

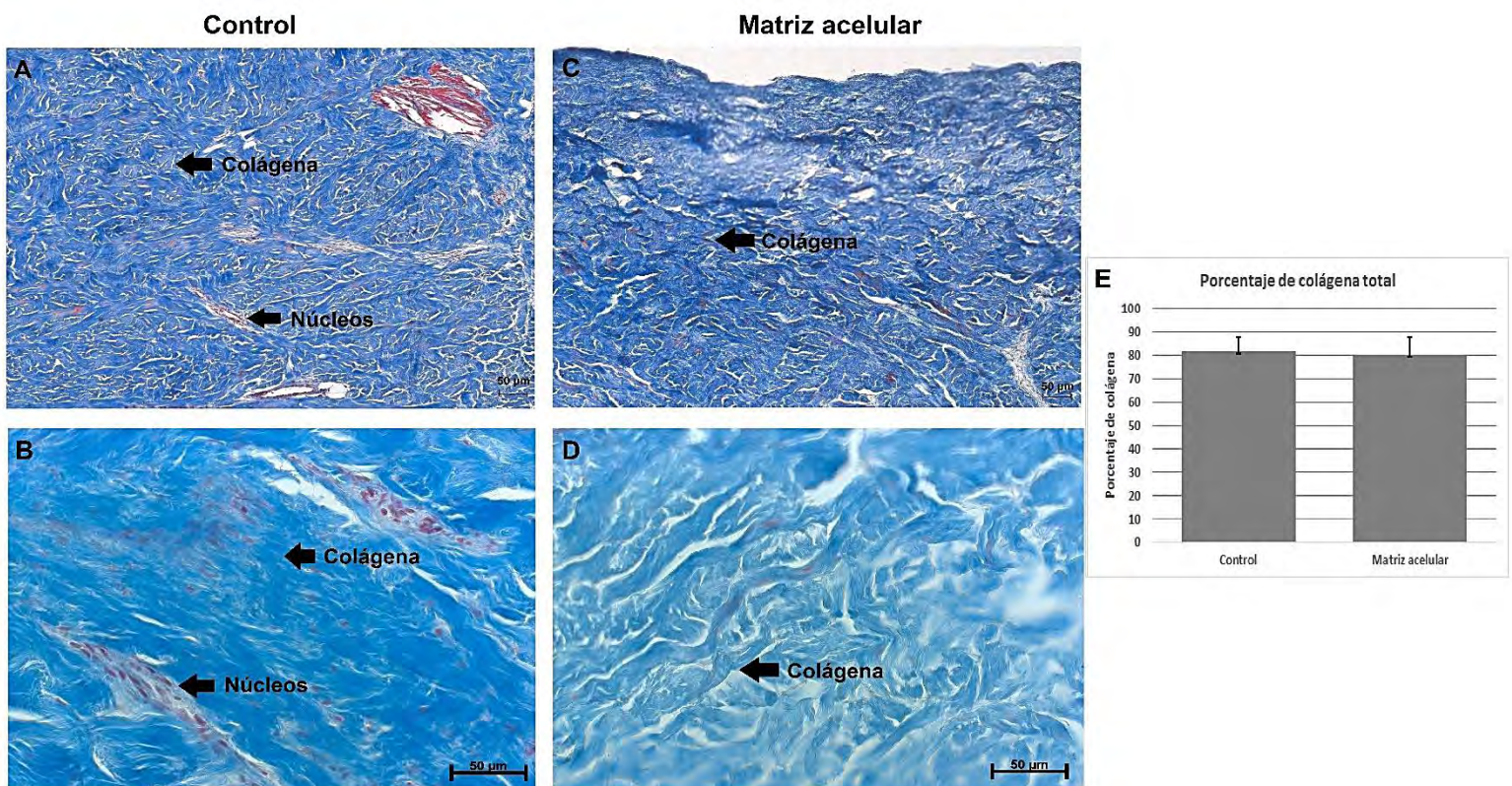


Figura 23. Presencia de colágena total. Muestra control, donde se observan la colágena en azul, núcleos en marrón oscuro y glándulas especializadas (A y B). Muestra acelular, donde se observa la ausencia de núcleos y la abundante presencia de colágena, después del proceso de descelularización, aunque más laxa (C y D). Análisis semicuantitativo, con el porcentaje de colágena total graficado, donde no se observan diferencias significativas entre la muestras control y acelular, mediante la prueba "t" de Student, con $\alpha=0.05$ (E).

Escala = 50 μm.

Herovici

La tinción Herovici, nos permite diferenciar entre colágena tipo I y tipo III, los principales tipos de colágena y más abundantes en la piel, en la muestra control (**Figura 24, A y B**), se puede observar la gran cantidad de colágena tipo I en rojo y muy compactada, mientras que en azul se tiñe la colágena tipo III y los núcleos de un color negro, también en esta tinción se tiñen de color amarillo glándulas sebáceas y queratina, principalmente, mientras que en la muestra acelular (**Figura 24, C y D**), se observa la colágena tipo I más laxa, se mantiene la presencia de colágena tipo III, la matriz se nota más separada entre fibras proteicas, debido al proceso de descelularización, mediante el análisis semicuantitativo (**Figura 24, E**), con el porcentaje de la muestra control para colágena tipo I respectivamente de $73.56\% \pm 12.03$, y tipo III $20.33\% \pm 5.31$ y para la muestra acelular el porcentaje de la colágena tipo I fue de $65.42\% \pm 4.87\%$ y de tipo III de $21.54\% \pm 6\%$.

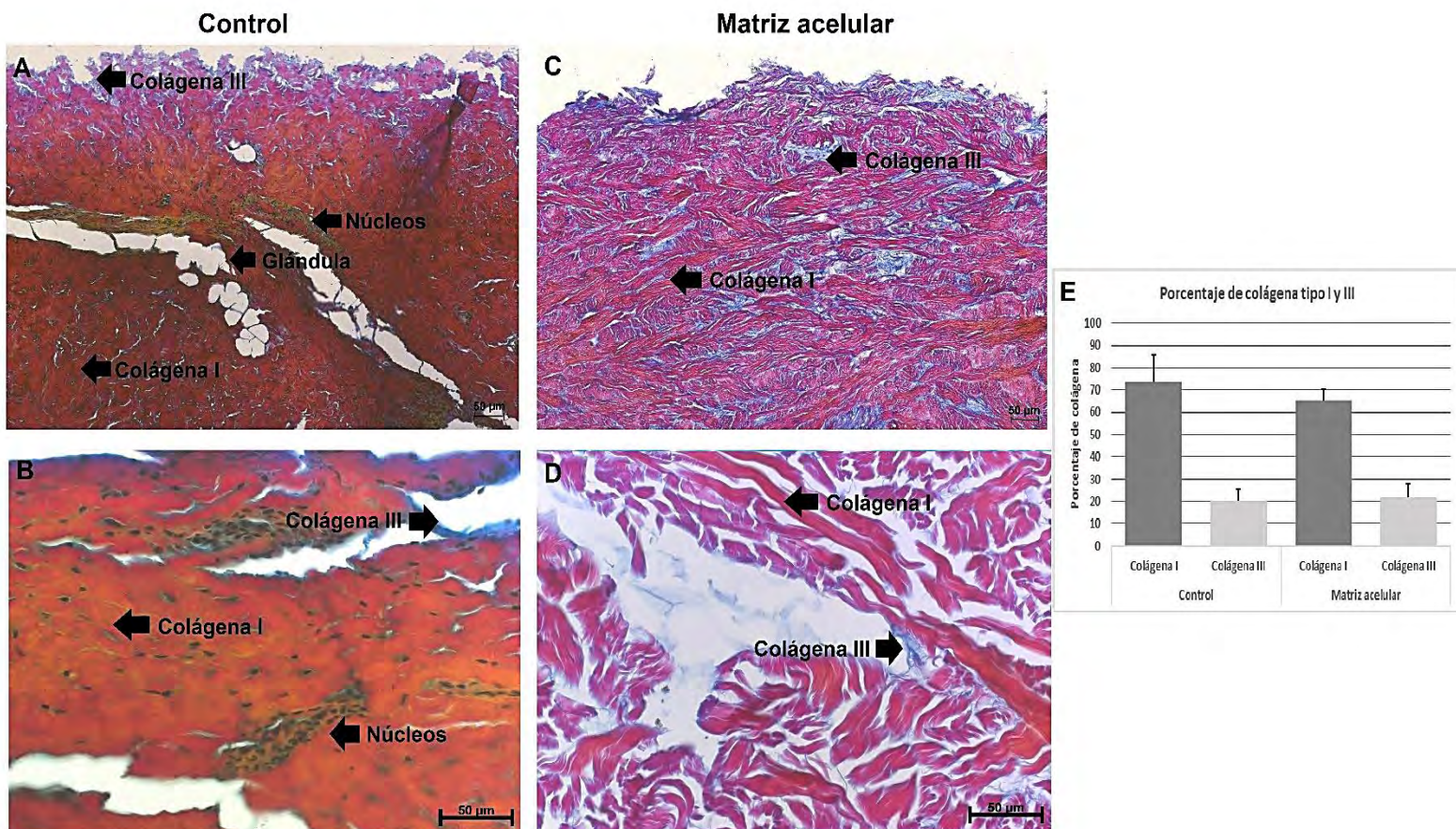


Figura 24. Presencia de colágena tipo I y III. Muestra control, en color negro observamos núcleos, color amarillo glándulas, rojo colágena tipo I y azul tipo III (A y B). Muestra acelular, donde observamos la disposición de colágena tipo I y de colágena tipo III, aunque ya no de núcleos, también la MEC se observa más laxa (C y D). Análisis semicuantitativo, con el porcentaje de colágena tipo I y III graficado, donde no se observan diferencias significativas entre las muestras control y acelular, mediante la prueba "t" de Student, con $\alpha=0.05$ (E). Escala = 50 μm .

Verhoeff - Van Gieson

Con esta tinción podemos observar las fibras elásticas de un color negro muy delineado, y los núcleos de color negro igualmente y la matriz extracelular de un color rosa tenue, en la muestra control (**Figura 25, A y B**), se observa la presencia de la gran cantidad de fibras elásticas, y también de núcleos, mientras que en la muestra acelular (**Figura 25, C y D**), se siguen manteniendo las fibras elásticas, pero en menor cantidad respecto al control, mediante el análisis semicuantitativo (**Figura 25, E**) se observaron diferencias significativas de la muestra acelular $5.32\% \pm 2.05\%$ con respecto a la muestra control $9.78\% \pm 1.67\%$, $\alpha=0.05$.

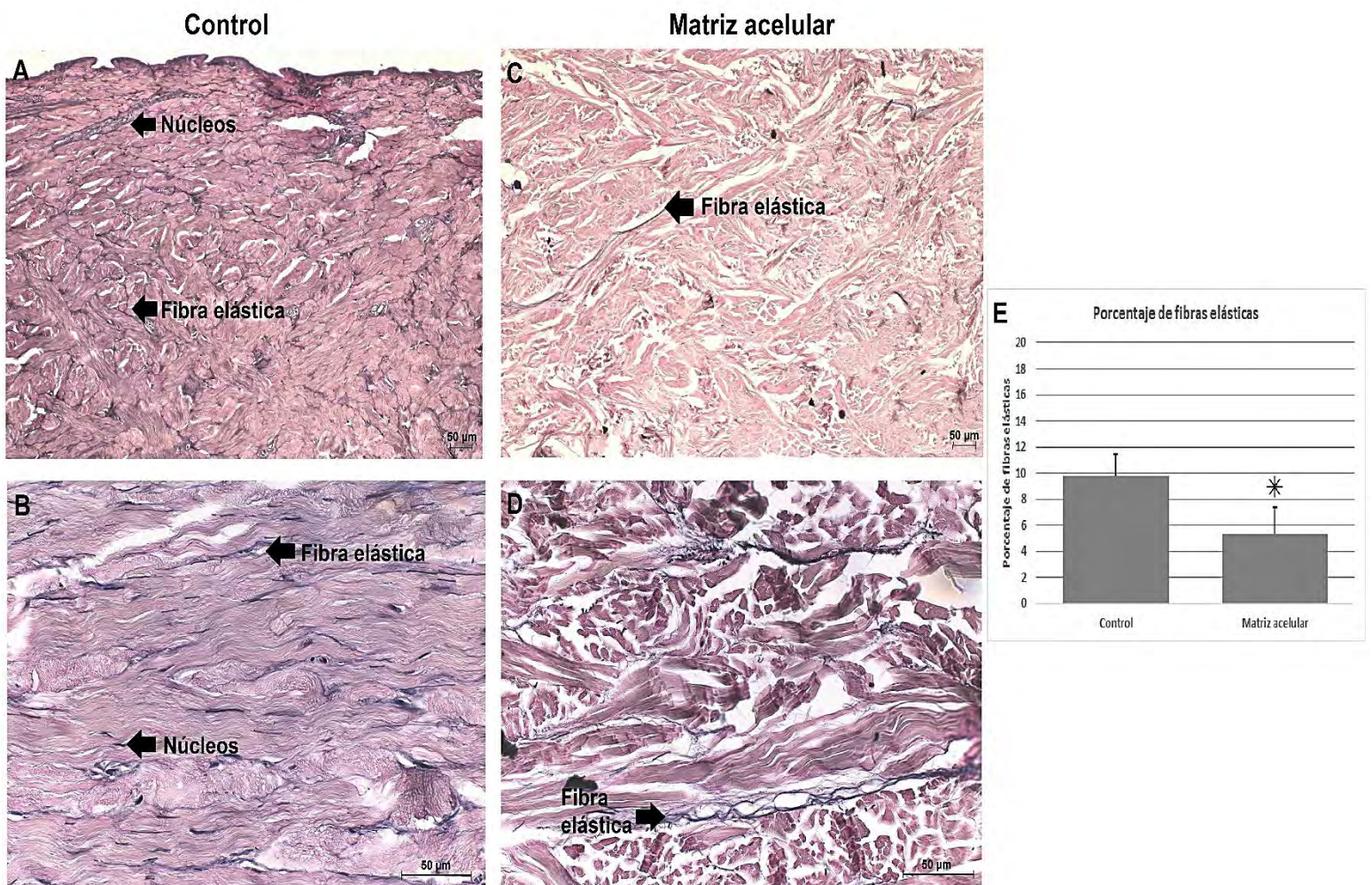


Figura 25. Presencia de fibras elásticas. Muestra control, donde se observa la presencia de núcleos y fibras elásticas delineadas de color negro (A y B). Muestra acelular, donde se observa la ausencia de núcleos, y la presencia de algunas fibras elásticas (C y D). Análisis semicuantitativo, con el porcentaje de fibras elásticas graficado, donde hay diferencias significativas *, entre la muestras control y acelular, mediante la prueba "t" de Student, con $\alpha=0.05$ (E). Escala = 50 μm .

Piel de Cerdo Neonato

Tricrómica de Masson

En la muestra control (**Figura 26, A y B**), se observan los núcleos de color marrón oscuro, también se observan algunas estructuras de la piel, como la epidermis, folículos pilosos, glándulas especializadas, entre otras, la colágena no se observa tan compacta, y de una intensidad tenue, mientras que la muestra acelular (**Figura 26, C y D**), no se observa ninguna de las estructuras de la muestra control, en cambio donde se encontraban folículos y glándulas hay espacios, la colágena se ve de una intensidad tenue, igual que en el control, demostrando que se obtiene una matriz de colágena, observándolo de igual manera mediante el análisis semicuantitativo (**Figura 26, E**) con el porcentaje de la muestra control de $87.22\% \pm 15\%$ y de la muestra acelular de $78.3\% \pm 13.53\%$.

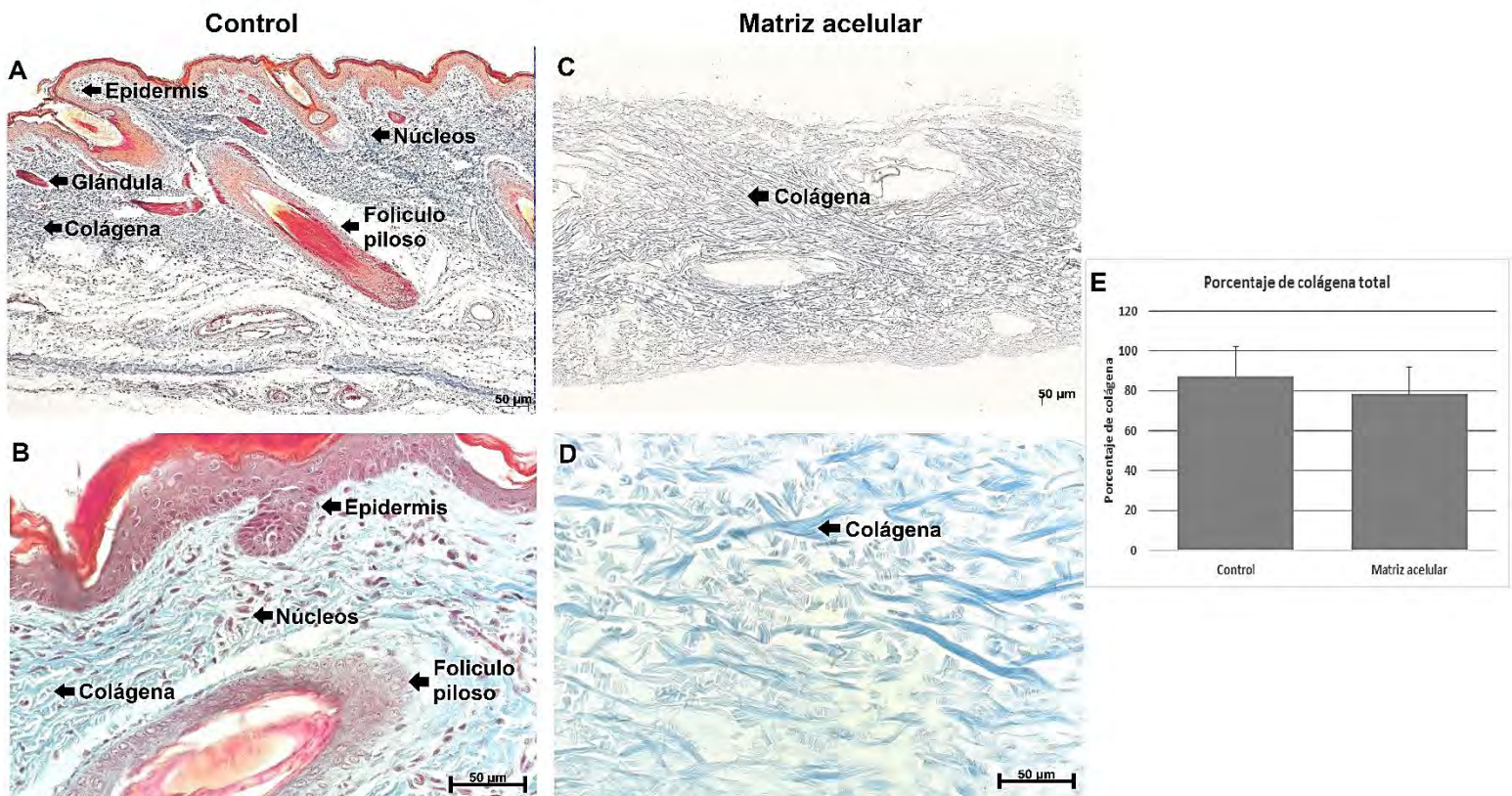


Figura 26. Presencia de colágena total. Muestra control, donde se observa epidermis y folículos y glándulas en rojo, pelo en amarillo, núcleos de color marrón oscuro y colágena total en azul (A y B). Muestra acelular, donde solo se observa la colágena total en azul, y la ausencia de núcleos en el tejido y en glándulas especializadas (C y D). Análisis semicuantitativo, con el porcentaje de colágena total graficado, donde no se observan diferencias significativas entre la muestras control y acelular, mediante la prueba "t" de Student, con $\alpha=0.05$ (E). Escala = 50 μm .

Herovici

Con la tinción Herovici, podemos observar en la muestra control (**Figura 27, A y B**) núcleos de color negro, queratina y adipocitos de color amarillo, epidermis, glándulas y colágena tipo I de color rojo, y de azul la colágena tipo III, se puede notar la abundancia en su mayoría de colágena tipo III, esto debido a que es un organismo joven, mientras que en la muestra acelular (**Figura 27, C y D**) se observa colágena tipo III en su mayoría que colágena tipo I, no hay presencia de núcleos; mediante el análisis semicuantitativo (**Figura 27, E**), con el porcentaje de la muestra control para colágena tipo I de $26.22\% \pm 6.64\%$, y tipo III $58.1\% \pm 12.47\%$ y para la muestra acelular la colágena tipo I de $19.63\% \pm 7.53\%$ y de tipo III de $61.92\% \pm 7.73\%$.

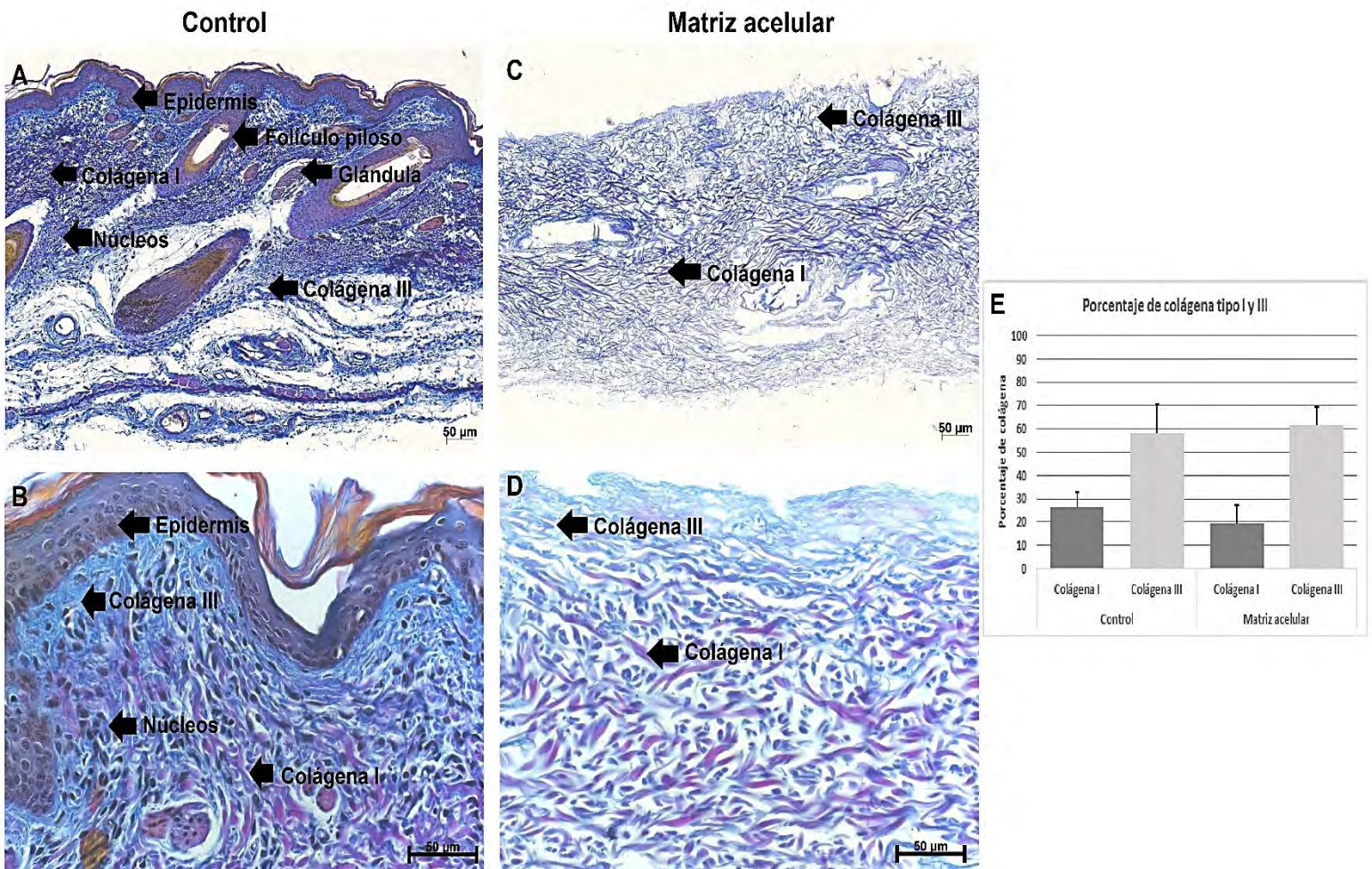


Figura 27. Presencia de colágena tipo I y III. Muestra control, donde se observa la presencia de núcleos en color negro, epidermis, queratina, folículos, glándulas y adipocitos en color amarillo, colágena tipo I en rojo, colágena tipo III en color azul (A y B). Muestra acelular, donde solo hay presencia de colágena tipo I y III (C y D). Análisis semicuantitativo, con el porcentaje de colágena tipo I y III graficado, donde no se observan diferencias significativas entre las muestras control y acelular, mediante la prueba "t" de Student, con $\alpha=0.05$ (E). Escala = 50 μm .

Verhoeff – Van Gieson

Se observó en la muestra control (**Figura 28, A y B**), los núcleos, epidermis, folículos y glándulas de color negro, al igual que las fibras elásticas, pero lo que las diferencia es su delineado, esto se observa mejor al aumento de 40X (**Figura 28, B**); en la muestra acelular (**Figura 28, C y D**) se observa la ausencia de núcleos y de otras estructuras características de la piel, y la presencia de fibras elásticas aunque a comparación del control hay menor presencia de estas, mediante el análisis semicuantitativo (**Figura 28, E**), se observaron diferencias significativas de la muestra acelular $7.84\% \pm 1.18\%$ con respecto a la muestra control $17.36\% \pm 5.23\%$, $\alpha=0.05$.

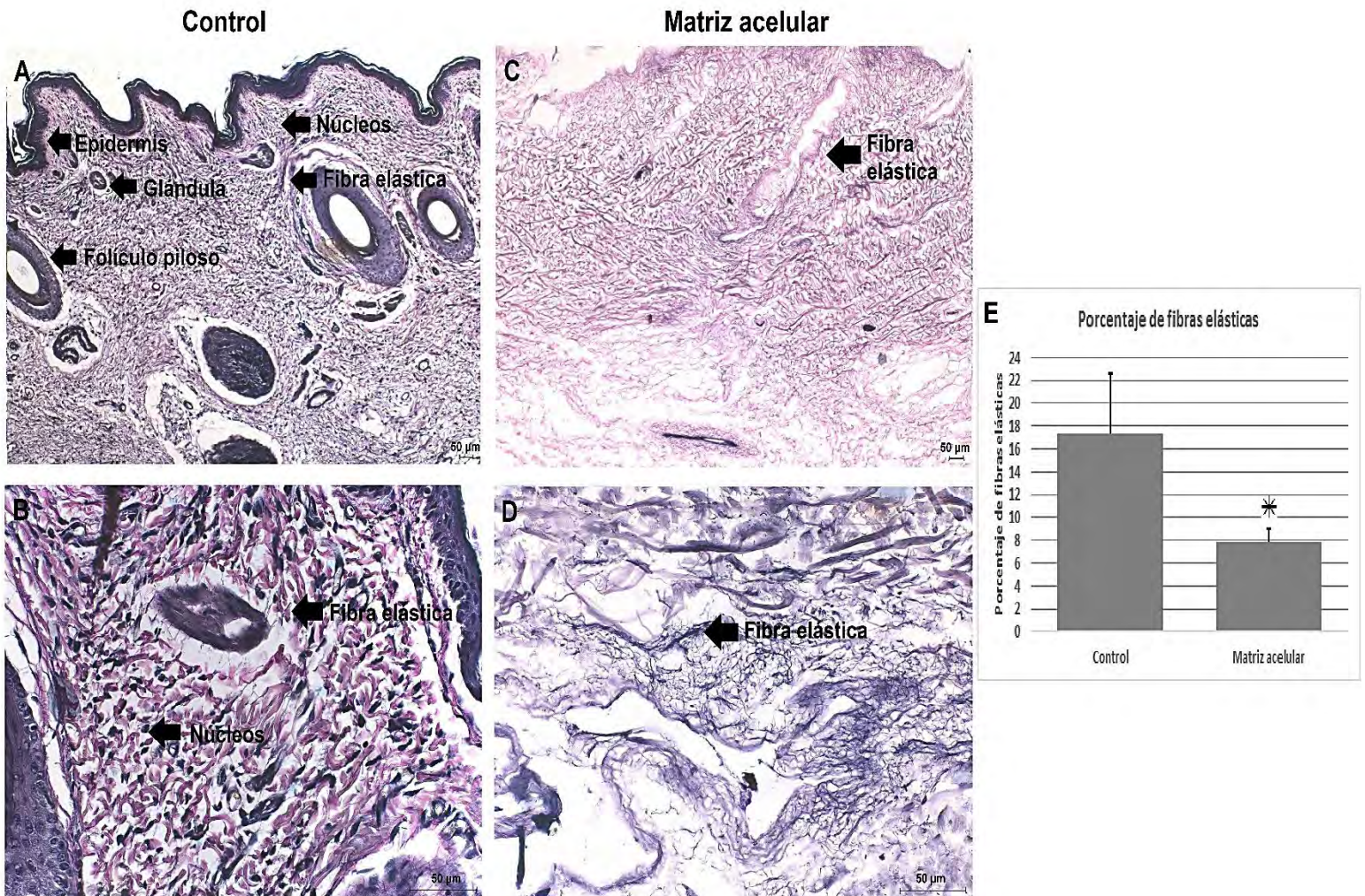


Figura 28. Presencia de fibras elásticas. Muestra control, donde se observa la presencia de núcleos y fibras elásticas delineadas de color negro (A y B). Muestra acelular, donde se observa la ausencia de núcleos, y la presencia de algunas fibras elásticas (C y D). Análisis semicuantitativo, con el porcentaje de fibras elásticas graficado, donde hay diferencias significativas *, entre la muestras control y acelular, mediante la prueba "t" de Student, con $\alpha=0.05$ (E). Escala = 50 μm .

DISCUSIÓN

La piel de cerdo, posee una MEC conformada por proteínas estructurales y funcionales, que le otorgan soporte celular, fuerza tensil, unión a sitios receptores de superficie celular, reservorios de factores de señalización que modulan diversos procesos como la angiogénesis y vasculogénesis, además de migración, proliferación, orientación, inflamación celular, respuesta inmune y reparación de la lesión (Badylak, 2002). Además la MEC es un componente vital, dinámico e indispensable de todos los órganos y tejidos, el cual ha sido utilizado como andamio natural, para el mantenimiento, morfogénesis y reconstrucción de heridas (Bonnans *et al.*, 2014).

Para la descelerización de piel de cerdo adulto es necesario obtener la piel con dermatomo, para poder separar la epidermis de la dermis, según Métodos y Protocolos de cultivo celular 3D de Springer Protocols 2017, se menciona que en algunos mataderos se puede vender, solo la dermis de la piel, lo cual en este estudio se obtuvo de esa manera, ya que al realizar diferentes tinciones, en la muestra control, no pudimos observar la presencia de epidermis (Brown *et al.*, 2017).

Para obtener una MA de PCN, se seleccionaron cerdos neonatos que no cumplieron con el peso de supervivencia neonatal establecido como en el trabajo de Chiarini *et al.*, 2007. El protocolo, para la obtención de muestra fue diseñado por el equipo de trabajo de la UITTC y MR, del INR LGII. Siendo esta la primera vez que se describe el proceso de descelerización para la piel de cerdo neonato, estableciendo resultados similares a otros estudios de descelerización.

Con respecto al espesor de la piel antes y después del proceso de descelerización, en la mayoría de los estudios realizados en piel de cerdo adulto como el de Reing *et al.*, 2010 y Ge *et al.*, 2009, mencionan que utilizan un dermatomo, para obtener solo la dermis obteniendo un promedio de espesor de 1 mm a 1.5 mm, y al final del proceso de descelerización no mencionan el espesor obtenido, en el estudio de Turner *et al.*, 2014, mencionan el espesor de la piel inicial, siendo de 2.5 mm, aunque no realizan un proceso de descelerización por lo tanto

no obtienen un espesor de una MA; el espesor de la piel es muy importante al momento de obtener una MA de piel de cerdo, ya que dependiendo la lesión será el espesor deseado y conociendo el espesor de nuestra MA puede ser utilizada en diferentes tratamientos. En la reparación de ligamentos, se utilizan MA con un espesor aproximado de 2 mm, ya que es un tejido compacto (Lamme *et al.*, 2016), aquí podría ser de utilidad esta MA de PCA; que posee un espesor final de 2.58 mm (**Tabla 2**), observándose una disminución mínima del grosor de la piel de cerdo adulto en la MA, probablemente debida a la remoción de tejido adiposo.

En el estudio de Chiarini *et al.*, 2007 mencionan que el espesor de la PCN fue aproximadamente de 1.5 mm, aunque no se realiza un proceso de descelularización, siendo similar a nuestros resultados, ya que en la muestra control se obtuvo 1.86 mm, además que por primera vez se midió el espesor de una MA de PCN siendo de 0.91 mm (**Tabla 3**). Para lesiones de espesor parcial y en reparación de hernias es mejor utilizar un espesor delgado de aproximadamente 1 mm (Seaton *et al.*, 2015) donde nuestra MA de PCN podría ser ideal para ser utilizada en este tipo de tratamiento.

La MA de fuente xenogénica utilizada como andamio para el remplazo o reconstitución de diferentes tejidos, requiere la remoción de componentes celulares, estas MA, pueden utilizar fuentes celulares autólogas o heterólogas para desarrollar un ambiente capaz de permitir la viabilidad del andamio con las células y así poder lograr la reparación de un tejido (Badylak, 2002).

Para la descelularización de PCA, nos basamos en el protocolo de descelularización elaborado por Reing *et al.*, 2010, de Tripsina-Tritón X-100 (T-T), debido a que este proceso mostro una completa descelularización y la obtención de algunos factores de crecimiento y de proteínas de MEC. Para la descelularización de PCN, se siguió el mismo protocolo que el de PCA, con algunas variaciones al elaborado por Reing *et al.*, 2010, la MA de PCN, no se vio alterada por el proceso de descelularización, comparándola con una MAD, obtenida de bovino neonato, llamada SurgiMend®, donde la apariencia física es muy similar (Ohkuma *et al.*, 2013).

En la MA de PCA se pudo observar que no hay presencia de núcleos, mediante la tinción H&E y la tinción fluorescente Hoechst, con respecto al control, estos resultados son similares a los obtenidos por los grupos de Reing *et al.*, 2010, Ge *et al.*, 2009 y el de Hoganson *et al.*, 2010, ellos corroboran la descelularización mediante la tinción H&E, pudiendo obtener este criterio de descelularización similar al de estos estudios. Corroborando una diferencia significativa, en el porcentaje nuclear de la MA (0.23 y 1.71%), respecto a la muestra control (14.03 y 16.13%), respectivamente en la tinción H&E y Hoechst (**Figura 17**). También se demostró que el tamaño de remanente de DNA en la MA es menor a 200 pares de bases, con una concentración de DNAs de 14 ng/mg de tejido acelular (**Figuras 18 y 19**), similar a lo obtenido por Reing *et al.*, 2010 y por Keane, 2016, en una MA obtenida de mucosa gastrointestinal.

Para la PCN, no se ha realizado el análisis de criterios de descelularización, describiéndose por primera vez en este estudio, obteniendo diferencias significativas en el porcentaje nuclear de la MA (2.95% y 1.99%), respecto a la muestra control (33.63% y 38.34%) respectivamente en la tinción H&E y Hoechst (**Figura 20**). Los remanentes de DNA son menores a 200 pb, y la concentración de DNAs en la MA fue de 4.22 ng/mg de peso de tejido acelular (**Figuras 21 y 22**), obteniendo los tres criterios establecidos por Crapo *et al.*, 2011 y por lo que se puede decir que obtenemos una MA de PCN.

Estos resultados obtenidos son relevantes ya que una de las principales barreras para el xenotrasplante en humanos es la presencia de anticuerpos naturales para el epítipo terminal α -Gal. Este epítipo se expresa en las membranas celulares de todos los mamíferos excepto en humanos y algunos primates (Galili *et al.*, 1984). Estos anticuerpos naturales pueden ser del isotipo IgM, IgG o IgA y pueden mediar el rechazo hiperagudo o retardado de los injertos a través de la activación del complemento y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (Schussler *et al.*, 2001). Sin embargo este problema se puede eliminar con el uso de MA, debido a que hay ausencia de material nuclear, se da por hecho de que se eliminaron los componentes celulares en el injerto, y al momento de implantarlo, la

lisis celular, la trombosis y la isquemia no implicaran un problema, además de que las células que migrarán a la MA no despertaran una respuesta inmune, se han hecho estudios en algunas MA derivadas de tejidos porcinos donde la cantidad de DNA residual es menor a los criterios establecidos por Crapo, con una respuesta de las inmunoglobulinas sin producir la activación del complemento (McPherson *et al.*, 2000).

Estos estudios son muy importantes ya que podemos disminuir el riesgo de rechazo, eliminando los componentes celulares y nucleares, obteniendo así un andamio con proteínas específicas de MEC, el cual tendrá una aplicación dentro de la ingeniería de tejidos (Badylak *et al.*, 2001).

La MEC de cerdo es muy utilizada dentro de la ingeniería de tejidos, ya que es fuente de proteínas funcionales como las fibras de colágena, elásticas, glucosaminoglicanos, proteoglicanos, factores de crecimiento, citocinas, estas características se tratan de mantener, para promover una rápida y eficaz reparación de la lesión cutánea (Badylak, 2002). Es por esta razón que se realizó el análisis histológico y semicuantitativo, de las principales proteínas de MEC para conocer si el proceso de descelularización no afecto en gran medida estas fibras proteicas, que puedan alterar el proceso de una reparación cutánea.

Después del tratamiento de descelularización las fibras de colágena se mantienen en la MA similar al control, siendo más compactas en esta última como en el estudio de Turner *et al.*, 2014, donde realizó la tinción tricrómica de Masson en diferentes regiones corporales de la piel porcina, siendo la región dorsal la zona donde hay mayor cantidad de piel, posee menor cantidad de folículos pilosos y de tejido adiposo, además de que fue la región donde nosotros obtuvimos la piel, mientras que en el trabajo de Kuna *et al.*, 2017 demuestran que se conserva la colágena total de la MEC en una MA, esto es muy importante ya que según Elgharably *et al.*, 2013 mencionan que la colágena es de los principales componentes, para la regeneración de piel, y el aumento en la deposición de colágena organizada se asocia con la maduración del lecho de la herida.

Para la tinción Herovici en la PCA, obtuvimos un proporción similar al trabajo de Turner *et al.*, 2014 de 3:1, con la presencia mayoritaria de colágena tipo I, y en menor cantidad colágena tipo III, siendo más abundante está en la zona basal, y obteniendo en nuestro estudio un porcentaje en la muestra control de 73.56% y 20.33%, y en la MA un porcentaje de 65.42% y 21.54% de colágena tipo I y III respectivamente, concluyendo que no existen diferencias significativas (**Figura 24**).

Para la tinción específica a fibras elásticas Turner *et al.*, 2014 menciona que en una muestra control presenta un 8%, siendo más abundantes en zonas anexas a glándulas y en la dermis. Los resultados de Kuna *et al.*, 2017 indican que en una MA, se observa la disminución de la concentración de fibras elásticas, con estos estudios podemos comparar nuestros resultados, donde se obtuvo en la muestra control el 9.78% y en la MA el 5.32%, existiendo diferencias significativas (**Figura 25**), según Hult & Goltz, 1965, el porcentaje de elastina en la piel humana varía de 4.16–9.4%, indicándonos que obtenemos un porcentaje óptimo de fibras elásticas que pueden ayudar a reparar el lecho de la herida.

La MA porcina sirve, no solo para evitar infecciones, pérdida de líquidos y proporcionar volumen como sustituto dérmico a la falta de tejido, sino también para promover la reparación de la herida, sirviendo las proteínas de MEC como un sustrato para el crecimiento de estirpes celulares de la piel. Normalmente en la reparación de la lesión hay crecimiento interno vascular del lecho de la herida (angiogénesis), infiltrado celular de la dermis circundante y tejido subcutáneo, y migración rápida de queratinocitos de los bordes de la herida, esto generalmente no otorga buena reparación y forma cicatrices no deseadas, con el uso de MA hay una mejor reparación cutánea, y se minimiza el riesgo de formar cicatrices, debido a que el recambio de proteínas de matriz extracelular, ocurre de manera más organizada, y rápida gracias a la señalización de estirpes celulares correspondientes a formar el neotejido, y además se evita la fase de inflamación y de remodelación tisular fibrosa (Bello *et al.*, 2001).

Para la PCN el análisis histológico, es algo que no existe en la literatura; en este trabajo se describe por primera vez que la colágena total no se ve afectada en la MA, ya que mantiene un porcentaje similar de colágena total con respecto al control (**Figura 26**); sin embargo se pudo observar que hay una mayor presencia de colágena tipo III que de colágena tipo I, esto se debe a que en organismos fetales o neonatales, hay mayor deposición de colágena tipo III, debido a que si sufren una alteración en su homogeneidad, este tipo de colágena puede ofrecer una recuperación cutánea de una manera más rápida a diferencia de un organismo adulto (Vilarrasa & Puig, 2008).

La presencia de fibras elásticas se observa en mayor proporción en la muestra control (24.52%) mientras que se reducen en la MA (7.84%) existiendo diferencias significativas (**Figura 28**), por lo que el proceso de descelularización disminuyó su presencia, sin embargo esto no influye en la recuperación de una lesión cutánea según Kuna *et al.*, 2017, ya que demostró que en ratones tratados con una MA de piel de cerdo adulto a los 25 días presenta una mejor reparación cutánea con respecto al control. Nuestros datos son relevantes ya que no se ha reportado en la literatura análisis histológicos y semicuantitativos en PCN, para la muestra acelular, ni para la muestra control.

Según Sicari *et al.*, 2012, menciona que la composición de MEC fetal y neonatal es claramente diferente a la de un organismo adulto y juega un papel importante en el desarrollo del tejido. De hecho, existen distintas características de remodelación que son atribuibles a la edad del animal. Se ha demostrado que andamios biológicos cosechados de animales neonatales promueven una remodelación más eficaz, en comparación con los andamios comerciales y de animales adultos.

Hwang *et al.*, 2007, demostraron la eficacia de la colágena de bovino neonatal en un estudio de aumento de la punta nasal humana, en términos de angiogénesis, invasión de fibroblastos del huésped y deposición de fibras de colágena en comparación con la dermis cadavérica humana, siendo mayoritaria la deposición de colágena III. La colágena tipo III desempeña un papel fundamental en la

orquestación de las actividades celulares durante la formación de tejidos y la regeneración en las primeras fases de la cicatrización de heridas. Se puede plantear la hipótesis de que la abundancia relativa de colágena de tipo III puede tener efecto beneficioso en la aceleración de la cicatrización de heridas, lo que podría resultar en la reducción de complicaciones generales. Volk *et al.*, 2011 comprobaron que los niveles disminuidos de colágena tipo III pueden conducir al aumento de la deposición de tejido fibroso en la cicatrización de heridas cutáneas, esto debido a que la colágena tipo III genera un recambio más rápido de fibras de colágena en una lesión cutánea, como ya se ha reportado la MA de PCA se usa como sustituto de piel para la reparación de lesiones la cual se compone principalmente de colágena tipo I, con los resultados obtenidos en este trabajo se demuestra que la MA de PCN está compuesta en su mayoría de colágena tipo III, lo cual podría favorecer la regeneración cutánea.

CONCLUSIONES

- Se replicó el proceso de descelularización para la piel de cerdo adulto en el laboratorio, además, con base a este protocolo, se estandarizó un método de descelularización para una piel de cerdo neonato.
- Se cumplieron los tres criterios de descelularización establecidos por Crapo et al. 2011, mediante tinciones específicas a material nuclear, no hay presencia de núcleos íntegros, aunque si de remanentes de DNA para las dos matrices acelulares siendo la integridad <200 pb, y con una concentración de DNAds por mg de tejido descelularizado menor a 50 ng.
- El espesor de ambas matrices acelulares disminuye, sin embargo la disposición de colágena no es afectada significativamente y las fibras elásticas se conservan.
- Se obtuvieron dos matrices acelulares libres de material nuclear preservando una matriz extracelular similar a la nativa, lo cual puede tener un uso potencial en la ingeniería de tejidos para lesiones cutáneas.

PROSPECTIVAS

- Determinar la caracterización proteica de las matrices acelulares.
- Evaluar los factores de crecimiento, que puedan retener la matriz acelular de piel de cerdo adulto y neonato.
- Caracterizar las propiedades físicas y mecánicas de la matriz acelular de piel de cerdo adulto y neonato.
- Realizar ensayos *in vitro*, para conocer la viabilidad, proliferación y citotoxicidad de la matriz acelular de piel de cerdo adulto y neonato.
- Realizar ensayos *in vivo*, para conocer si la matriz acelular de piel de cerdo adulto y neonato, puede reparar una lesión cutánea de una manera eficaz, y no despierta una respuesta inmune.

REFERENCIAS

- Aamodt, J. M., & Grainger, D. W. (2016). Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*, *86*(6), 68-82.
- Ambrosio, F., Wolf, S. L., Delitto, A., Fitzgerald, G. K., Badylak, S. F., Boninger, M. L., & Russell, A. J. (2010). The emerging relationship between regenerative medicine and physical therapeutics. *Physical therapy*, *90*(12), 1807.
- Atherton, D. D., Tang, R., Jones, I., & Jawad, M. (2010). Early excision and application of matriderm with simultaneous autologous skin grafting in facial burns. *Plastic and reconstructive surgery*, *125*(2), 60-61.
- Badylak, S., Arnoczky, S., Plouhar, P., Haut, R., Mendenhall, V., Clarke, R., & Horvath, C. (1999). Naturally occurring extracellular matrix as a scaffold for musculoskeletal repair. *Clinical orthopaedics and related research*, *367*, 333-343.
- Badylak, S. F. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Seminars in cell & developmental biology*, *13*(5), 377-383.
- Badylak, S. F. (2004). Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant immunology*, *12*(3), 367-377.
- Badylak, S. F., Park, K., Peppas, N., McCabe, G., & Yoder, M. (2001). Marrow-derived cells populate scaffolds composed of xenogeneic extracellular matrix. *Experimental hematology*, *29*(11), 1310-1318.
- Bello, Y. M., Falabella, A. F., & Eaglstein, W. H. (2001). Tissue-engineered skin. *American journal of clinical dermatology*, *2*(5), 305-313.
- Bissell, M. J., & Aggeler, J. (1986). Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression? *Progress in clinical and biological research*, *249*, 251-262.
- Blanco, C. P., & Diéguez, J. M. (1983). *Cirugía: fundamentos, indicaciones y opciones técnicas*: Salvat Editores. España.
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*(12), 786.

- Borges, E. L., Pires Júnior, J. F., Abreu, M. N. S., Lima, V. L. d. A., Silva, P. A. B., & Soares, S. M. (2016). Factors associated with the healing of complex surgical wounds in the breast and abdomen: retrospective cohort study. *Revista latino-americana de enfermagem*, 24.
- Brooks, S., Dwek, M., & Schumacher, U. (2002). Functional and molecular glycobiology: BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, United Kingdom.
- Brown, B. N., Buckenmeyer, M. J., & Prest, T. A. (2017). Preparation of Decellularized Biological Scaffolds for 3D Cell Culture. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 1612, 15.
- Busby, S.-A., Robb, A., Lang, S., Takeuchi, Y., Vesely, P., & Scobie, L. (2014). Antibiotic susceptibility and resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from fresh porcine skin xenografts: risk to recipients with thermal injury. *Burns*, 40(2), 288-294.
- Cabezas, F. R., Unda, M., & Jaramillo, P. (2009). Sustitutos de la piel en el tratamiento de quemaduras. Revisión bibliográfica. *Medicina*, 15(1), 80-83.
- Campabadal, C. (2009). Guia técnica para alimentacion de cerdos. Costa Rica: Imprenta Nacional.
- Cilurzo, F., Minghetti, P., & Sinico, C. (2007). Newborn pig skin as model membrane in in vitro drug permeation studies: a technical note. *AAPS PharmSciTech*, 8(4), 97-100.
- Clark, R. A. (2001). Fibrin and wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936(1), 355-367.
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12), 3233-3243.
- Chawla, L. S., Eggers, P. W., Star, R. A., & Kimmel, P. L. (2014). Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *New England Journal of Medicine*, 371(1), 58-66.
- Chen, R.-N., Ho, H.-O., Tsai, Y.-T., & Sheu, M.-T. (2004). Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*, 25(13), 2679-2686.

- Chiarini, A., Dal Pra, I., & Armato, U. (2007). In vitro and in vivo characteristics of frozen/thawed neonatal pig split-skin strips: a novel biologically active dressing for areas of severe, acute or chronic skin loss. *International journal of molecular medicine*, 19(2), 245-255.
- Dealey, C. (2008). *The care of wounds: a guide for nurses*: John Wiley & Sons. España.
- Dearth, C. L., Keane, T. J., Carruthers, C. A., Reing, J. E., Huleihel, L., Ranallo, C. A., Badylak, S. F. (2016). The effect of terminal sterilization on the material properties and in vivo remodeling of a porcine dermal biologic scaffold. *Acta biomaterialia*, 33, 78-87.
- Debeer, S., Le Ludec, J.-B., Kaiserlian, D., Laurent, P., Nicolas, J.-F., Dubois, B., & Kanitakis, J. (2013). Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *European Journal of Dermatology*, 23(4), 456-466.
- Denner, J. (2014). Xenotransplantation-progress and problems: A review. 4(2), 1-10.
- Dreifke, M. B., Jayasuriya, A. A., & Jayasuriya, A. C. (2015). Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering: C*, 48, 651-662.
- Ducheyne, P., Healy, K., Hutmacher, D. W., Grainger, D. W., & Kirkpatrick, C. J. (2017). *Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier. United Kingdom.
- Durán Yaneth, J. C., Alarcón, C., & Velásquez, D. (2012). Aplicación de biomateriales de base biológica, moléculas bioactivas e ingeniería de tejidos en cirugía plástica periodontal: Una revisión. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 5(3), 142-149.
- Dyck, G., & Swierstra, E. (1987). Causes of piglet death from birth to weaning. *Canadian Journal of Animal Science*, 67(2), 543-547.
- Elgharably, H., Roy, S., Khanna, S., Abas, M., DasGhatak, P., Das, A., Sen, C. K. (2013). A modified collagen gel enhances healing outcome in a preclinical

- swine model of excisional wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 21(3), 473-481.
- English, P., & Smith, W. (1975). Some causes of death in neonatal piglets. *Vet. Annu*, 15(95), 104.
- Fabres, V. C. (2010). Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3), 488-493.
- Federal. (2016). *Manual Clínico Para la Estandarización del Cuidado y Tratamiento a Pacientes con Heridas Agudas y Crónicas*. www.gob.mx.
- Fife, C. E., & Carter, M. J. (2012). Wound care outcomes and associated cost among patients treated in US outpatient wound centers: data from the US wound registry. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*, 24(1), 10-17.
- Fitzpatrick, T. B. (2009). *Dermatología en medicina general* (Vol. 1): Ed. Médica Panamericana. México.
- Fox, S. (2008). *Fisiología Humana*. 10ª edición. Aravaca (Madrid): Ed: McGraw-Hill-Interamericana.
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123(24), 4195-4200.
- R. K. Freinkel & D. T. Woodley. (2001). *The biology of skin*, Parthenon Publishing, New York.
- Galili, U. (1993). Evolution and pathophysiology of the human natural anti- α -galactosyl IgG (anti-Gal) antibody. *Springer seminars in immunopathology*, 15(2), 155-171.
- Galili, U., Anaraki, F., Thall, A., Hill-Black, C., & Radic, M. (1993). One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood*, 82(8), 2485-2493.
- Galili, U., Rachmilewitz, E., Peleg, A., & Flechner, I. (1984). A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *Journal of Experimental Medicine*, 160(5), 1519-1531.

- Galla, S., Mathapati, S., Nayak, V. M., Cherian, K. M., & Guhathakurta, S. (2010). Analytical study to evaluate the extracellular matrix in processed acellular xenografts. *Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 26(2), 132-138.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2015). *Atlas en color y texto de histología*. Editorial Médica Panamericana. México.
- Ge, L., Zheng, S., & Wei, H. (2009). Comparison of histological structure and biocompatibility between human acellular dermal matrix (ADM) and porcine ADM. *Burns*, 35(1), 46-50.
- Gilbert, T. W. (2012). Strategies for tissue and organ decellularization. *Journal of cellular biochemistry*, 113(7), 2217-2222.
- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675-3683.
- Gill, S. E., & Parks, W. C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(6), 1334-1347.
- Goldman, M., Le Moine, A., Braun, M., Flamand, V., & Abramowicz, D. (2001). A role for eosinophils in transplant rejection. *Trends in immunology*, 22(5), 247-251.
- González-Consuegra, R. V., Pérez-Valderrama, D. C., & Valbuena-Flor, L. F. (2016). Prevención de lesiones de piel: educación en el equipo de salud y familiares de personas hospitalizadas. *Revista de la Facultad de Medicina*, 64(2), 229-238.
- Hansbrough, J. F., Mazingo, D. W., Kealey, G. P., Davis, M., Gidner, A., & Gentzkow, G. D. (1997). Clinical trials of a biosynthetic temporary skin replacement, Dermagraft-Transitional Covering, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds. *Journal of Burn Care & Research*, 18(1), 43-51.
- Hay, E. D. (2013). *Cell biology of extracellular matrix*. Springer Science & Business Media. United States of America.

- Hermans, M. H. (2014). Porcine xenografts vs.(cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: Is there a clinical difference? *Burns*, 40(3), 408-415.
- Ho, J., Walsh, C., Yue, D., Dardik, A., & Cheema, U. (2017). Current Advancements and Strategies in Tissue Engineering for Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in wound care*, 6(6), 191-209.
- Hodde, J. P., Badylak, S. F., Brightman, A. O., & Voytik-Harbin, S. L. (1996). Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement. *Tissue engineering*, 2(3), 209-217.
- Hoganson, D. M., O'Doherty, E. M., Owens, G. E., Harilal, D. O., Goldman, S. M., Bowley, C. M., Vacanti, J. P. (2010). The retention of extracellular matrix proteins and angiogenic and mitogenic cytokines in a decellularized porcine dermis. *Biomaterials*, 31(26), 6730-6737.
- Holáň, V., Pindjácová, J., Zajícová, A., Krulová, M., Železná, B., Matoušek, P., & Svoboda, P. (2005). The activity of inducible nitric oxide synthase in rejected skin xenografts is selectively inhibited by a factor produced by grafted cells. *Xenotransplantation*, 12(3), 227-234.
- Hsu, Y.-C., Li, L., & Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature medicine*, 20(8), 847-856.
- Hult, A.-M., & Goltz, R. W. (1965). The measurement of elastin in human skin and its quantity in relation to age. *Journal of Investigative Dermatology*, 44(6), 408-412.
- Hwang, K., Hwang, J. H., Park, J. H., Kim, D. J., & Shin, Y. H. (2007). Experimental study of autologous cartilage, acellular cadaveric dermis, lyophilized bovine pericardium, and irradiated bovine tendon: applicability to nasal tip plasty. *Journal of Craniofacial Surgery*, 18(3), 551-558.
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957), 1216-1219.

- Iracheta, M. A. L. (2001). El colágeno, ¿ un cemento biológico que mantiene la arquitectura y plasticidad tisular?. In *Horizontes culturales: las fronteras de la ciencia: 2000* (pp. 119-137). España.
- Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Fan, L., Morris, R. J., & Cotsarelis, G. (2005). Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nature medicine*, 11(12), 1351.
- Jacobi, U., Kaiser, M., Toll, R., Mangelsdorf, S., Audring, H., Otberg, N., Lademann, J. (2007). Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology*, 13(1), 19-24.
- Keane, T. (2016). *Extracellular Matrix for Repair of Gastrointestinal Mucosa* (Doctoral dissertation, University of Pittsburgh).
- Khavkin, J., & Ellis, D. A. (2011). Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial plastic surgery clinics of North America*, 19(2), 229-234.
- Koh, T. J., & DiPietro, L. A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 13(23), 12 pages.
- Kuna, V. K., Padma, A. M., Håkansson, J., Nygren, J., Sjöback, R., Petronis, S., & Sumitran-Holgersson, S. (2017). Significantly accelerated wound healing of full-thickness skin using a novel composite gel of porcine acellular dermal matrix and human peripheral blood cells. *Cell transplantation*, 26(2), 293-307.
- Lamme, E. N., De Vries, H. J., van Veen, H., Gabbiani, G., Westerhof, W., & Middelkoop, E. (1996). Extracellular matrix characterization during healing of full-thickness wounds treated with a collagen/elastin dermal substitute shows improved skin regeneration in pigs. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44(11), 1311-1322.
- Le Vay, D. (2004). *Anatomía y fisiología humana*. 2a Edición. Editorial Paidotribo. España.
- Liu, Q., & Wang, H. (2014). *Tissue Regeneration: Where Nano-structure Meets Biology* (Vol. 2): World Scientific. Singapur.

- Londono, R., & Badylak, S. F. (2015). Biologic scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling. *Annals of biomedical engineering*, 43(3), 577-592.
- Lorente, J. (1998). *Cuidados intensivos del paciente quemado*: Springer Science & Business Media. España.
- Mathapati, S., Bishi, D. K., Guhathakurta, S., Cherian, K. M., Venugopal, J. R., Ramakrishna, S., & Verma, R. S. (2013). Biomimetic acellular detoxified glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1561-1572.
- Mathapati, S., Galla, S., Sankaranarayanan, K., Verma, R. S., Cherian, K. M., & Guhathakurta, S. (2010). Qualitative and quantitative detection of sodium deoxycholic acid in decellularized tissue. *Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 26(2), 129-131.
- McPherson, T., Liang, H., Record, R., & Badylak, S. (2000). Gal α (1, 3) Gal epitope in porcine small intestinal submucosa. *Tissue engineering*, 6(3), 233-239.
- Mitchell, S. L., & Niklason, L. E. (2003). Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovascular Pathology*, 12(2), 59-64.
- Miyamoto, S., KATHZ, B. Z., Lafrenie, R. M., & Yamada, K. M. (1998). Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 857(1), 119-129.
- Nyame, T. T., Chiang, H. A., & Orgill, D. P. (2014). Clinical applications of skin substitutes. *Surgical Clinics*, 94(4), 839-850.
- Ohkuma, R., Buretta, K. J., Mohan, R., Rosson, G. D., & Rad, A. N. (2013). Initial experience with the use of foetal/neonatal bovine acellular dermal collagen matrix (SurgiMend™) for tissue-expander breast reconstruction. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 66(9), 1195-1201.
- Orlando, G. (2014). *Regenerative medicine applications in organ transplantation*: Academic Press. United States of America.

- Parker, D. M., Armstrong, P. J., Frizzi, J. D., & North, J. H. (2006). Porcine dermal collagen (Permacol) for abdominal wall reconstruction. *Current surgery*, 63(4), 255-258.
- Ponce, M. L., Nomizu, M., Delgado, M. C., Kuratomi, Y., Hoffman, M. P., Powell, S., Malinda, K. M. (1999). Identification of endothelial cell binding sites on the laminin γ 1 chain. *Circulation research*, 84(6), 688-694.
- Portas, M., Pomerane, A., Genovese, J., Pérez, M. d. R., & Gisone, P. (2002). Diagnóstico y tratamiento de las quemaduras radioinducidas. Departamento de Ingeniería de Tejidos/Laboratorio Craveri, Gerencia de Apoyo Científico/Autoridad Regulatoria Nuclear. Argentina.
- Prockop, D., & Guzmán, N. (1981). El colágeno. *Tiempos médicos*, 191(1) 1-9.
- Quiles, A. (2004). Factores que inciden en la mortalidad neonatal en los lechones. *Producción Animal*(195), 45-55.
- Reing, J. E., Brown, B. N., Daly, K. A., Freund, J. M., Gilbert, T. W., Hsiong, S. X., Wolf, M. T. (2010). The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 31(33), 8626-8633.
- Rosenbloom, J., Abrams, W., & Mecham, R. (1993). Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *The FASEB Journal*, 7(13), 1208-1218.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins. United States of America.
- Ross, R., & Odland, G. (1968). Human wound repair. *The Journal of cell biology*, 39(1), 152-168.
- Satish, A., Chandrasekaran, J., Indhumathi, T., Cherian, K., & Ramesh, B. (2016). 360 in Making Acellular and Biocompatible Xenografts for Surgical Applications. *J Surg Open Access*, 2(6), 1-11.
- Sculean A, Gruber R, Bosshardt DD. (2014). Soft tissue wound healing around teeth and dental implants. *J Clin Periodontol*. 41(15), 6–22.

- Schussler, O., Shen, M., Shen, L., Carpentier, S. M., Kaveri, S., & Carpentier, A. (2001). Effect of human immunoglobulins on the immunogenicity of porcine bioprostheses. *The Annals of thoracic surgery*, 71(5), 396-400.
- Seaton, M., Hocking, A., & Gibran, N. S. (2015). Porcine models of cutaneous wound healing. *ILAR journal*, 56(1), 127-138.
- Sheridan, R., & Moreno, C. (2001). Skin substitutes in burns. *Burns*, 27(1), 92.
- Sicari, B. M., Johnson, S. A., Siu, B. F., Crapo, P. M., Daly, K. A., Jiang, H., Badylak, S. F. (2012). The effect of source animal age upon the in vivo remodeling characteristics of an extracellular matrix scaffold. *Biomaterials*, 33(22), 5524-5533.
- Silvera, L., & Barrios, C. (2002). La matriz extracelular: el ecosistema de la célula. *Revista Científica Salud Uninorte*, 16:9–18. Colombia.
- Solan, A., Prabhakar, V., & Niklason, L. (2001). Engineered vessels: importance of the extracellular matrix. In *Transplantation proceedings*, 33(1), 66-68.
- Sun, B. K., Siplashvili, Z., & Khavari, P. A. (2014). Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, 346(6212), 941-945.
- Torra i Bou, J.-E., Martínez Cuervo, F., Soldevilla Agreda, J. J., Casaroli-Marano, R., Reina, M., & Vilaró, S. (2000). El uso del colágeno en la cicatrización de las heridas. *Rev Enferm*, 715-722.
- Turner, N. J., Pezzone, D., & Badylak, S. F. (2014). Regional variations in the histology of porcine skin. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 21(4), 373-384.
- Uitto, J., Olsen, D. R., & Fazio, M. J. (1989). Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *Journal of Investigative Dermatology*, 92(4), 61-77.
- Van der Rest, M., & Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB Journal*, 5(13), 2814-2823.
- Vilarrasa, E., & Puig, L. (2008). La piel del recién nacido: atención especial. *Farmacia profesional*, 22(11), 36-42.
- Volk, S. W., Wang, Y., Mauldin, E. A., Liechty, K. W., & Adams, S. L. (2011). Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and

- increases scar deposition in cutaneous wound healing. *Cells Tissues Organs*, 194(1), 25-37.
- Wainwright, D. (1995). Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. *Burns*, 21(4), 243-248.
- Wainwright, J. M., Czajka, C. A., Patel, U. B., Freytes, D. O., Tobita, K., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2009). Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(3), 525-532.
- Werner, S., & Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3), 835-870.
- Xu, H., Wan, H., Zuo, W., Sun, W., Owens, R. T., Harper, J. R., McQuillan, D. J. (2009). A porcine-derived acellular dermal scaffold that supports soft tissue regeneration: removal of terminal galactose- α -(1, 3)-galactose and retention of matrix structure. *Tissue Engineering Part A*, 15(7), 1807-1819.
- Zaulyanov, L., & Kirsner, R. S. (2007). A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clinical interventions in aging*, 2(1), 93.
- Zenn, M., Venturi, M., Pittman, T., Spear, S., Gurtner, G., Robb, G., . . . Dayan, J. (2017). Optimizing Outcomes of Postmastectomy Breast Reconstruction With Acellular Dermal Matrix: A Review of Recent Clinical Data. *Eplasty*, 17.