



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Comparación histológica del proceso de
reparación cutánea mediado por dos constructos
biológicos (AHR+hADMSC Y PPR+hADMSC) en un
modelo murino post-quemadura**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CORTÉS GUTIÉRREZ DANIELA



DIRECTORA DE TESIS:

**Dra. VERÓNICA HAYDÉE LUGO MARTÍNEZ
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.
2018**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos de la alumna

Cortés
Gutiérrez
Daniela
5584023429
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
311181519

2. Datos de la tutora.

Dra
Verónica Haydée
Lugo
Martínez

3. Datos del sinodal 1

Dra
María Cristina
Velasquillo
Martínez

4. Datos del sinodal 2

Dr
Roberto
Sánchez
Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Dr
José René
Escalona
Mugica

6. Datos del sinodal 4

Dr
René Fernando
Abarca
Buis

7. Datos del trabajo escrito

Comparación histológica del proceso de reparación cutánea mediado por
dos constructos biológicos (AHR+hADMSC Y PPR+hADMSC) en un
modelo murino post-quemadura.

69p
2018

AGRADECIMIENTOS

El proyecto del que forma parte esta tesis fue aprobado por el comité de investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación con número de registro 26/13. El proyecto fue financiado con por Conacyt fondo S0008-2015-2 **Solicitud:** 262103 y por el Organismo Internacional de Energía Atómica con registro: 18278/R2.

VII.	Material y método	24
	1. Constructos biológicos	24
	2. Material biológico	24
	3. Desarrollo experimental	24
	3.1 Modelo de quemadura	24
	3.2 Aplicación de tratamientos	25
	3.3 Seguimiento fotográfico	26
	3.3.1 Análisis de imagen	27
	3.4 Obtención de muestras	27
	3.5 Procesamiento histológico	27
	3.5.1 Tinción de Herovici	28
	3.5.2 Análisis histológico	28
	3.6 Análisis estadístico	29
VIII.	Resultados	30
	1. Cierre de la herida	30
	1.1 Cierre al día 14 post-quemadura	31
	1.2 Cierre al día 21 post-quemadura	33
	2. Índice histológico	35
	2.1 Tejido de granulación	35
	2.2 Reparación epidérmica (reepitelización)	38
	2.3 Vascularización dérmica	41
	2.4 Deposición de colágenas	44
	2.4.1 Colágena tipo I	44
	2.4.2 Colágena tipo III	44
IX.	Discusión	50
X.	Conclusiones	55
XI.	Referencias	56

I. Resumen

Las quemaduras son lesiones causadas por la transferencia aguda de algún tipo de energía (mecánica, térmica, eléctrica, química, o radioactiva) hacia algún tejido y están clasificadas de acuerdo con dos parámetros: porcentaje de TBSA (Total Body Surface Área) y profundidad de la lesión dividida en grados (primero, segundo, tercero y cuarto) dependiendo de los estratos cutáneos que se vean afectados. De acuerdo con la OMS en 2017, las quemaduras constituyen un problema de salud pública a nivel mundial provocando alrededor de 180,000 muertes al año. En México, la tasa nacional promedio de quemaduras es de 107.26 por cada 100,000 habitantes, lo que representa un promedio anual de 113,531 pacientes quemados en los últimos 5 años (SSA, 2017). Para el manejo de quemaduras, los autoinjertos todavía son el estándar de oro como tratamiento en lesiones profundas, excepto cuando TBSA excede el 70%, casos en los que se recurre al uso de los sustitutos dérmicos alogénicos o xenogénicos. Sin embargo, estos presentan limitaciones como: respuesta inmunológica, conllevan un riesgo de transmisión de enfermedades y una menor capacidad para integrarse en el tejido del paciente (Oryan et. al., 2017). En nuestro país, también se utilizan sustitutos de piel importados de marcas como: Integra, Epicel o Dermagraft. Su uso, aunque es eficiente, resulta en un costo elevado (Álvarez et. al., 2012). Por lo tanto, debido a la necesidad de innovar y optimizar los tratamientos actuales para tratar quemaduras, el campo de la ingeniería de tejidos ha propuesto generar estructuras llamadas constructos, constituidos principalmente por un andamio que puede ser de origen biológico o sintético, en los cuales se siembran células. En el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación se ha trabajado en la generación de dos constructos biológicos, usando dos andamios biológicos: uno de ellos con piel porcina radioesterilizada (PPR), debido a que la piel porcina tiene similitudes con la piel humana en algunas características como el espesor de la dermis y la composición de la matriz extracelular, aunado a esto, es un material que cuenta con una amplia disponibilidad, un sencillo manejo y ya se ha utilizado como

cubierta temporal para el tratamiento de algunas heridas cutáneas (Koob et. al., 2014). El segundo andamio se diseñó a partir de amnios humano radioesterilizado (AHR), ya que esta membrana biológica posee una adherencia natural y óptima a la herida, además de ser bacteriostática y no presentar reacciones inmunológicas exacerbadas (Singh et al., 2011). Para la configuración de los constructos biológicos se sembraron células troncales mesénquimales derivadas de tejido adiposo humano (hADMSC), en ambos andamios: PPR y AHR. Estos constructos biológicos se evaluaron *in vitro* por Sánchez y colaboradores en 2015, reportando resultados positivos en cuanto al porcentaje de viabilidad y de proliferación celular, así como secreción de citoquinas anti-inflamatorias por las hADMSC. Por lo tanto, para este trabajo fue generado un modelo *in vivo* de quemadura en ratones atímicos (Nu/Nu) machos de 8 semanas de nacidos a los que se les aplicaron como tratamiento los constructos biológicos (AHR+hADMSC y PPR+hADMSC), con el objetivo de evaluar histológicamente su eficiencia en la reparación cutánea a los 7, 14 y 21 días post-quemadura. Se propuso que si el efecto de uno o ambos constructos biológicos contribuye de manera positiva en la reparación de quemaduras, entonces en los animales tratados con estos constructos se observaría una mayor reparación dermo-epidérmica o una aceleración en el proceso de cicatrización. Asimismo, el área de la herida se vería disminuida con la presencia de estos tratamientos. De acuerdo con los resultados, el presente estudio aportó evidencias de que el uso del constructo biológico AHR+hADMSC para tratar quemaduras profundas, tiene un efecto positivo en la cicatrización de dichas lesiones ya que, como los resultados obtenidos muestran que al D14, los animales tratados con AHR+hADMSC presentan un mayor cierre de la herida, o una mejor cicatrización cuando se compara con las quemaduras del grupo control. Además de promover el recambio de la colágena tipo III (inmadura) por colágena tipo I (madura) durante las fases tardías de la reparación cutánea. Sin embargo, para el constructo PPR+hADMSC, no se identificó el mismo efecto positivo en el proceso de cicatrización. Lo que nos sugiere que la combinación de AHR+hADMSC tiene un efecto más eficiente en la reparación de la lesión por quemadura en nuestro modelo murino con respecto al constructo PPR+hADMSC.

II. Introducción

1. La piel

La piel es un órgano perteneciente al sistema tegumentario junto con los derivados epidérmicos, como las uñas, el pelo y las glándulas (sudoríparas, sebáceas y la glándula mamaria). Este órgano es el más extenso del cuerpo y tiene un peso aproximado de 3 a 4 Kg, que es equivalente del 6 al 12% del peso corporal. Se encuentra conformado por tres estratos principales que van desde el exterior hacia el interior del cuerpo empezando por un epitelio escamoso, la epidermis; un tejido conectivo subyacente, la dermis y por debajo de la dermis se sitúa la hipodermis, conformada principalmente por tejido adiposo. Debido a su compleja estructura tiene asignadas múltiples funciones. (Boya et al., 2010; Reinke et. al., 2012; Castell et. al., 2013; & Makoto et. al., 2015).

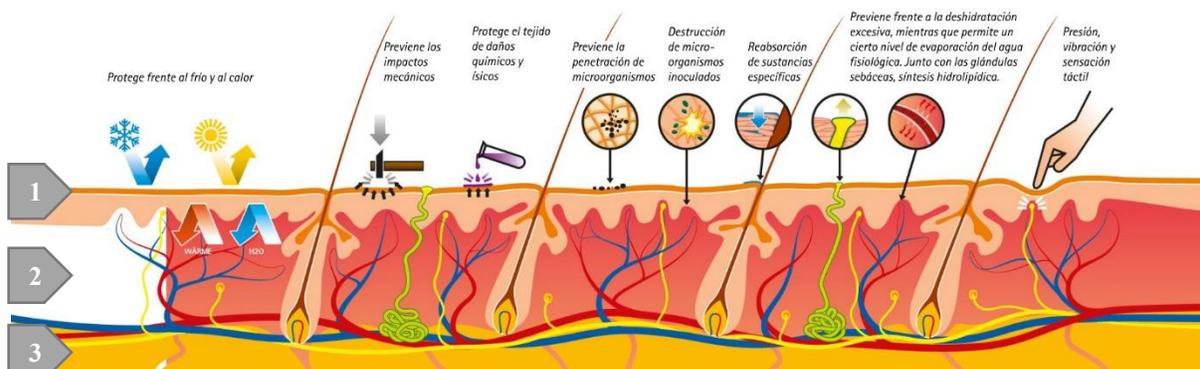


Fig. 1. Funciones de la piel. Estructura: 1) Epidermis, 2) Dermis, 3) Hipodermis. Imagen tomada y modificada de internet.

1.1 Estructura y función

En todos los grupos de vertebrados la piel constituye la primera línea de defensa contra agentes patógenos, químicos, mecánicos y físicos. Debido a las estructuras celulares que caracterizan la piel, esta puede realizar diversas funciones como: protección contra la radiación ultravioleta mediante la producción de melanina por melanocitos, misma que actúa como un atrapador de radicales libres atenuando el daño celular; mantiene el equilibrio hidroelectrolítico impidiendo la salida de líquido tisular; evita la deshidratación mediante la secreción de lípidos que se localizan entre las células epidérmicas; regulación de la temperatura mediante diferentes

mecanismos que incluyen: la secreción de sudor, la piloerección y la regulación del paso de sangre por el lecho capilar dérmico; presenta funciones metabólicas como la síntesis de vitamina D3 esencial para la absorción de calcio en el intestino; almacena energía en el tejido adiposo del estrato hipodérmico y también realiza funciones inmunológicas a nivel local y sistémico, debido a que en la piel residen diferentes tipos de células del sistema inmunológico como son los linfocitos T, células plasmáticas, células cebadas y macrófagos (Boya et al., 2010 & Castell et. al., 2013).

1.1.1 Epidermis

La epidermis es el estrato más externo de la piel y se encuentra en contacto directo con el medio externo. Este estrato está formado por un epitelio plano estratificado queratinizado avascular, organizado en varias capas conformadas por diferentes tipos celulares entre los que predominan los queratinocitos, llamados así porque su principal producto son diferentes tipos de queratinas (Boya et. al., 2010). También podemos encontrar en menor número otros tipos celulares como: los melanocitos, responsables de la producción de melanina; las células de Langerhans, que se comportan como células atrapadoras de antígenos e interactúan con células del sistema inmunológico y las células de Merkel relacionadas con la sensibilidad táctil. (Kretschmar et. al., 2014). Histológicamente, la epidermis se encuentra estratificada en cinco capas, que podemos reconocer de acuerdo a la morfología de los queratinocitos que las conforman. La más interna es la capa basal o germinativa, que comprende células con actividad mitótica. Estas células comprenden una morfología cilíndrica y se encuentran en constante mitosis, manteniendo el equilibrio entre la diferenciación celular y la división mitótica, expresan queratina 14 y queratina 5, que son proteínas de tipo filamento intermedio con funciones citoprotectoras, y su expresión se ve regulada negativamente a medida que algunas de las células inician un proceso de diferenciación en el que cambian su morfología a células con proyecciones cortas que se extienden de una célula a otra y migran hacia la capa contigua llamada capa espinosa y comienzan a sintetizar queratinas 10 y 1 (Hunain et. al., 2011 & Ross et. al., 2015). Conforme los queratinocitos van diferenciándose, madurando y migrando hacia las capas más externas sintetizan

diferentes tipos de queratinas, los queratinocitos de la capa espinosa migran hacia la siguiente capa llamada granulosa, en donde presentan una morfología de mayor tamaño debido a que almacenan gran cantidad de material citoplasmático, lípidos y sintetizan queratinas 9 y 2e. Posteriormente en la capa lúcida, las células comienzan un proceso de queratinización o cornificación que culmina en la migración hacia la última capa llamada capa cornea, donde se encuentran los queratinocitos que han alcanzado su maduración terminal presentando una morfología alargada y plana, esta es la capa más externa de la epidermis y es responsable de la función de barrera en la piel (Kierszenbaum et. al., 2016).

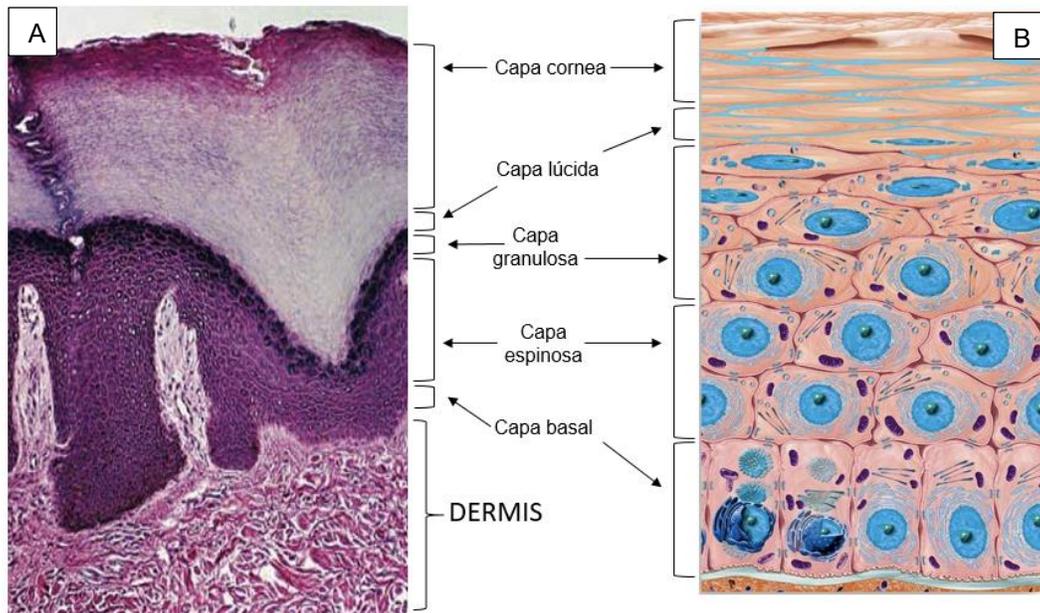


Fig.2. A) Micrografía de piel teñida mediante Hematoxilina-eosina 100X que muestra la secuencia de la estratificación de la epidermis y la capa subyacente, la dermis con fibras de colágena (Imagen modificada de Mescher et. al., 2016) comparada con **B)** esquema de la estructura de la epidermis en imagen tomada y modificada de internet.

1.1.2 Dermis

Debajo de la epidermis se encuentra la dermis, enriquecida por células alargadas llamadas fibroblastos dérmicos que producen principalmente proteínas de la familia de las colágenas y fibras elásticas que conforman la matriz extracelular (ECM) y otorgan elasticidad a la piel. (Ya-Chieh et. al., 2014). El estrato dermico se divide en dos capas: superficial o capa papilar y capa reticular o densa. La capa papilar o

superficial se encuentra en contacto directo con la epidermis, en esta zona el tejido se caracteriza por ser muy irregular y presentar múltiples proyecciones denominadas papilas dérmicas en las que se encuentran encapsulados mecanorreceptores como son: el bulbo terminal de Krause y corpúsculos de Meissner (Mescher et. al., 2016). Está compuesta principalmente de tejido conjuntivo laxo conformado por fibras de colágena tipo III y fibras elásticas que forman redes en las que se encuentran embebidos diferentes tipos celulares, principalmente fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas y cebadas.

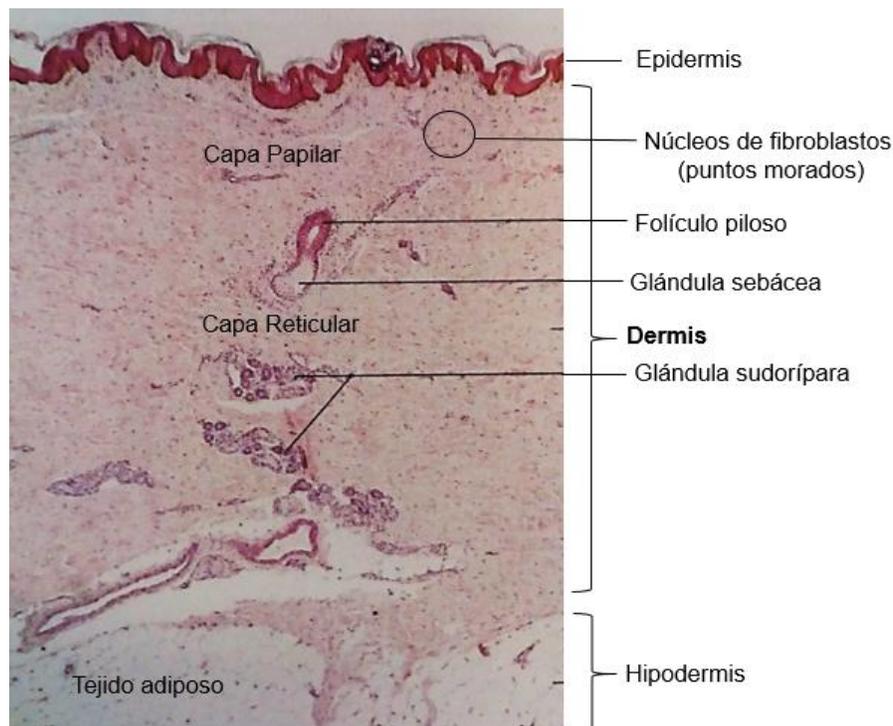


Fig. 3. Piel teñida mediante Hematoxilina-eosina 30X. Se muestra la dermis dividida en capa superficial (papilar) y capa densa (reticular) junto con los anexos epidérmicos y fibroblastos embebidos en una red de proteínas (colágenas), así como el estrato más profundo de la piel, la hipodermis (Imagen modificada de Geneser et. al., 1995).

La capa papilar también posee una gran cantidad de vasos sanguíneos de tipo capilar que regulan la temperatura corporal y nutren a las células del estrato superior (epidermis que es avascular). Por otro lado, la capa reticular o densa, es la zona más profunda de la dermis y está compuesta por tejido conectivo denso, principalmente por fibras de colágena tipo I agrupadas en haces grandes, paralelos a la superficie de la piel. Entremezcladas con las fibras de colágena encontramos

redes de fibras gruesas de elastina, y a su vez en esta red encontramos anexos epidérmicos como las glándulas sudoríparas, las glándulas sebáceas y los folículos pilosos. En las regiones más profundas de la capa reticular se localizan dos tipos de mecanorreceptores: los corpúsculos de Pacini, que responden a presión y vibraciones y los corpúsculos de Ruffini, que responden a fuerzas de tensión, así como grupos de células de músculo liso que generan la piloerección (Gartner et. al., 2002).

1.1.3 Hipodermis

Por debajo de la dermis se encuentra la hipodermis que es el estrato más profundo de la piel. Ambos estratos se encuentran relacionados de forma estructural y funcional debido a la continuidad de los apéndices epidérmicos, principalmente folículos pilosos, así como las redes de nervios y vasos sanguíneos. La hipodermis se encuentra conformada principalmente por adipocitos, células que presentan una morfología redonda en la que se puede observar el núcleo hacia la periferia debido a que la mayor parte del citoplasma se encuentra ocupado por lóculos donde se almacenan lípidos, este tejido adiposo almacena la grasa subcutánea que actúa como relleno protector, depósito de energía y como aislante térmico (Ya-Chieh et. al., 2014). Los adipocitos se encuentran organizados en lóbulos definidos por tabiques de tejido conjuntivo fibroso, mismos en los que también se encuentran localizados nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos, que inervan, nutren y drenan la región. Estas células se caracterizan por la secreción de la hormona leptina, encargada de dar una señal química que regula la cantidad y distribución de tejido graso. En la hipodermis se encuentran los vasos sanguíneos de mayor calibre en la piel, y cumplen la función de transportar nutrientes y permiten la migración de células del sistema inmunológico. Los vasos linfáticos cutáneos corren a través de la dermis e hipodermis, estos sirven como filtro para los residuos y actúan en la regulación de la hidratación tisular (Chu et. al., 2009).

2. Quemaduras

De acuerdo con la OMS, las quemaduras son lesiones a la piel u otro tejido orgánico causadas por la transferencia aguda de energía (mecánica, térmica, eléctrica, química o radiación). Este tipo de lesiones constituye un problema de salud pública a nivel mundial y provocan alrededor de 180,000 muertes al año (OMS, 2017). Incluso en algunas áreas del mundo, se ha informado que las quemaduras tienen una mayor incidencia que la malaria, el VIH, el SIDA y la tuberculosis (Ehanire et. al., 2013). En México, la tasa nacional promedio de quemaduras es 107.26 por cada 100,000 habitantes, lo que representa un promedio anual de quemados en los últimos 5 años de 113,531 pacientes (Secretaria de Salud, 2017). La mayoría de estos casos son atendidos en instituciones de salud pública como: Hospitales con o sin unidad de quemados del IMSS o ISSSSTE, Cruz Roja Mexicana o institutos de salubridad como el INR, donde el gobierno absorbe los gastos en atención médica ya que, debido a la gravedad de las lesiones dichos montos no siempre pueden ser solventados de forma exclusiva por los pacientes y sus familias (Moctezuma et. al., 2015).

2.1 Clasificación de quemaduras

Las quemaduras suelen ser clasificadas mediante dos parámetros: el porcentaje lesionado de la superficie total del cuerpo (% TBSA) y por la profundidad de la lesión asignando grados: primero, segundo, tercer y cuarto grado, dependiendo del daño causado en el tejido (Oryan et. al., 2017 & Stanford Children's Health, 2017). Se clasifican como quemaduras de primer grado, a las lesiones que afectan únicamente el estrato epidérmico, ocasionando una respuesta inflamatoria simple. Las quemaduras de segundo grado se caracterizan por presentar una lesión que se extiende desde la epidermis hasta la dermis sin destruir todos los elementos de la piel. Éstas a su vez se pueden subdividir en superficiales y profundas (Secretaria de Salud, 2016). Las lesiones categorizadas en segundo grado superficial, presentan daños que se extienden desde la epidermis y hasta la capa papilar del estrato dérmico, la superficie de la quemadura se caracteriza por ser húmeda, debido a las fugas de plasma en el área quemada. Las lesiones categorizadas en

segundo grado profundo, presentan daños que se extienden hasta la capa densa de la dermis afectando una mayor cantidad de derivados epidérmicos, el dolor es más grave y si ocurre una infección, entonces la herida puede convertirse en una quemadura de tercer grado donde la reepitelización depende de la degradación de la dermis, la cantidad de folículos y glándulas quemadas, así como de la extensión de las áreas infectadas (Oryan et. al., 2017). Las quemaduras de tercer grado son aquellas donde todos los estratos de la piel son dañados, incluyendo epidermis, dermis, hipodermis y anexos epidérmicos. Finalmente, las quemaduras de cuarto grado presentan daños en todos los estratos de la piel y también en tejidos subyacentes como hueso, músculo, tendones y terminaciones nerviosas (Stanford Children's Health, 2017).

2.2 Proceso de reparación de quemaduras

En vertebrados, cuando la piel es dañada está puede ser regenerada o reparada. La regeneración implica una substitución del tejido dañado generando nuevo tejido con las mismas características biológicas, mientras que en la reparación el tejido generado presenta fibrosis (en mayor o menor grado) y formación de cicatrices (Reinke et. al., 2012). En mamíferos adultos cuando hay una lesión en la piel por quemadura, se lleva a cabo una reparación del tejido cutáneo, que implica una serie de procesos biológicos complejos que determinan tanto el tiempo en que se puede reparar la lesión, así como las características de la cicatriz resultante (Ghieh et. al., 2015). La reparación óptima de una herida cutánea depende de varios mecanismos fisiológicos, principalmente de la coagulación inicial, la inflamación en la zona de la lesión, la migración y proliferación celular, la síntesis y deposición de matriz extracelular, angiogénesis, fibroplasia, reepitelización, contracción y remodelación del tejido dañado. Todos estos mecanismos se llevan a cabo de manera subsecuente en diferentes fases nombradas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación (Wu et. al., 2007 & Richardson et. al., 2013).

2.2.1 Hemostasia

La primera fase en la reparación de quemaduras es la hemostasia. En esta fase se desencadenan diferentes cascadas de coagulación, iniciadas por factores que se liberan debido a los cambios celulares y moleculares derivados de la quemadura al momento de iniciarse la lesión en la piel. Inmediatamente ocurrido el daño tisular se activa la agregación de trombocitos (plaquetas) por exposición de fragmentos de colágena perteneciente al tejido afectado. Al mismo tiempo, los vasos sanguíneos siguen una vasoconstricción de 5 a 10 minutos, desencadenada por las plaquetas para reducir la pérdida de sangre y llenar el vacío del tejido con un coagulo sanguíneo compuesto por citosinas pro-inflamatorias, fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospondinas formando una matriz provisional como una estructura de andamio para la migración de leucocitos, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales; también sirve como un depósito de factores de crecimiento. La formación de esta matriz provisional se forma inmediatamente después de que la piel ha sido lesionada y abarca el área total de la herida (Reinke et. al., 2012). En los pacientes que presentan quemaduras graves un sello distintivo de la respuesta inmediata local es, que el daño tisular inicial es seguido por una expansión progresiva de necrosis secundaria en ancho y profundidad de tejidos vecinos, inicialmente viables. Por lo tanto, a menudo se requiere desbridamiento quirúrgico en la zona afectada al inicio de la fase de hemostasia. Los mecanismos que conducen al daño tisular secundario en la fase temprana de la lesión probablemente implican respuestas inflamatorias locales exacerbadas junto con infiltración de neutrófilos que al activarse pueden inducir un daño colateral significativo liberando citosinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Stephan et. al., 2013).

2.2.2 Inflamación

La fase de inflamación es activada por una serie de cascadas bioquímicas presentes en la fase de hemostasia. La inflamación es una respuesta inmunológica inespecífica e innata que implica la limpieza de restos celulares, extracelulares y patógenos en el tejido. Tanto las plaquetas como los leucocitos presentes en la fase de hemostasia liberan citosinas inflamatorias como interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6,

IL-8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que proporcionan un gradiente quimiotáctico para leucocitos adicionales e iniciar el proceso inflamatorio. En particular, el PDGF juega un papel importante para iniciar la quimiotaxis de neutrófilos, monocitos, células del músculo liso y fibroblastos, mientras que en la etapa final de la fase inflamatoria el TGF- β promueve la transformación de monocitos a macrófagos. La respuesta inflamatoria inicial esta mediada por neutrófilos durante los primeros dos a cinco días de la lesión y por macrófagos a partir del tercer día después de la lesión. Por lo tanto, al inicio del proceso inflamatorio el coagulo que se ha ido conformando desde la hemostasia se encuentra sumamente infiltrado por estas células inmunológicas, así como por pequeños capilares que ayudan a las mismas células a llegar a la zona de la lesión. Los neutrófilos tienen la función de eliminar bacterias a partir de la generación de radicales libres, también secretan enzimas proteolíticas que descomponen el tejido dañado o no viable, estas enzimas incluyen a las metaloproteinasas de matriz (MMP) que degradan los fragmentos de colágena. Por último, los neutrófilos fagocitan a las bacterias muertas y los restos de matriz, así una vez completadas sus tareas por lo general estas células sufren apoptosis y son fagocitados por macrófagos. A medida que los monocitos migran a la herida y maduran en macrófagos pueden eliminar cualquier célula huésped no funcional como: neutrófilos llenos de bacterias, matriz dañada, restos extraños y bacterias restantes mediante fagocitosis. Los macrófagos activados secretan más factores de crecimiento que pueden amplificar la respuesta inflamatoria y reclutar células endoteliales mediante el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) así como fibroblastos que darán paso a la siguiente fase de reparación cutánea. Hacia el final del proceso inflamatorio la matriz provisional que se encontraba infiltrada por neutrófilos, monocitos, macrófagos y capilares se va necrosando debido a la apoptosis que llevan a cabo estas células, al mismo tiempo los factores de crecimiento y citosinas quimio-atrayentes promueven que otras células como los fibroblastos migren hacia esta matriz y se vaya conformando el tejido de granulación e inicie la fase proliferativa. El alcance y la duración de la inflamación son los contribuyentes más importantes en la formación de la cicatriz

porque si bien la inflamación es vital para eliminar la infección y tejido dañado también puede causar daño tisular si se prolonga, lo que provocaría un aumento de cicatrices o heridas crónicas (Zhao et. al., 2016 & Oryan et. al., 2017).

2.2.3 Proliferación

La fase de proliferación comienza de 24 a 48 horas después de la lesión cuando los primeros fibroblastos quimioatraídos por factores producidos por macrófagos llegan al coágulo de fibrina. Una vez en el coágulo, los fibroblastos proliferan y secretan metaloproteinasa de matriz (MMP's) y componentes de la matriz extracelular (EMC) incluyendo colágena III, ácido hialurónico y fibronectina, transformando el coágulo en una nueva matriz de tejido conectivo (Bainbridge et. al., 2013). Durante esta fase también se lleva a cabo el recubrimiento de la superficie de la lesión mediante formación de tejido de granulación, reepitelización y la restauración de la red vascular (neovascularización). La reepitelización es el proceso por el cual se crea nueva epidermis gracias a la proliferación de queratinocitos que se encuentran en la periferia de la herida y que migran hacia la matriz extracelular recién formada por fibroblastos que fueron quimioatraídos previamente. Las células madre que se encuentran en el bulbo de los folículos pilosos también participan en la restauración de la epidermis, ya que éstas se diferencian a células progenitoras epidérmicas. La neovascularización implica el crecimiento de vasos sanguíneos mediante angiogénesis de nuevos vasos que puedan proporcionar nutrientes, oxígeno y aporten células inmunes al lecho de la herida, así como también ayuden a eliminar desechos, lo cual es indispensable para la reparación y el mantenimiento del tejido (Castaño et. al., 2018). El tejido conectivo formado inicialmente por los fibroblastos conforma el tejido de granulación, que se caracteriza histológicamente por presentar un color rojo o rosado intenso debido a que este tejido es invadido por una red vascular y presenta haces de colágena poco organizada, así como otros componentes de la matriz extracelular, fibroblastos, células inflamatorias y vasos linfáticos. Durante la maduración de la herida la formación de tejido de granulación se detiene a través de apoptosis de las células que lo conforman, esto caracteriza a la lesión como avascular y también como acelular. Por otro lado, los componentes

de la matriz extracelular sufren ciertos cambios como la alineación de proteínas estructurales, que nos indican que la lesión está entrando a la fase de remodelación. El punto final fisiológico de heridas en mamíferos adultos es la formación de una cicatriz que está directamente relacionada con la extensión del proceso inflamatorio a lo largo de donde se reparó la herida (Reinke et. al., 2012).

2.2.4 Remodelación

La última fase en la reparación de lesiones es la remodelación, en la cual se presentan principalmente modificaciones en la matriz extracelular que fue sintetizada en las fases anteriores. La regulación de la deposición de la matriz extracelular es un evento clave en la reparación normal de una lesión. En este proceso las moléculas que conformarán la matriz necesitan ser rápidamente sintetizadas desde el inicio de la lesión cuando se comienza a formar la matriz provisional donde el componente proteico principal es la colágena tipo III, hasta el remplazamiento por tejido conectivo maduro cuando hay un recambio de colágena tipo III por colágena tipo I. Sin embargo, para que exista un funcionamiento normal de los tejidos debe haber un balance riguroso entre la síntesis y la degradación de matriz extracelular ya que una excesiva deposición de tejido conectivo, es un marcador patológico de fibrosis y puede ocasionar cicatrices hipertróficas o queloides (Eckes et. al., 2000). Una forma de mantener el balance entre la síntesis y la degradación de matriz extracelular es a través de mediadores secretados por células del sistema inmune principalmente macrófagos o fibroblastos que pueden influenciar la producción de metaloproteinasa de matriz (MMP), ya que las principales enzimas que degradan colágena tipo I y III, son MMP-1 y MMP-8 (Diniz et. al., 2018).

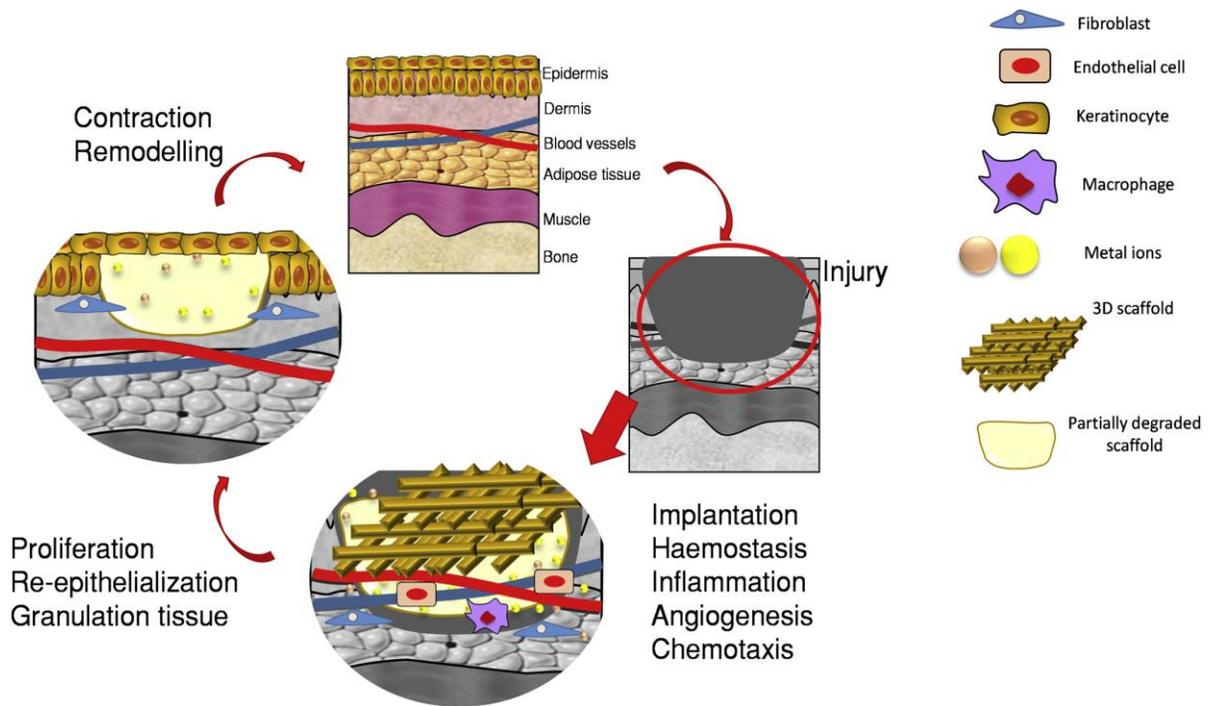


Fig. 4. Proceso de reparación de la quemadura. (imagen tomada de Castaño et. al., 2018).

2.3 Importancia de la colágena

Las colágenas representan el 70% del peso seco de la piel y contribuyen al atrapamiento, almacenamiento local y entrega de factores de crecimiento, así como citosinas, por lo cual juegan un rol importante durante la reparación de heridas. La familia de proteínas más abundante en la matriz extracelular son las colágenas con más de 20 tipos diferentes de colágenas identificadas. La función primaria de la matriz extracelular es dar sostén a los tejidos y mantener las propiedades bioquímicas y mecánicas específicas de los tejidos mediante interacciones moleculares con receptores presentes en las células. Además de ser capaces de formar redes y tener funciones de anclaje, pueden contribuir a la formación de andamios biológicos que promuevan la reparación o regeneración de tejidos (Gelse et. al., 2003). En la piel, la colágena tipo I es la más abundante, su estructura molecular es robusta, formada por una triple hélice heterotrimérica de dos cadenas α -1 idénticas y una cadena α -2. Esta colágena *in vivo* está entrelazada a fibras de elastina y se encuentra presente en tejidos que contienen también colágena tipo III,

proteína conformada estructuralmente por un homotrimero de tres cadenas α -1, lo que la hace menos robusta en comparación con la colágena tipo I. En la piel humana normal, la colágena tipo I constituye el 80% de la dermis mientras que la colágena tipo III, se encuentra en proporciones bajas en la dermis papilar. Durante la reparación de las quemaduras, la colágena tipo III es sintetizada en etapas iniciales y reemplazada por colágena tipo I en la maduración de la herida (Portas et. al., 2002 & Diniz et. al., 2018).

3. Tratamientos

Las heridas por quemaduras pueden llegar a ser lesiones complejas y en constante evolución. En quemaduras extensas, además del daño tisular local se llegan a producir consecuencias sistémicas graves por lo que la curación inicial incluye el retiro del tejido desvitalizado (desbridamiento), debido a que el tejido quemado es altamente tóxico, ya que se forman complejos lípido-proteicos que promueven la necrosis de tejido adyacente y posteriormente lavado con suero. (Secretaría de Salud “Gran Quemado”, 2009 & Girard et. al., 2017). Los tratamientos para curar quemaduras de espesor profundo requieren una cobertura temporal para las heridas ya sea mediante el uso de injertos o sustitutos de piel. Actualmente los tratamientos para quemaduras se dirigen a promover una mejor cicatrización, debido a que los pacientes que sufren lesiones de espesor profundo pueden también sufrir discapacidades a largo plazo debido a una mala reparación de la lesión, ya que esto puede generar un exceso de cicatrices y contracturas de la piel. Las mejoras en la tecnología y los avances en la comprensión de la cicatrización de heridas han impulsado el desarrollo de nuevos apósitos permitiéndonos ampliar la cantidad de vendajes disponibles. La selección del vendaje debe basarse en sus efectos de curación, facilidad de aplicación y eliminación, así como del costo y la comodidad del paciente. (Wasiak et. al., 2008 & Singer et. al., 2017).

3.1 Tratamientos convencionales

Los tratamientos convencionales para la curación de lesiones por quemaduras incluyen autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. Los autoinjertos son todavía el

estándar de oro entre todas las opciones para el manejo de quemaduras, mientras que los aloinjertos y xenoinjertos presentan mayores limitaciones, incluyendo el riesgo de transmisión de enfermedades y una menor capacidad para integrarse en el tejido del paciente (Yamamoto et. al., 2018). El injerto de piel autóloga es la primera opción para tratar pacientes con quemaduras de espesor completo, ya que este injerto no presenta problemas de inmunocompatibilidad. Sin embargo, presenta desventajas como: disponibilidad limitada, problemas cosméticos de morbilidad del sitio donante y una cirugía doble que aumenta los costos. Además, de que generar una nueva herida en el paciente aumenta el porcentaje total de la superficie de piel lesionada y con ello la pérdida de agua y electrolitos en el cuerpo del paciente, el autoinjerto de piel es muy difícil de realizar en pacientes con quemaduras que afectan a más de 50-60% de la TBSA debido a la escasa disponibilidad de tejido sano (Girard et. al., 2017). Los aloinjertos son otra opción para tratar heridas por quemaduras profundas. El aloinjerto de piel cadavérica, es un biomaterial estándar para usar como reemplazo temporal de piel en quemaduras, ya que éste propicia un entorno ideal para el crecimiento de queratinocitos y la reconstitución de la piel, reduce la pérdida de líquidos, electrolitos y proteínas. Sin embargo, incluye el riesgo de infecciones, así como la adquisición de enfermedades (VIH y Hepatitis) por el paciente, aunado a esto el paciente puede presentar rechazo al injerto debido a la presencia de moléculas de histocompatibilidad diferentes a las propias del paciente quemado. El rechazo a los aloinjertos también puede aumentar los costos de curación porque en estas circunstancias puede ser requerida otra cirugía (Oryan et. al., 2017). Los xenoinjertos tiene la ventaja de estar más disponibles en tamaños más grandes y pueden ser procesados en diferentes condiciones y por diferentes tecnologías, como la ingeniería de tejidos. Sin embargo, los xenoinjertos frescos y naturales tienen mayores limitaciones que los autoinjertos y aloinjertos porque pueden ser más fácilmente rechazados por el paciente debido a que pueden producir mayores reacciones de hipersensibilidad y también podrían transmitir enfermedades zoonóticas, como la encefalitis espongiforme y la rabia (Oryan et. al., 2013).

3.2 Tratamientos innovadores

Las investigaciones sobre cómo mejorar los tratamientos convencionales para curar lesiones cutáneas por quemadura han avanzado mucho en los últimos años y se han generado tratamientos con sustitutos de piel tanto artificiales como de origen biológico.

3.2.1 Sustitutos de piel

Entre los tratamientos más innovadores para el manejo de quemaduras se encuentran los sustitutos comerciales de piel. Estos sustitutos son utilizados como tratamiento en enfermedades genéticas que involucran heridas crónicas, traumatismos y quemaduras que involucran el 60% o más de la superficie corporal total lesionada (TBSA). Los sustitutos de piel son un grupo de materiales con los cuales se cubren heridas dérmicas para suplir las funciones de la piel. Dentro de los sustitutos más populares en el mercado están: TranCyte, Biobrane, Kollagen, Matriderm, Alloderm, Apligraf, Dermagraft e Integra; siendo este último el más aceptada (Roa et. al., 2015). Actualmente en México se utilizan principalmente sustitutos de piel importados como Alloderm (dermis alogénica procesada), Integra (bicapa de silicona y colágeno bovino más condroitin 6-sulfato) y Dermagraft (malla de poliglactin bioabsorbible más fibroblastos neonatales), aunque también existe Epifast, un producto nacional que consiste en una membrana epidérmica humana criopreservada. Sin embargo, la principal limitación para hacer uso de los sustitutos de piel en nuestro país es su costo elevado que restringe su acceso a muchos pacientes. Otra limitante es el método de elaboración tisular, ya que el paciente necesita un injerto inmediatamente y el cultivo celular requiere de al menos 20 días para su producción (Álvarez et. al., 2012 & CINVESTAV, 2018).

3.2.1.1 Amnios humano

En los últimos años se ha incursionado en la generación de biomateriales acelulares que puedan utilizarse en combinación o no con injertos para mejorar la eficiencia en la reparación de lesiones. Los sustitutos biológicos de piel como el amnios humano o la piel de cerdo tienen la ventaja de ser abundantes, económicamente accesibles y poseer una matriz extracelular natural que permite una mejor reepitelización por

la presencia de la membrana basal (Girard et. al., 2017). La membrana amniótica es un tejido de origen embrionario, que se compone de tres capas: una epitelial simple conformada por células cubicas que está en contacto directo con el líquido amniótico, esta capa está soportada por una membrana basal; la capa mesénquima que presenta tres regiones: una acelular compuesta por colágena tipo I y III, la segunda conformada por células similares a fibroblastos y finalmente otra región de colágenas dispuestas aleatoriamente que separan la membrana amniótica del corion (Mamede et. al., 2012). Debido a sus propiedades biológicas y a que es desechado al nacimiento, esta membrana ha sido aprovechada como cobertura temporal en quemaduras de espesor parcial y en estudios recientes se han observado mejores resultados comparándola con aloinjertos ya que el uso de esta membrana reduce la pérdida de proteínas y electrolitos, y se ha observado que acelera la cicatrización. Además, hay una regresión del área de la herida mayor, así como una reducción en el infiltrado de células inmunes, mayor proliferación de fibroblastos y una mayor deposición de fibras de colágena maduras (Dias et. al., 2018). Las principales ventajas de la utilización de esta membrana es que su almacenamiento y preparación tiene bajo costo, es por eso que se utiliza principalmente en países con economías emergentes, donde el acceso a otros sustitutos de piel es limitado (Álvarez, 2012).

3.2.1.2 Piel porcina

Históricamente, la piel de varias especies (por ejemplo, pollo, rata, paloma, gato, perro, rana, vaca, cerdo) se han utilizado como vendajes biológicos o coberturas en humanos, el primer xenoinjerto temporal reportado se remonta a 1500 a.C., utilizando tejido de ranas. Actualmente, la piel de cerdo se ha utilizado ampliamente como un apósito temporal para quemaduras ya que es similar a la piel humana en su estructura histológica y es de bajo costo (Cooper et. al., 2015). En estudios recientes se ha demostrado que el uso de apósitos temporales de piel porcina tiene efectos beneficiosos en la reparación de heridas en la piel, ya que el uso de dermis porcina descelularizada en quemaduras de espesor profundo muestra una mayor proliferación de fibroblastos dérmicos sin exhibir características profibroticas (Zou

et. al., 2017 & Yamamoto et. al., 2018). Aunado a esto las membranas de piel porcina presentan una buena integración con el tejido conectivo circundante ayudando a la reparación de lesiones ya que son biocompatibles, biodegradables e inducen la migración celular (Dash et. al., 2018). Por lo tanto, podemos considerarla como una membrana que funciona como barrera evitando la desecación de la piel y como una guía en la regeneración tisular (Yin-Zhe et. al., 2017).

3.2.2 Células troncales mesénquimales

En organismos adultos, a lo largo del cuerpo se presentan células troncales que son células indiferenciadas encargadas del reemplazamiento constante y mantenimiento de los tejidos. Estas células se conocen como células troncales mesenquimales (MSC's) y se pueden aislar a partir de la mayoría de los tejidos del cuerpo, a inicios del empleo de estas células de forma terapéutica el tejido más utilizado fue la médula ósea. Sin embargo, en la última década se ha trabajado por encontrar nuevas fuentes de células troncales mesenquimales que implique técnicas menos invasivas para su obtención, así como las derivadas de sangre de cordón umbilical y tejido adiposo (Luo et. al., 2010 & Hirt et. al., 2011). Las MSC se han utilizado recientemente para promover la reparación de las heridas causadas por quemaduras. No solo se ha demostrado que las células troncales promueven una mejor y más rápida reparación de las quemaduras, sino que también han disminuido los niveles de inflamación ayudando a evitar la fibrosis y la formación de cicatrices queloides (Ghieh et. al., 2015). También el uso local de MSC's en quemaduras resulta en la aceleración del cierre de la herida, incremento en la formación del tejido de granulación, aumenta la angiogénesis y suprimen la inflamación en heridas (Hocking et. al., 2011).

3.2.2.1 Células troncales mesénquimales derivadas de tejido adiposo

El tejido adiposo se ha convertido en una fuente atractiva y abundante para la obtención de células troncales mesenquimales (MSC) con aplicabilidad terapéutica en diversos campos para la reparación y regeneración de tejidos dañados. Una parte de las células vasculares estromales (SVF) del tejido adiposo puede ser una

fuelle abundante de células multipotentes y pluripotentes, conocidas como células troncales derivadas de tejido adiposo o células estromales derivadas de tejido adiposo (ADMSC). Estas células se caracterizan por un alto potencial de proliferación y capacidad de diferenciarse en células de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico, al igual que las células troncales mesénquimales extraídas de la medula ósea (BMSC), (Harasymiak et. al., 2013). Las ADMSC tienen una gran ventaja sobre las BMSC ya que estas se encuentran en mayores proporciones dentro del tejido adiposo subcutáneo y pueden ser fácilmente expandidas in vitro. Además, se ha demostrado que las ADMSC son inmunoprivilegiadas, previniendo una respuesta inflamatoria exacerbada cuando son implantadas en lesiones por quemaduras debido a la secreción de citosinas que atenúan la respuesta inmune innata (Gimble et. al., 2010). Por otro lado, la ventaja de utilizar las ADMSC es que no implica un procedimiento doloroso ya que se puede utilizar el tejido obtenido de lipoaspirados estéticos. Por lo tanto, el tejido adiposo se ha convertido en una opción atractiva y representa una fuente alternativa de células troncales (Lindroos et. al., 2011). En los últimos años se han hecho análisis de los factores solubles liberados por ADMSCs humanas cultivadas y se observa que en pasajes tempranos, secretan factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento transformante beta TGF- β , factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de necrosis tumoral (TNF- α), IL-6, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y ácido ascórbico; y en modelos murinos estas células tienen potencial para secretar factores que modulan la reparación de lesiones que actúan de manera paracrina como: factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de insulina (IGF), enzimas como metaloproteinasas de matriz (MMP) y citosinas inmunomoduladoras que incluyen al interferón- λ , TNF- α , IL-1 α , e IL-1 β , hecho que está relacionado con un aumento de la angiogénesis, proliferación de queratinocitos y fibroblastos dérmicos en lesiones por quemaduras (Mizuno et. al., 2012 & Dash et. al., 2018).

III. Planteamiento del problema

Los tratamientos en pacientes con quemaduras han sido un problema médico difícil y a lo largo del tiempo se han utilizado diversos métodos para tratar este tipo de lesiones localmente. Sin embargo, en la última década, se ha incursionado en el desarrollo de nuevos protocolos de tratamiento en lesiones por quemaduras para mejorar la cicatrización de heridas con el objetivo primordial de restaurar la función de barrera de la piel y también proporcionar un mejor resultado estético. Las lesiones por quemaduras profundas también alteran la integridad de la inervación sensible a la piel y tiene un impacto en la calidad de vida del paciente al comprometer las percepciones de tacto, temperatura y dolor. Por lo tanto, los pacientes pueden sufrir discapacidades a largo plazo (Girard et. al., 2017). En México, la tasa nacional promedio anual de quemados en los últimos 5 años es de 113,531 pacientes (Secretaria de Salud, 2017). La atención médica de un paciente quemado en nuestro país tiene un costo muy elevado debido a los gastos pre-hospitalarios y hospitalarios. En la mayoría de los casos el gobierno paga dicha atención médica en instituciones de salud pública ya que dichos montos no pueden ser solventados de forma exclusiva por los pacientes y sus familias (Moctezuma et. al., 2015). Por esta razón se ha buscado mejorar los métodos para tratar lesiones por quemaduras profundas y dar lugar a importantes mejoras en las tasas de mortalidad de las víctimas de quemaduras y disminuir el costo de los tratamientos. En el campo de la ingeniería de tejidos se ha considerado que una opción eficiente para atacar este problema es la generación de estructuras tridimensionales conformadas principalmente por andamios o materiales de soporte donde se pueden sembrar células, estas estructuras son llamadas constructos biológicos, y para la elaboración de este proyecto se han utilizado cómo andamios membranas biológicas accesibles (el amnios humano y la piel de cerdo) sembradas con ADMSC que se ha considerado pueden ayudar en la reparación de la lesión y sean económicamente accesibles.

IV. Antecedentes

Debido a la necesidad de innovar y optimizar los tratamientos actuales para tratar las lesiones por quemadura, en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) se ha trabajado desde hace varios años en la generación de dos constructos biológicos, utilizando como andamios la piel de cerdo y el amnios humano, ya que estos biomateriales han mostrado tener propiedades benéficas en la reparación de lesiones cuando se utilizan como cubierta temporal debido a que la piel de cerdo presenta similitudes con la piel humana en algunas características como el espesor de la dermis y la composición y cantidad de tejido adiposo subcutáneo y por su parte el amnios humano presenta características anti-inflamatorias y posee una adherencia natural y óptima a la herida, además de ser bacteriostática y no presentar reacciones inmunológicas no deseadas (Koob et. al., 2014; Singh et. al., 2011; Cooper et. al., 2015 & Dash et. al., 2018). Ambos andamios se obtuvieron mediante la descellularización de las membranas y se les esterilizo a través de la técnica de radioesterilización en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). Para la configuración de los constructos biológicos se sembraron, en ambos andamios: piel de cerdo radioesterilizada (PPR) y amnios humano radioesterilizado (AHR), células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hADMSC). Una vez sembradas las células sobre los andamios, se evaluó, el porcentaje de viabilidad y de proliferación celular *in vitro*, así como secreción de citosinas anti-inflamatorias y se observaron resultados positivos (Sánchez et. al., 2015), que impulsaron a generar un modelo *in vivo* de quemadura en ratones atímicos Nu/Nu a los que se les aplicaron los dos tratamientos utilizando los constructos biológicos: AHR+hADMSC y PPR+hADMSC previamente descritos. Con base a lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se evaluará la eficiencia de los constructos biológicos en la reparación de las heridas post-quemadura en un modelo murino.

V. Hipótesis

De acuerdo con lo observado en estudios previos hemos establecido que sí el efecto de uno o ambos constructos biológicos (PPR+hADMSC y AHR+hADMSC) contribuye de manera positiva en la reparación de la lesión por quemadura, entonces observaremos una mayor reparación dermo-epidérmica o una aceleración en el proceso de reparación de las heridas tratadas. Asimismo, el área de la herida se verá disminuida con la presencia de los tratamientos.

VI. Objetivos

1. Objetivo general

Evaluar histológicamente el efecto en la reparación del tejido cutáneo post-quemadura tratado con dos constructos biológicos (PPR+hADMSC y AHR+hADMSC) en un modelo murino.

2. Objetivos específicos

- Estimar la reparación de la herida por quemadura mediante la comparación del tamaño inicial y el tamaño final de la lesión a los 14 y 21 días post-quemadura.
- Evaluar histológicamente la formación de tejido de granulación, la reparación dermo-epidérmica y la deposición de colágena tipo III y tipo I durante el proceso de reparación de la lesión a los 7, 14 y 21 días post-quemadura.

VII. Material y método

1. Constructos biológicos

La generación de los constructos biológicos se realizó en dos fases: la primera se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) dentro del banco de tejidos radioesterilizados, donde los andamios: la piel porcina y el amnios humano se radioesterilizaron. La segunda fase se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), en donde se aislaron las células troncales mesénquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hADMSC) y se cultivaron sobre los andamios radioesterilizados (Sánchez, 2015).

2. Material biológico

Para realizar el presente estudio se elaboró un modelo de quemadura en ratones atómicos (Nu/Nu) machos de 8 semanas de nacidos. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). El protocolo para llevar a cabo el manejo, cuidado y experimentación se siguió conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

3. Desarrollo experimental

La evaluación de los constructos biológicos generados se llevó a cabo mediante la realización de tres experimentos donde se hizo un análisis histológico del proceso de reparación cutánea a los 7 (n=15), 14 (n=25) y 21 (n=27) días post-quemadura.

3.1 Modelo de quemadura

En cada experimento, se generó un modelo de quemadura profunda de la siguiente manera: se anestesió a cada ratón mediante la inyección de Ketamina (100 mg/kg) y Xilazina (40 mg/kg). Una vez que el ratón se encontraba bajo el efecto de la anestesia, se limpió la zona del dorso con yodo y se realizó una quemadura de 1cm de diámetro utilizando un artefacto redondo de metal (cobre), que fue calentado por exposición a fuego durante 10 segundos hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 80°C, posteriormente este artefacto se colocó sobre el dorso del

ratón durante 3 segundos. Finalmente, como medida aséptica se desbrido el tejido necrosado para su posterior tratamiento. Este procedimiento fue repetido en cada uno de los ratones.

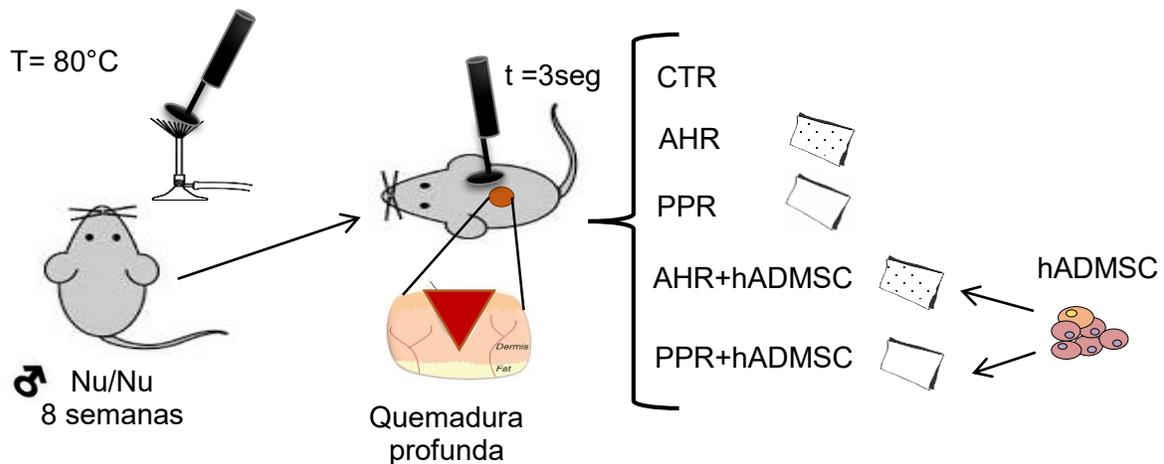
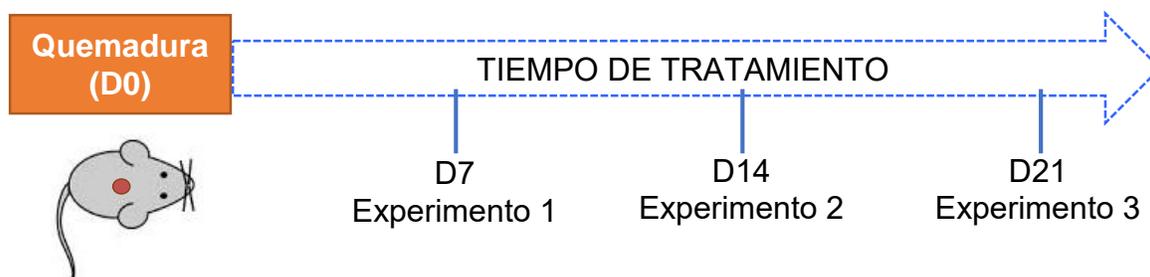


Fig.5 Generación del modelo de quemadura y aplicación de tratamientos.

3.2 Aplicación de tratamientos

Para cada experimento se diseñaron cinco grupos de 3 a 6 ratones. Se estableció un grupo como control (CTR) a este grupo de ratones no se le aplicó ningún tratamiento y poder observar el procedimiento fisiológico normal de reparación de la lesión. Los cuatro grupos restantes se emplearon para observar el efecto de los dos tratamientos experimentales (AHR+hADMSC y PPR+hADMSC). A dos grupos de ratones se les trató con andamios biológicos sin hADMSC para poder comparar el efecto únicamente de los andamios; en un primer grupo una vez realizada y desbrida la quemadura se colocó un andamio de amnios humano radioesterilizado (AHR) y en el segundo grupo de ratones se colocó el andamio de piel porcina radioesterilizada (PPR), una vez colocados los andamios se protegió la lesión tratada con una gasa y vendaje. Finalmente, en los dos grupos restantes se colocaron los constructos biológicos como tratamiento; en un grupo se colocó la piel porcina radioesterilizada con células troncales mesénquimales (PPR+hADMSC) y en otro grupo se colocó el amnios humano radioesterilizado con células troncales mesénquimales (AHR+hADMSC), posteriormente también se protegió la zona de la

lesión con una gasa y vendaje. Una vez colocados los tratamientos a todos los animales se les administró solución salina y fentanilo (10 mg/kg) vía intramuscular como analgésico.



TRATAMIENTOS	N (número de ratones por grupo)		
CTR	3	5	5
AHR	3	5	5
AHR+hADMSC	3	5	6
PPR	3	5	5
PPR+hADMSC	3	5	6

Fig.6 Organización de grupos y aplicación de tratamientos para los tres experimentos: día 7 (D7), día 14 (D14) y día 21 (D21) post-quemadura.

3.3 Seguimiento fotográfico

En los tres experimentos se hizo un seguimiento fotográfico del área de la herida desde el día cero hasta el día del sacrificio (D7, D14 y D21 post-quemadura). Las fotografías fueron tomadas por una cámara Canon fijada en un tripee a la misma distancia del ratón en cada captura y colocando una regla cerca de cada ratón como escala de referencia, así como una etiqueta que indica la condición y número de experimento al que pertenece cada ratón.

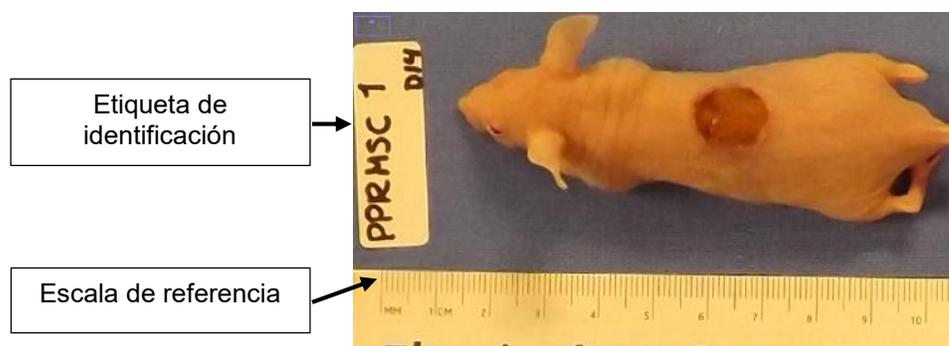


Fig. 7. Captura fotográfica para el seguimiento del cierre de la lesión.

3.3.1 Análisis de imagen

El área de superficie de la herida se midió en mm^2 con la ayuda del software ImageJ. El porcentaje de cierre de la herida se cuantificó mediante la comparación del diámetro de la herida inicial (día cero, en el que se generó la quemadura) con el tamaño de la herida al momento del sacrificio de los ratones (D7, D14 y D21 post-quemadura) a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de quemadura} = (\text{área inicial de la herida} / \text{área final de la herida}) * 100$$

3.4 Obtención de muestras

Para la obtención de muestras, en el primer experimento el sacrificio de los animales se realizó al día 7 post-quemadura usando una $n=3$ para cada tratamiento, en el segundo experimento el sacrificio se llevó a cabo al día 14 post-quemadura con una $n=5$ para cada tratamiento y finalmente en el experimento tres el sacrificio de los animales fue al día 21 post-quemadura con una $n=5$ para los tratamientos CTR, AHR y PPR y una $n=6$ para los tratamientos AHR+MSC y PPR+MSC; la cantidad de ratones por experimento y condición se adecuó a la disponibilidad de los animales. En todos los experimentos se sacrificó a los animales mediante dislocación cervical e inmediatamente se obtuvieron las biopsias de piel afectada. El tejido cutáneo extraído de los animales se fijó en PFA 4% durante 24 horas.

3.5 Procesamiento histológico

Posterior a la fijación de las biopsias, las muestras de tejido fueron deshidratadas con alcoholes graduales y subsecuentes al 60%, 70%, 80%, 96% (2x) y 100% (2x) y xilol (2x), 40 minutos en cada uno. El tejido se incluyó en bloques de parafina que se dejaron enfriar y almacenaron a temperatura ambiente. A partir de estos bloques se obtuvieron cortes histológicos a tres profundidades de una misma biopsia con un grosor de $5\mu m$ en un micrótopo Leica y se montaron en portaobjetos con TESPA para su procesamiento subsecuente.

3.5.1 Tinción de Herovici

Los cortes histológicos fueron teñidos con la técnica de Herovici, ya que esta tinción nos permite observar el estado y la composición general del tejido cutáneo, así como los cambios en la deposición de la colágena durante el proceso de reparación de la quemadura debido a que la colágena I (compacta) se tiñe de rojo, mientras que la colágena III (menos compacta) se tiñe de azul (Salgado et. al., 2012). Para realizar la tinción, el tejido se desparafinó a 60 °C, 15 minutos y se lavó dos veces con xilol, por 5 minutos. Las muestras fueron rehidratadas con alcoholes graduales subsecuentes al 100% (2x), 96%(2x), 80%, 70%, 60%, 50%, durante 1 minuto cada uno y dos lavados con agua destilada por 1 y 5 minutos respectivamente. Antes de iniciar la tinción las muestras fueron tratadas con PBS/Tween al 0.1% por 5 minutos para mejorar la adhesión de los colorantes al tejido. La coloración se llevó a cabo exponiendo las muestras en una solución de azul de celestino durante 7 minutos seguida de un lavado con agua corriente, después se colocaron en una solución de hematoxilina de Regaud durante 5 minutos, se lavaron y se sumergieron en una solución de amarillo de metalino durante 2 minutos, los colorantes se diferenciaron mediante un lavado rápido en una solución de ácido acético glacial al 0.5%, y se viraron con una solución de Carbonato de Litio al 1% durante 2 minutos, después se hizo una contra-tinción con una mezcla policrómica durante 2 minutos. Finalmente, las muestras se lavaron con ácido acético glacial al 1% durante 2 minutos, se secaron con un lavado en xilol de 2 minutos y se montaron con resina.

3.5.2 Análisis histológico

El análisis histológico de los cortes obtenidos del tejido cutáneo a los días 7, 14 y 21 post-quemadura que fueron previamente teñidos mediante la técnica de Herovici, se llevó a cabo a través de la observación al microscopio óptico vertical marca Axiolmager.Z1 y se evaluaron los siguientes rubros: reparación epidérmica, vascularización dérmica, tejido de granulación y deposición de colágena tipo I y tipo III, asignando un índice histológico representado por un número dependiendo del estado observado en cada muestra (Tabla 1). Las condiciones para establecer el índice histológico asignado para las colágenas I y III fue el mismo.

Índice Histológico	Reparación epidérmica	Vascularización dérmica	Tejido de granulación	Deposición de colágena
1-3	Reepitelización de mínima del 10 al 39%	Con escasa presencia de vasos sanguíneos en la zona central de la cama de la herida.	Presente únicamente en los bordes o de manera residual a lo largo de la herida.	Densidad baja (< 30%)
4-7	Reepitelización moderada del 40 al 79%	Con moderada presencia de vasos sanguíneos en la zona central de la cama de la herida.	Presente en el 30-50% de la cama de la herida.	Densidad media (30-50%)
8-10	Reepitelización avanzada o completa del 80 al 100%	Con abundante presencia de vasos sanguíneos en la zona central de la cama de la herida.	Abundante en los bordes y presente en más del 50% de la cama de la herida.	Densidad alta (>50%)

Tabla 1. Índice Histológico modificado de Wu. et al., 2007.

3.6 Análisis estadístico

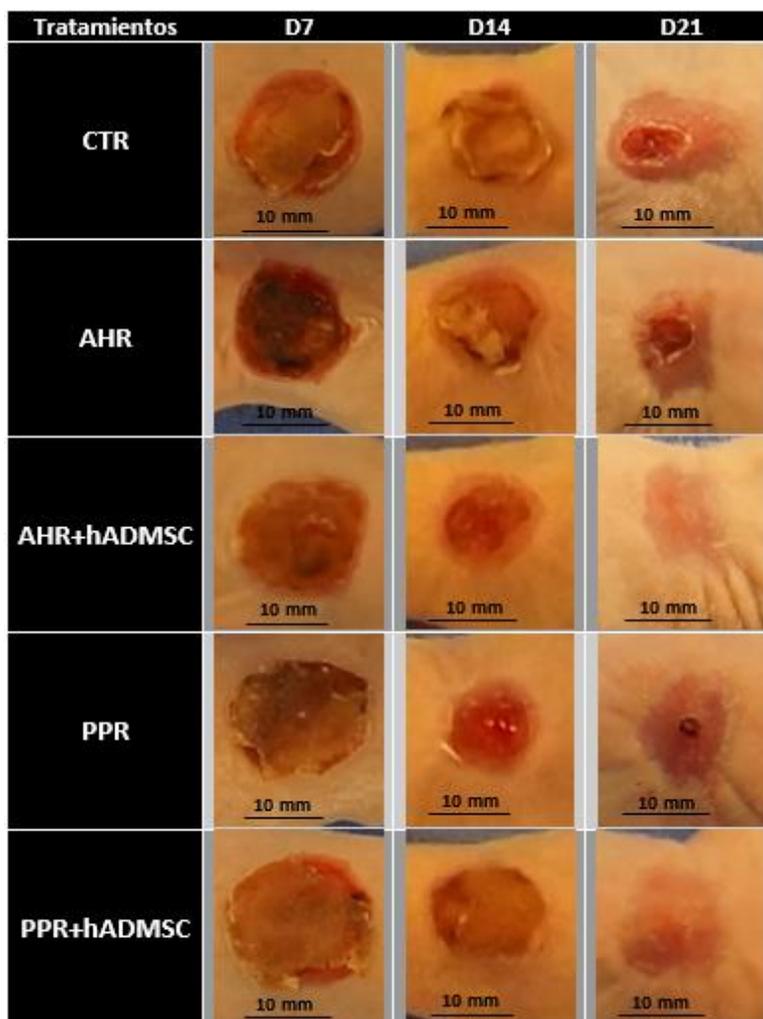
Para el análisis de cada variable, los datos se sometieron a una prueba de normalidad mediante el test Levene's tomando como distribución normal aquellos datos que obtuvieron una $p > 0.05$ y anormales aquellos que obtuvieron una $p < 0.05$. Las variables con datos de distribución normal se analizaron con la prueba estadística ANOVA seguida por la prueba de Tukey, considerando una $p < 0.05$ como significativa. Las variables con datos de distribución anormal se analizaron con la prueba estadística Kruskal Wallis, considerando una $p < 0.05$ como significativa. Todos los análisis se realizaron usando el paquete estadístico STATISTICA 64.

VIII. Resultados

En el presente estudio se evaluó histológicamente el efecto de los constructos biológicos experimentales: AHR+hADMSC y PPR+hADMSC, en la reparación del tejido cutáneo lesionado por quemadura. Comparando con grupos tratados únicamente con andamios: AHR y PPR, así como con el grupo CTR.

1. Cierre de la herida

Se evaluó de manera macroscópica las heridas de la piel de los animales de cada grupo a los días 7, 14 y 21 post-quemadura en términos de la reducción del área de la herida mediante un seguimiento fotográfico (Panel 1). Las fotografías del panel 1



nos muestran que, al D7, la zona de la quemadura presenta una coloración roja intensa con tejido de granulación que cubre la superficie total de la lesión en todas las condiciones. Las imágenes del D14 comparadas con las del D7 presentan una coloración roja menos intensa en los bordes de la herida, así como una reducción del área lesionada. Al D21 se observó que el grupo CTR aún presenta tejido de granulación en el centro de la lesión y hacia los bordes se observa una cicatriz lisa,

Panel 1. Seguimiento fotográfico de cierre de la herida.

aplanada y pálida con una coloración similar a la de la piel sana; para las condiciones AHR y PPR la zona lesionada también presenta tejido de granulación al centro, y hacia los bordes presenta una cicatriz lisa y aplanada; sin embargo, a diferencia del grupo CTR, en estas dos condiciones la coloración de la cicatriz es un poco más oscura con tonalidades leves de morado a azul. Finalmente, en las condiciones con los constructos AHR+hADMSC y PPR+hADMSC, se observa una cicatriz continua, que al igual que en el grupo CTR es lisa, plana y pálida con una coloración similar a la piel sana.

1.1 Cierre al día 14 post-quemadura (D14)

Al analizar de forma cuantitativa el cierre de la herida al D14, se observó que en los primeros días de tratamiento (del día 0 al día 3) el grupo CTR presentó una disminución de la lesión estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto a los cuatro tratamientos experimentales. Sin embargo, en los días posteriores, del 6 al 14, esta tendencia empieza a desaparecer conforme avanza la cicatrización hasta el día 14. En este punto podemos observar una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la reducción del área de la herida entre el grupo tratado con el constructo AHR+hADMSC y el grupo CTR (Fig. 8). Esta diferencia se observa claramente en la figura 9, en donde el área de la lesión es mayor en los individuos CTR con respecto a aquellos que fueron tratados con el constructo biológico.

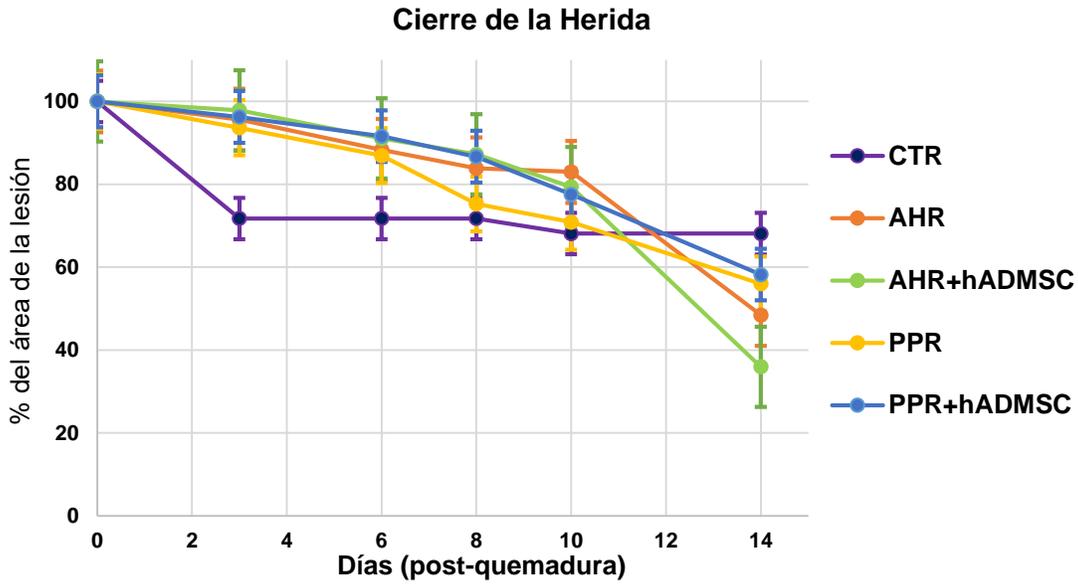


Fig.8 Cierre de la herida al D14, determinado por el seguimiento fotográfico del porcentaje de la lesión desde el día 0 hasta el día 14 post-quemadura en cada grupo. La gráfica muestra la disminución promedio del porcentaje de la herida, así como el error estándar de cada tratamiento, generados mediante el test estadístico ANOVA y la prueba post-hoc Tukey se determinó que hay diferencias significativas entre los tratamientos a los días 3, 6 y 14 post-quemadura con valores de $p=0.009$, $p=0.01$ y $p=0.04$ respectivamente.

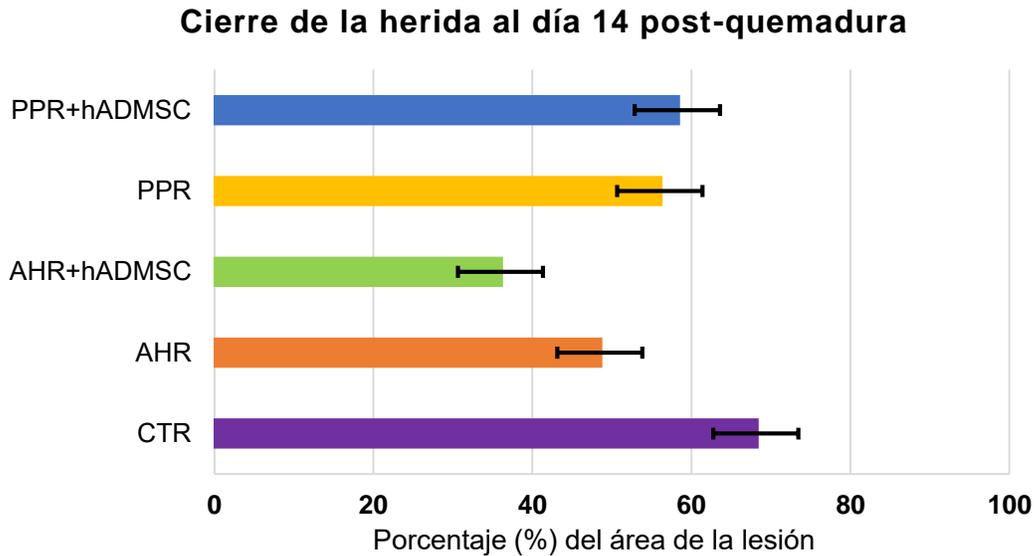


Fig.9 Cierre de la herida al día 14 post-quemadura, determinado por el porcentaje del área lesionada al final del experimento en cada condición. La gráfica muestra la disminución total promedio del porcentaje de la lesión, así como el error estándar de cada tratamiento. Mediante el test estadístico ANOVA y la prueba post-hoc Tukey se determinaron diferencias significativas únicamente entre los tratamientos CTR y AHR+hADMSC con una $p=0.03$.

1.2 Cierre al día 21 post-quemadura (D21)

Al analizar el cierre de la herida al D21, se observó que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo CTR ($p>0.05$). Sin embargo, al observar el comportamiento de las heridas en los animales tratados con los constructos biológicos: AHR+hADMSC y PPR+hADMSC podemos detectar una ligera tendencia en la disminución del área de la lesión respecto al grupo CTR, lo cual nos podría indicar que los constructos permiten una mejor cicatrización. Por otro lado, los resultados de los grupos tratados con los andamios: AHR y PPR también muestran una tendencia que sugiere que el cierre de la lesión es más lento con respecto al grupo CTR, ya que estos grupos presentaron valores por arriba del porcentaje de lesión en el grupo CTR pero, como se mencionó anteriormente estos no son significativos (Figura 10 y 11).

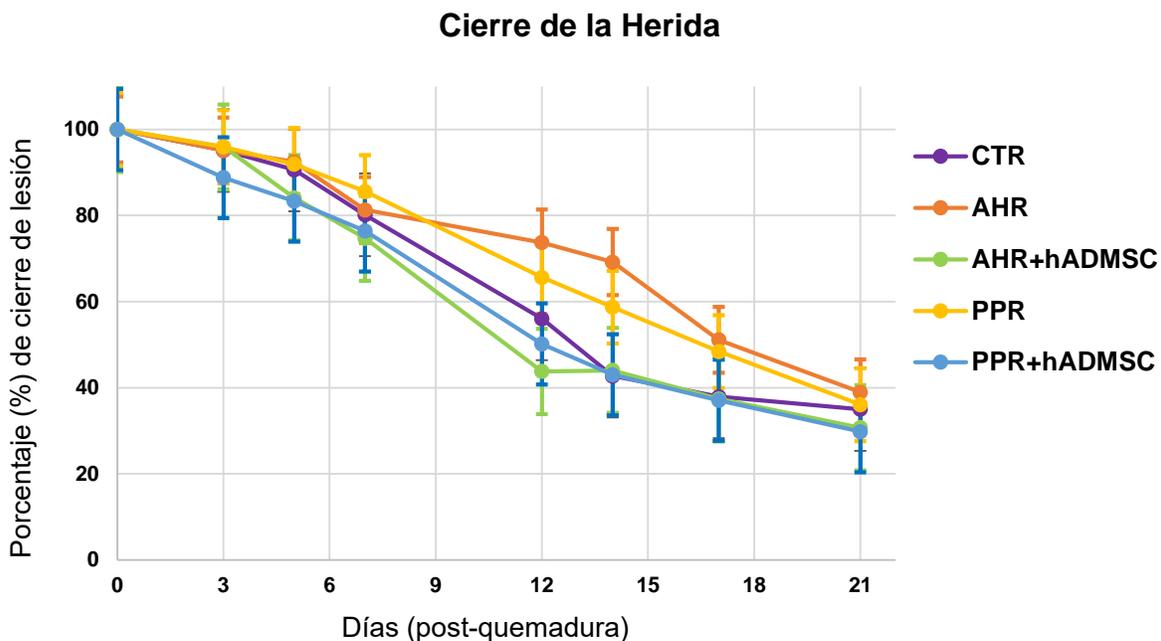


Fig.10 Cierre de la herida al D21, determinado por el seguimiento fotográfico del porcentaje de la lesión desde el día 0 hasta el día 21 post-quemadura de cada tratamiento. La gráfica muestra la disminución promedio del porcentaje de la herida, así como el error estándar de cada tratamiento. Mediante el test estadístico Kruskal Wallis se determinó un valor de $p=0.6$, lo que nos indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Cierre de la herida al día 21 post-quemadura

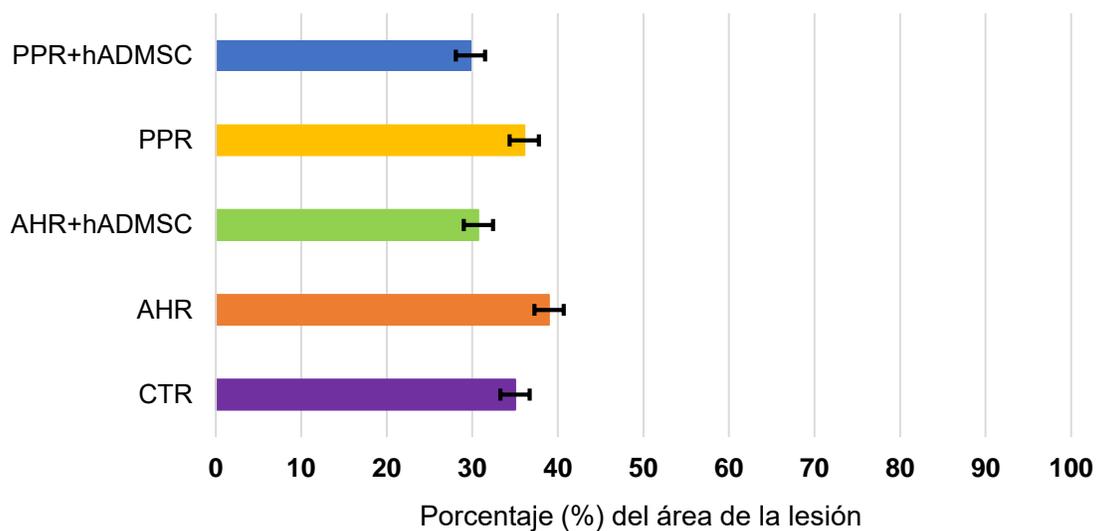


Fig.11 Cierre de la herida al día 21 post-quemadura, determinado por el porcentaje del área de la lesión al final del experimento en cada grupo. La gráfica muestra el porcentaje promedio del área de la herida, así como el error estándar de cada tratamiento. Mediante el test estadístico Kruskal Wallis se determinó un valor de $p=0.6$, lo que nos indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

2. Índice histológico

Para elaborar el índice histológico se evaluaron de manera microscópica y semi-cuantitativa las características más relevantes en la reparación de las quemaduras: el tejido de granulación, la reparación epidérmica (reepitelización), la reparación dérmica y la deposición de la matriz extracelular (colágenas tipo I y III), a los días 7, 14 y 21 post-quemadura, asignando un índice histológico (número arbitrario entre 1 y 10) de acuerdo a lo descrito en la Tabla 1 de la sección Material y Método.

2.1 Tejido de granulación

Al analizar semi-cuantitativamente la presencia del tejido de granulación se observó que al D7, tanto el andamio PPR como ambos constructos AHR+hADMSC y PPR+hADMSC, presentaron valores histológicos muy parecidos a los del grupo CTR indicando que en estos animales el tejido de granulación fue abundante abarcando más del 50% de la cama de la herida. Para la condición AHR se observó un índice histológico menor, lo que sugiere una menor formación de tejido de granulación, abarcando del 30-50% de la cama de la herida (Fig.12). Sin embargo, estadísticamente no se presentan diferencias significativas entre los tratamientos ya que se obtuvo un valor de $p > 0.05$. Las fotografías del panel 2 nos muestran que al D7, el tejido de granulación presenta un grosor similar en todas las condiciones, así como una coloración roja intensa que indica una vascularización elevada.

Al D14 conforme avanza el proceso de cicatrización podemos observar que las heridas de los animales tratados con los andamios y los constructos presentan un tejido de granulación de coloraciones menos rojizas comparadas con los animales control. Asimismo, el grupo CTR presenta un tejido de granulación de coloración rojo que nos sugiere que se encuentra inervado de forma importante, sobre todo cuando lo comparamos con los grupos PPR y PPR+hADMSC quienes presentan coloraciones más rosadas o anaranjadas, o con las condiciones AHR y AHR+hADMSC con tonalidades más cafés, las cuales sugieren que el tejido de granulación está entrando en un proceso apoptótico.

Por otro lado, cuando se compara la extensión del tejido de granulación entre el grupo CTR y las condiciones PPR+hADMSC y AHR se observa que éste abarca más del 50% de la cama de la herida. Contrario a estas condiciones, los grupos PPR y AHR+hADMSC presentaron porcentajes menores de tejido de granulación (30 al 49%) respecto al CTR. A pesar de estas diferencias en las condiciones, los resultados estadísticos no arrojaron diferencias significativas ($p>0.05$) (Fig. 12). Al D21 las condiciones AHR, AHR+hADMSC y PPR+hADMSC presentan índices histológicos bajos que indican presencia residual de tejido de granulación de la misma manera que el resultado observado en el grupo CTR. Sin embargo, el tratamiento PPR presentó un valor histológico mayor al grupo CTR, lo que sugiere la presencia de tejido de granulación a lo largo del 30-50% de la cama de la herida (Fig. 12). Estadísticamente no hay diferencias significativas entre los tratamientos con un valor de $p>0.05$. Como se puede observar en el panel fotográfico 2 a D21 el tejido de granulación se encuentra separado de la zona lesionada por la reepitelización de la misma y presenta tonalidades cafés, que indican apoptosis celular en todas las condiciones.

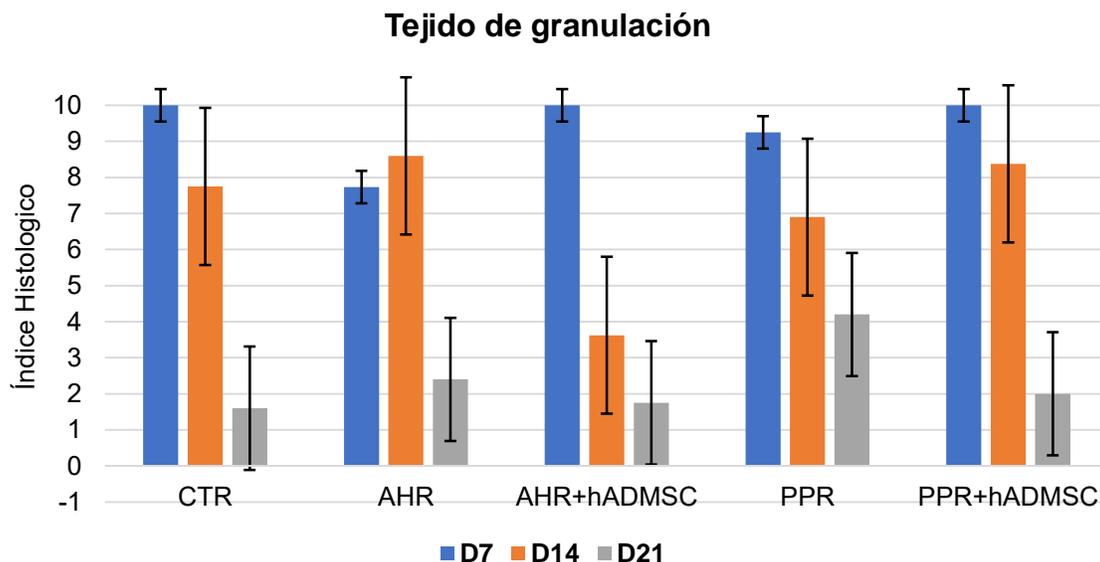
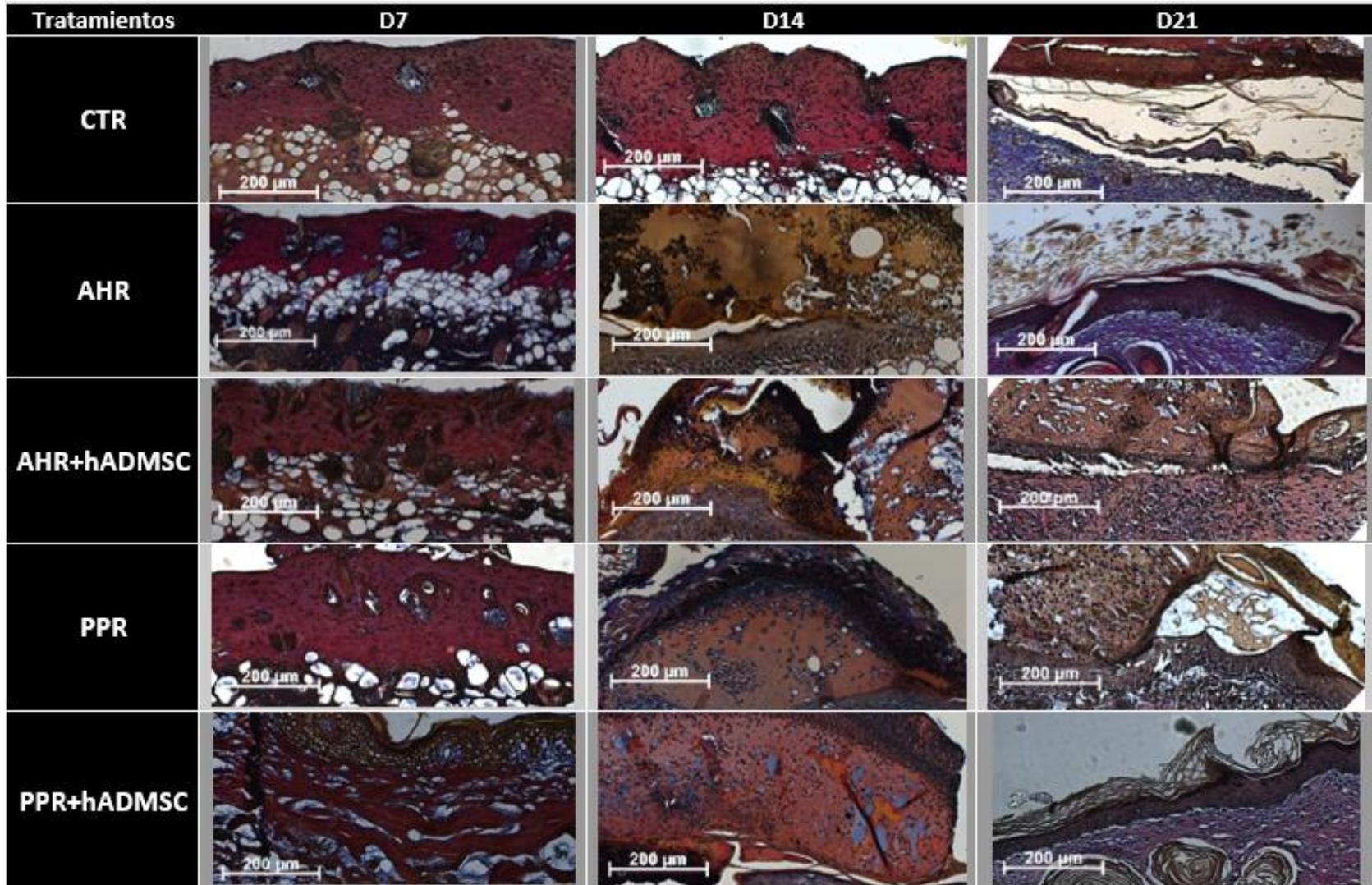


Fig.12 Presencia de tejido de granulación a los días 7, 14 y 21 post-quemadura en cada tratamiento. La gráfica muestra el índice histológico promedio, así como el error estándar en cada uno. Mediante el test estadístico Kruskal Wallis se determinó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos con valores de $p=0.2$ para el día 7 post-quemadura; $p=0.1$ para el día 14 post-quemadura y $p=0.7$ para el día 21 post-quemadura.



Panel 2. Tejido de granulación de los experimentos D7, D14 y D21. Piel quemada de ratón Nu/Nu tratada con tinción de Herovici. Imágenes tomadas en campo claro a 10X

2.2 Reparación Epidérmica (reepitelización)

Al analizar la reparación epidérmica al D7 (Fig. 13) no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos en el índice histológico ya que se obtuvieron valores de $p > 0.05$. Sin embargo, se observa que los constructos AHR+hADMSC y PPR+hADMSC al igual que el grupo CTR presentaron una reepitelización mínima que abarco menos del 40% de la cama de la herida. Sin embargo, en cuanto al nivel de estratificación del epitelio, los grupos tratados con ambos constructos presentaron una tendencia a presentar una mayor estratificación que el grupo CTR (Panel 3). Por otro lado, para los andamios AHR y PPR se observó una mayor reparación epidérmica con respecto al CTR, ya que en estas condiciones se observó una reepitelización de más del 40% de la cama de la herida, pero la estratificación epitelial en los andamios fue similar a la presentada por el grupo CTR (Panel 3).

En los días posteriores, tanto al D14 como al D21 se observó una mayor estratificación epidérmica en general. Los resultados observados al D14 indican que el tratamiento AHR+hADMSC presentó una ligera tendencia a la reepitelización con un índice moderado que abarcó más del 79% de la cama de la herida, esta reepitelización fue mayor que en el grupo CTR donde la reparación epidérmica fue mínima, este resultado se correlaciona con el cierre de la lesión a D14 donde el grupo experimental AHR+hADMSC presentó una disminución significativa del área lesionada. Finalmente, para el D21 todas las condiciones presentaron una reparación epidérmica avanzada. (Fig.13).

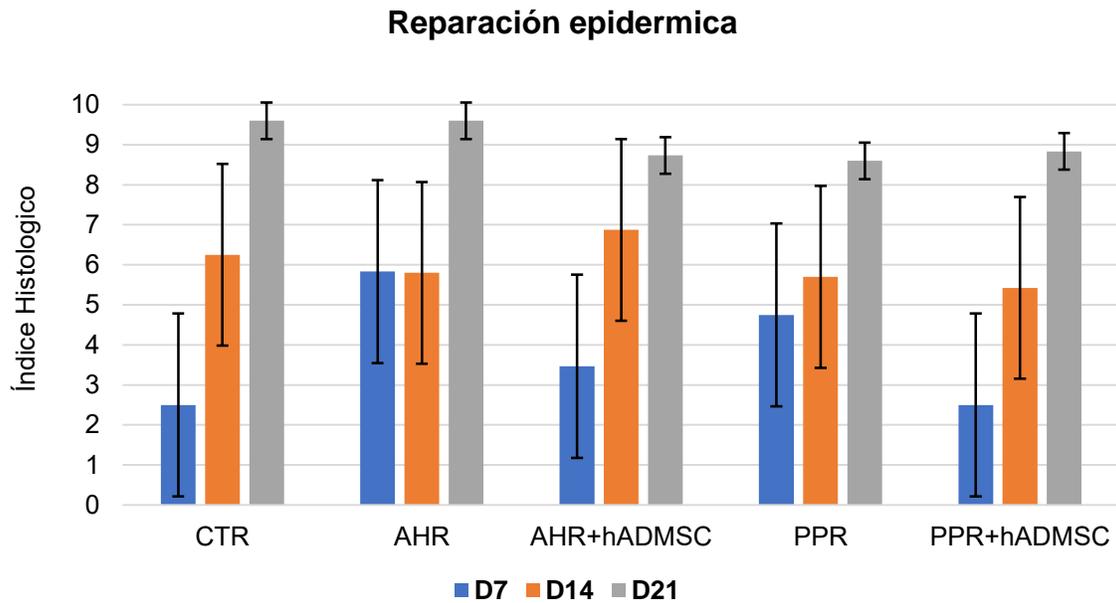
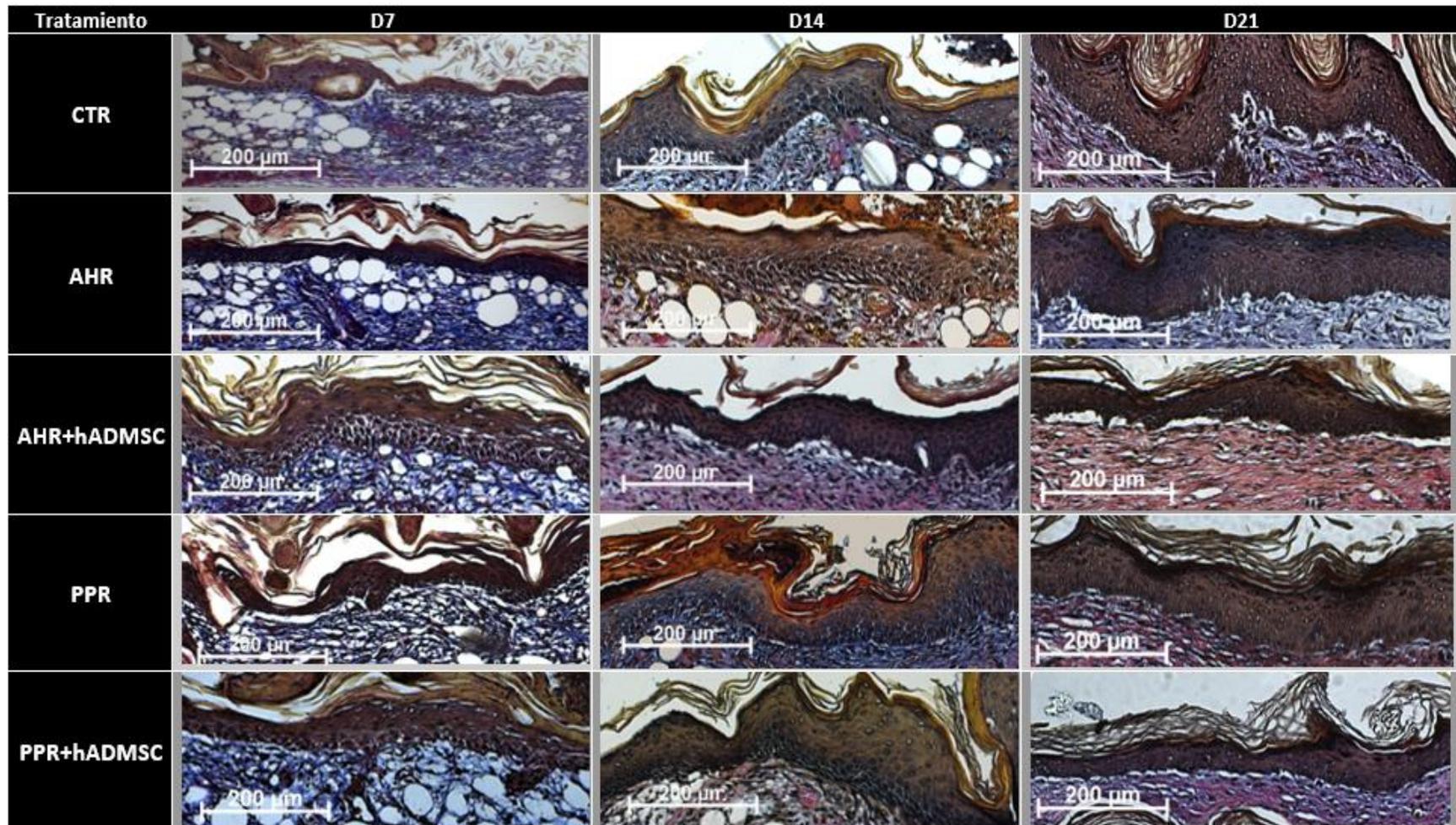


Fig.13 Reparación epidérmica al día 7,14 y 21 post-quemadura en cada tratamiento (CTR, AHR, AHR+hADMSC, PPR y PPR+hADMSC). La gráfica muestra el índice histológico promedio, así como el error estándar en cada uno. Mediante el test estadístico ANOVA y la prueba post-hoc Tukey se determinó que no hay diferencias significativas con una $p=0.7$ para el día 7 post-quemadura; $p=0.9$ para el día 14 post-quemadura y $p=0.7$ para el día 21 post-quemadura.



1
2
3

Panel 3. Reparación epidérmica de los experimentos D7, D14 y D21. Piel quemada de ratón Nu/Nu tratada con tinción de Herovici. Imágenes tomadas en campo claro a 10X.

2.3 Vascularización dérmica

El análisis histológico del índice de vascularización en la dermis se realizó únicamente para los días 14 y 21 post-quemadura ya que al día 7 el proceso de vascularización en la dermis es muy temprano y todavía no se observan los vasos sanguíneos en el tejido reparado (Panel 4). De la misma manera que para los parámetros histológicos presentados anteriormente, tampoco en la vascularización dérmica se encontraron diferencias significativas al comparar el CTR con los grupos tratados con los andamios y los constructos ya que se obtuvieron valores de $p > 0.05$ (Fig.14). Sin embargo, al D14 se observó una tendencia en el aumento en la presencia de los vasos sanguíneos en los tratamientos experimentales con respecto al grupo CTR (Fig. 14), siendo los grupos AHR+hADMSC y PPR, las condiciones que obtuvieron índices histológicos mayores debido a que, como se muestra en el panel 4 presentan una tendencia a incrementar el grado de vascularización. Asimismo, se encontraron fibroblastos dérmicos y proteínas de matriz extracelular como las colágenas en todas las condiciones incluyendo el CTR. Los resultados para el D21 muestran una ligera tendencia de disminución en el grado de vascularización para los individuos CTR cuando se compara con las condiciones de AHR+hADMSC, PPR+hADMSC y PPR.

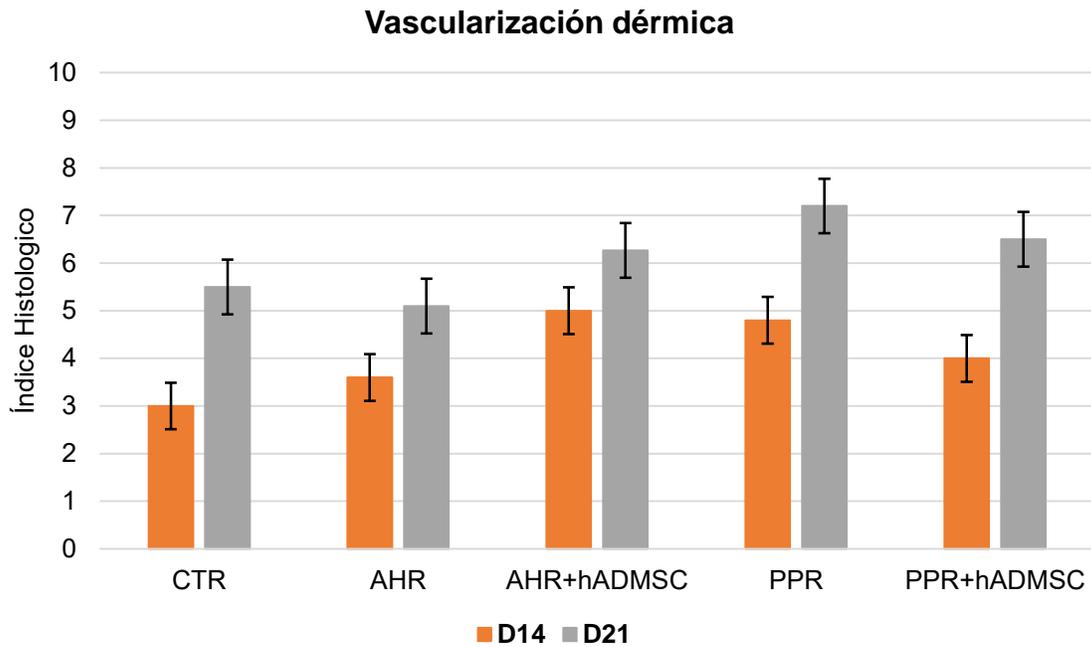
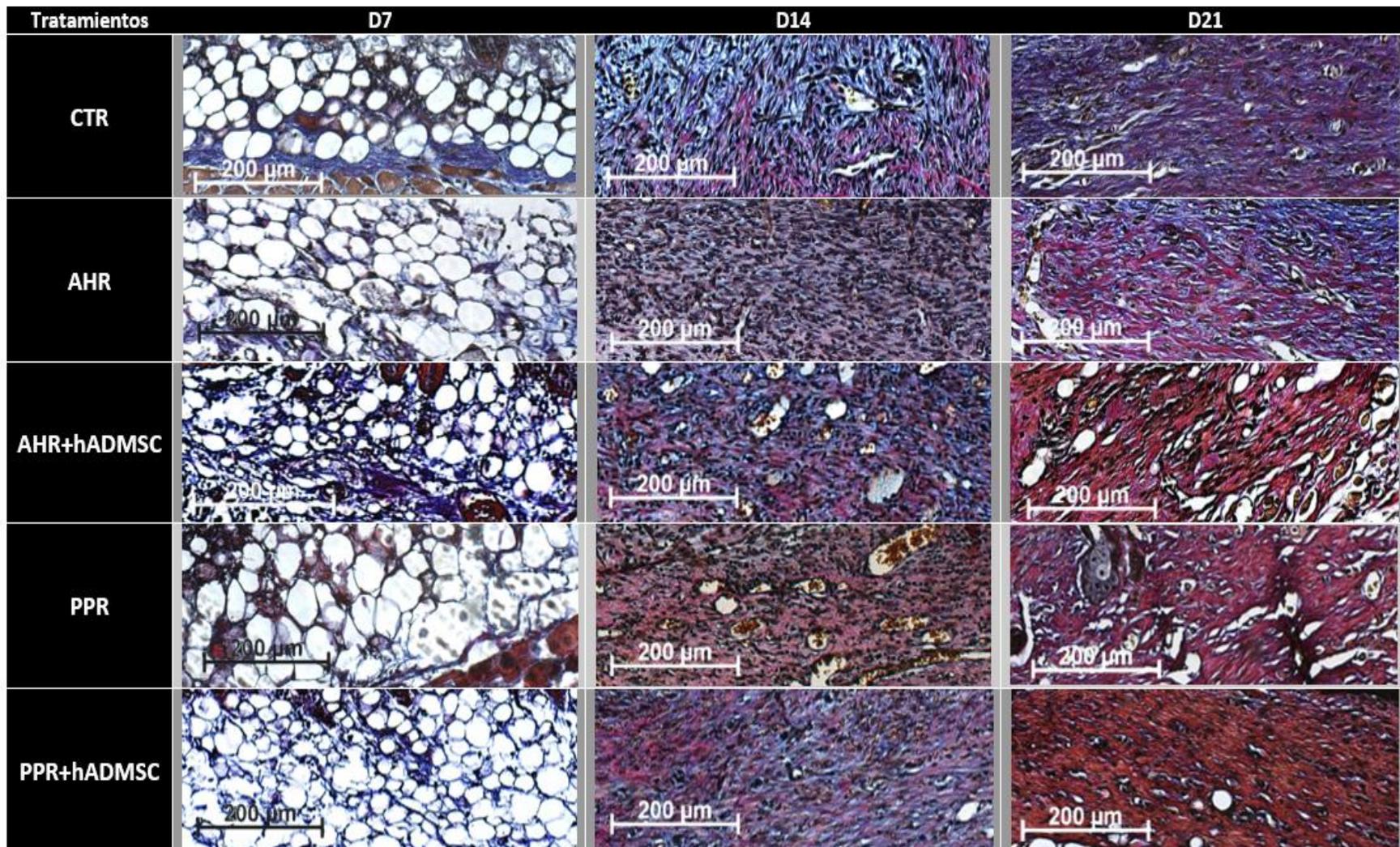


Fig.14 Vascularización dérmica al día 14 y 21 post-quemadura en cada tratamiento (CTR, AHR, AHR+hADMSC, PPR y PPR+hADMSC). La gráfica muestra el índice histológico promedio, así como el error estándar en cada uno. Mediante el test estadístico Kruskal Wallis se determinó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos con valores de $p=0.1$ tanto para el día 14 como para el día 21 post-quemadura.



Panel 4. Vascularización dérmica de los experimentos D7, D14 y D21. Piel quemada de ratón Nu/Nu tratada con tinción de Herovici. Imágenes tomadas en campo claro a 10X.

2.4 Deposición de colágenas

Finalmente, se evaluó de manera semi-cuantitativa, la deposición de colágena tipo I y colágena tipo III a los días 7, 14 y 21 post-quemadura de acuerdo a lo descrito en la tabla 1 de la sección materiales y métodos.

2.4.1 Colágena tipo I

Como ya se mencionó en la introducción, durante el proceso de reparación de las lesiones cutáneas la colágena tipo III es reemplazada por colágena tipo I en la fase de remodelación de la herida. Por lo tanto, la deposición de colágena tipo I aumenta conforme avanza el proceso de cicatrización. Al D7 se observaron proporciones bajas de colágena tipo I en todas las condiciones sin existir diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$) (Fig. 15). En el mismo sentido, para el D14 las proporciones de colágena tipo I no sufrieron variaciones significativas con respecto al grupo CTR (Fig.16). Por el contrario, al D21 observamos una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la deposición de colágena tipo I tanto en los andamios como en los constructos biológicos con respecto a la colágena I presente en los animales control. Esta diferencia también es evidente y significativa ($p < 0.05$) entre las heridas en las que se utilizó el AHR+hADMSC y aquellas en las que se usaron los andamios AHR y PPR o el constructo PPR+hADMSC (Fig. 17). Es decir, cuando observamos la cantidad de colágena I depositada en las heridas CTR respecto a aquellas tratadas con el andamio AHR, podemos constatar un aumento significativo en la presencia de dicha colágena para el tratamiento con AHR, de la misma manera al comparar las condiciones en las que se usó el andamio AHR y el constructo AHR+hADMSC se observa claramente una mayor presencia de colágena tipo I en las heridas tratadas con dicho constructo (Fig. 17).

2.4.2 Colágena tipo III

Contrario a la deposición de colágena tipo I, durante la reparación de una herida, la proporción de colágena tipo III disminuye conforme avanza el proceso de

cicatrización, este fenómeno se debe a que las metaloproteinasas de matriz (MMP) secretadas por fibroblastos dérmicos, queratinocitos y células inmunes como macrófagos se encargan de degradar estas colágenas, y son sustituidas por proteínas más compactas como la colágena tipo I. En concordancia con los resultados presentados para la deposición de colágena I, a los días 7 y 14 tampoco existen diferencias significativas entre los grupos experimentales y el grupo CTR ($p>0.05$) (Fig.15 y 16). Sin embargo, al D21 las proporciones de colágena tipo III en los grupos experimentales son significativamente menores que aquellos encontrados en el CTR. Es decir, La colágena III presente en el CTR es mayor que en los grupos tratados tanto con los andamios como con los constructos. Bajo la misma óptica, si comparamos el CTR con el grupo AHR observamos una disminución en la presencia de colágena III en los animales tratados con el andamio. Finalmente, y siguiendo el mismo razonamiento, los ratones tratados con el andamio AHR+hADMSC presentan una disminución significativa en la deposición de colágena tipo III con respecto al grupo tratado con AHR (Fig. 17).

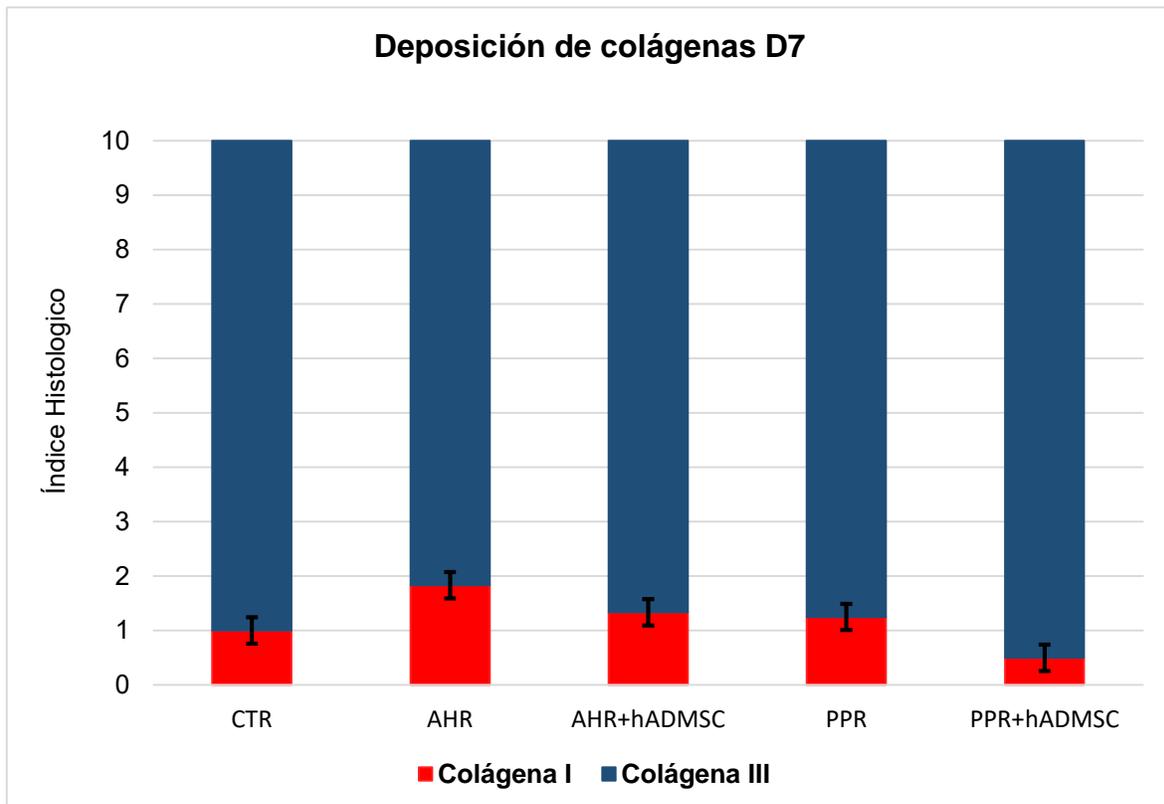


Fig.15 Deposición de colágena tipo I (**rojo**) y de colágena tipo III (**azul**) al D7 en cada tratamiento. Se observa que los tejidos presentan mayor proporción de colágena tipo III con respecto a la cantidad de colágena tipo I. La gráfica muestra el índice histológico promedio, así como el error estándar en cada uno. Mediante el test estadístico Kruskal Wallis se determinó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en la disposición de colágena tipo I con un valor de $p=0.8$ y tampoco en la deposición de colágena tipo III con un valor de $p=0.8$.

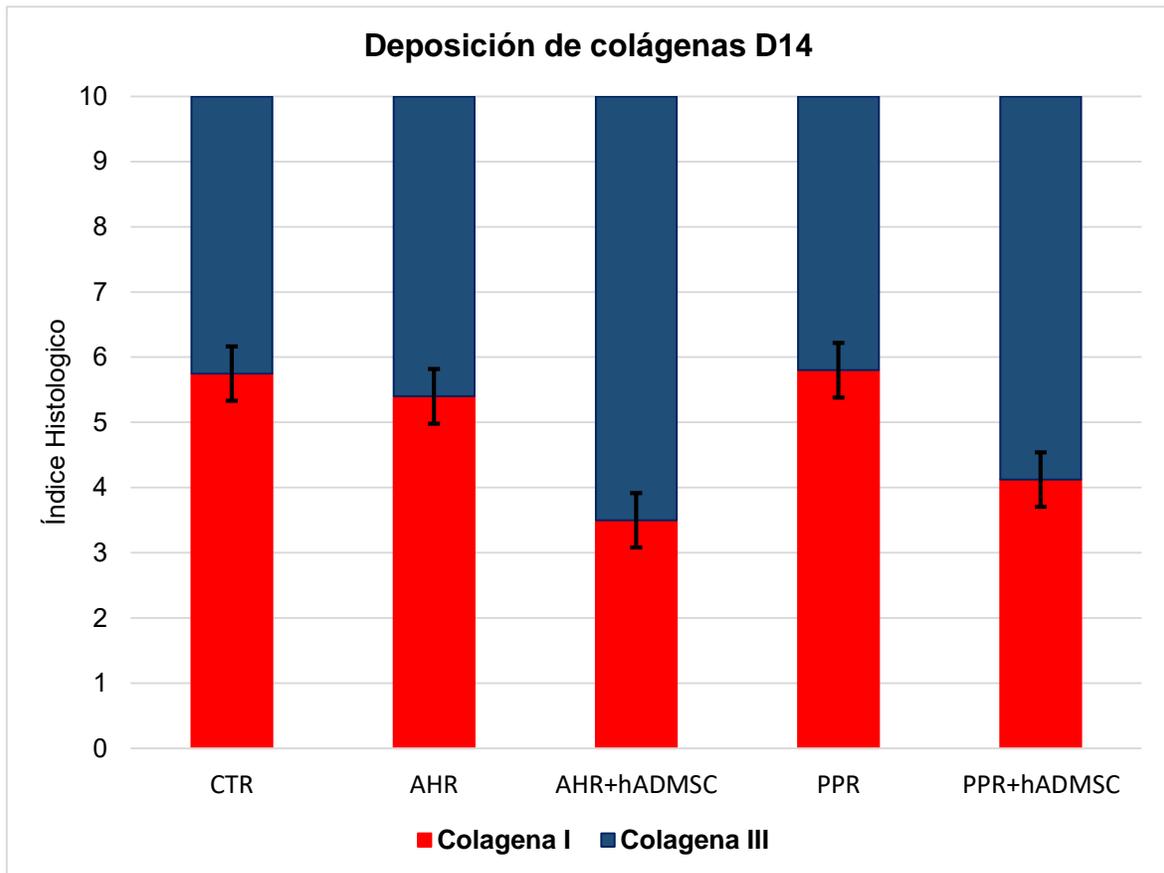


Fig.16 Deposición de colágena tipo I (**rojo**) y de colágena tipo III (**azul**) al D14 en cada tratamiento. La gráfica muestra el índice histológico promedio, así como el error estándar en cada uno. Mediante el test estadístico Kruskal Wallis se determinó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en la deposición de colágena tipo I con un valor de $p=0.06$ y tampoco en la deposición de colágena tipo III con un valor de $p=0.2$.

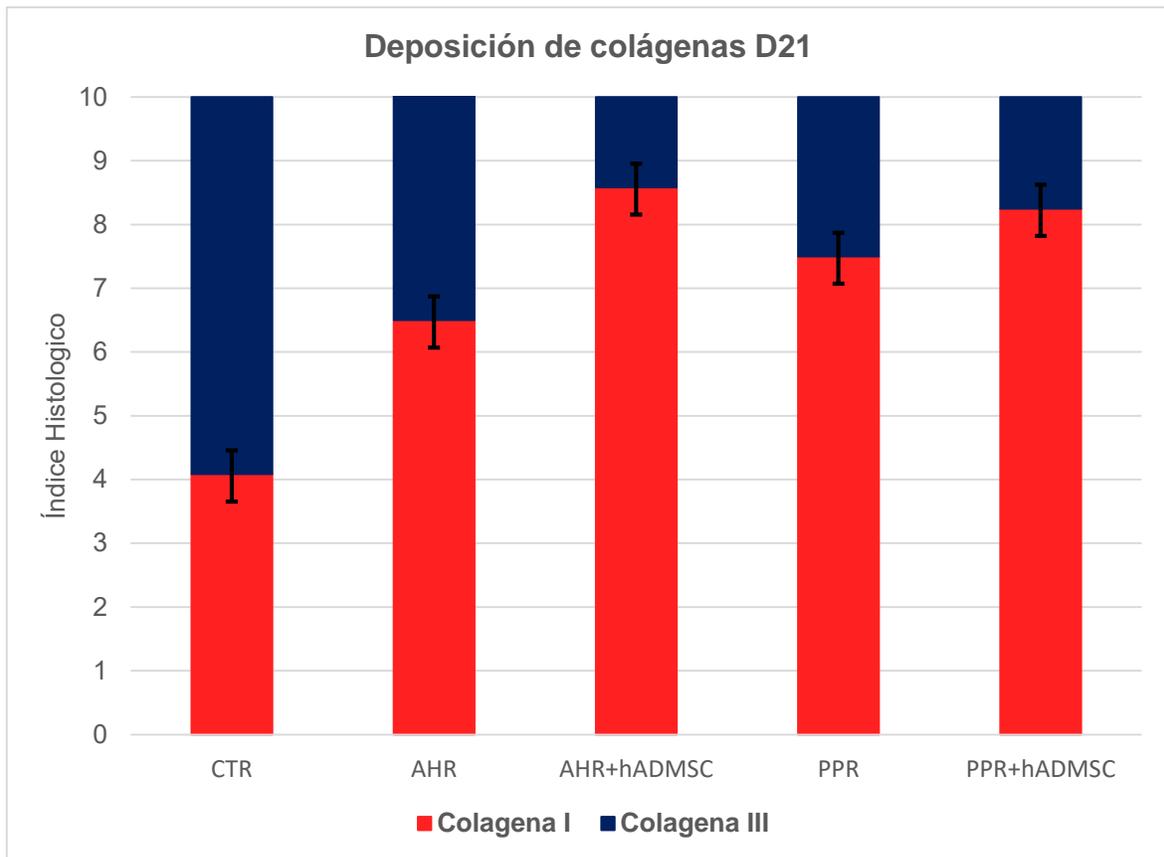
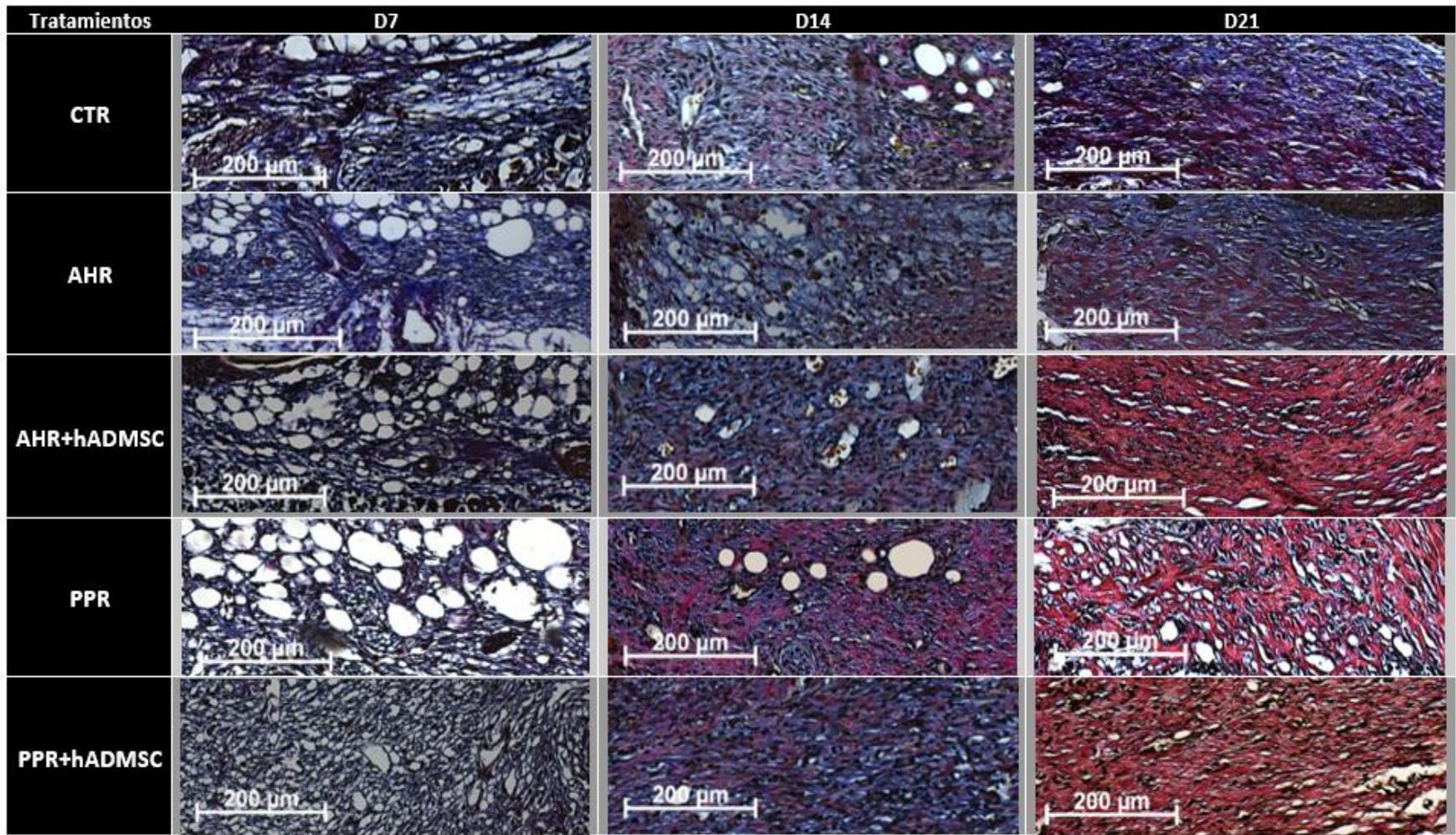


Fig.17 Deposición de colágena tipo I (**rojo**) y de colágena tipo III (**azul**) al D21 en cada tratamiento, se observa que los tejidos presentan mayor proporción de colágena tipo I con respecto a la cantidad de colágena tipo III. La gráfica muestra el índice histológico promedio, así como el error estándar en cada uno. Mediante el test estadístico Kruskal Wallis se determinó que hay diferencias significativas entre los tratamientos en la deposición de colágena tipo I con un valor de $p=0.01$ y en la deposición de colágena tipo III con un valor de $p=0.01$.



1

2 **Panel 5.** Deposición de colágenas tipo I (rojo) y III (azul) en los experimentos D7, D14 y D21. Piel quemada de ratón
 3 Nu/Nu tratada con tinción de Herovici. Imágenes tomadas en campo claro a 10X.

IX. Discusión

En pacientes con lesiones graves por quemaduras es importante que se lleve a cabo un cierre eficiente de las heridas, debido a que este cierre ayuda a reestablecer las funciones vitales de la piel como son la regulación hidroelectrolítica y la función de barrera contra agentes patógenos, químicos y físicos (Boya et. al., 2010). El presente estudio aportó evidencias de que el uso del constructo biológico AHR+hADMSC para tratar quemaduras profundas, tiene un efecto positivo en la cicatrización de dichas lesiones ya que, como se observa en los resultados obtenidos al D14, los animales tratados con AHR+hADMSC muestran un mayor cierre de la herida, o una mejor cicatrización cuando se compara con las quemaduras del grupo control (Fig.9). En estudios recientes se ha demostrado que el uso del amnios humano en quemaduras reduce la pérdida de proteínas y electrolitos además de acelerar la cicatrización promoviendo una regresión del área de la herida y una mayor deposición de fibras de colágenas maduras (Lingling et. al., 2013 & Dias et. al., 2018). En concordancia con el trabajo de Dias y colaboradores, nuestros resultados observados al D21 arrojan que, para nuestro modelo de quemadura, el uso del constructo biológico AHR+hADMSC, también promovió el recambio de la colágena tipo III, de deposición prematura, por colágena tipo I que muestra una deposición tardía y que se lleva a cabo durante el proceso final de la reparación cutánea (Fig. 17). De la misma manera, cuando analizamos la morfología de las cicatrices, encontramos que aquellas tratadas con el constructo AHR+hADMSC presentaron características muy similares a las de una cicatriz normotrófica las cuales se muestran lisas, pálidas y aplanadas (panel 1), propiedades que representan una cicatrización normal en los mamíferos adultos (Lenie et. al, 2014). Tanto el amnios humano como la piel porcina se han utilizado como coberturas temporales en la reparación de lesiones por quemaduras (Cooper et. al., 2015 & Girard et. al, 2017), actuando como sustratos que permiten la migración celular, debido a que la composición proteica de estas coberturas está conformada principalmente por colágenas tipo I y III, similar a la composición de la

matriz extracelular en la piel humana (Mamede et. al, 2012; Castell et. al., 2013; Zou et. al, 2017 & Yamamoto et. al, 2018). Para este estudio ambos andamios biológicos fueron sembrados con hADMSC, ya que estas células tienen un alto potencial de proliferación y capacidad de diferenciarse en células de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico (Harasymiak et. al, 2013). Además, en 2015 Sánchez y colaboradores mostraron en ensayos *in vitro* que las hADMSC sembradas en andamios biológicos como el amnios humano y la piel porcina radioestelizados tienen la capacidad de sobrevivir y proliferar, presentando mayores porcentajes tanto de viabilidad como de proliferación celular cuando se siembran en el amnios humano. Por lo que, de acuerdo con nuestros resultados, consideramos que el efecto benéfico que se observa al D14 en el cierre de la herida y al D21 en la deposición de colágena I, podría deberse principalmente a la presencia de estas células y su efecto paracrino, ya que en las heridas de los animales que fueron tratados únicamente con el andamio AHR no observamos el mismo efecto en el proceso de cicatrización. Estos hallazgos concuerdan con algunos trabajos previos de investigación que han demostrado en modelos murinos, que las hADMSC tienen la capacidad de secretar factores de crecimiento y moléculas inmunosupresoras las cuales actúan de forma paracrina en la reparación epidérmica y dérmica de las lesiones. Algunos de estos factores incluyen el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y algunas enzimas como la metaloproteinasa de matriz (MMP) y citosinas inmunomoduladoras que incluyen al interferón- λ , TNF- α , IL-1 α , e IL-1 β , todas estas moléculas están relacionadas con un aumento en la angiogénesis y en la proliferación tanto de queratinocitos como de fibroblastos dérmicos en lesiones por quemaduras (Mizuno et. al., 2012 & Dash et.al., 2018).

De la misma manera, cuando observamos la deposición de colágenas al D21, observamos que, si bien la proporción de colágena tipo I en el grupo AHR es mayor que en el grupo control, esta deposición es aún mayor para la condición AHR+hADMSC (Fig.17 y panel 5). Estas observaciones sugieren que el aumento en el recambio de colágena tipo III por colágena tipo I que observamos al D21 en

los constructos biológicos (Fig.17) se debe a un aumento en la proliferación de fibroblastos dérmicos promovida por los factores de crecimiento que se sabe secretan las hADMSC, dando lugar a una mayor producción de colágenas y por lo tanto al recambio de las mismas. Lo anterior, se deduce debido a que, en fases tempranas del proceso de reparación de lesiones, los fibroblastos dérmicos secretan principalmente colágena tipo III, la cual en fases más tardías de la cicatrización es gradualmente reemplazada por fibras más densas de colágena tipo I (Eckes et. al., 2000 & Olczyk et. al., 2014).

Por otro lado, en cuanto a la reparación epidérmica o reepitelización no encontramos diferencias significativas entre los grupos tratados con los constructos biológicos y el grupo control (Fig.13). Esto pudiera deberse a que en condiciones basales la epidermis experimenta un continuo proceso de regeneración, mediado por la diferenciación de células epidérmicas del estrato basal, pero en la piel lesionada por quemaduras profundas, el estrato epidérmico se encuentra completamente dañado, por lo que la reepitelización de las heridas se debe principalmente a la proliferación celular de los queratinocitos adyacentes a la zona afectada, así como a las células troncales presentes en los apéndices epidérmicos residuales que se diferencian a células epidérmicas para ayudar a reparar la lesión (Vig et. al., 2017). Por lo tanto, la reparación epidérmica se ve afectada por la profundidad de la quemadura, ya que en las lesiones donde se afectó todo el estrato dérmico la reepitelización estará mediada principalmente por la migración de las células epidérmicas adyacentes, y en aquellas heridas donde parte de la dermis reticular o profunda no se vea afectada, la reepitelización estará mediada no solo por la migración de queratinocitos adyacentes sino también por la diferenciación de células troncales presentes en los apéndices epidérmicos residuales (Zomer et. al., 2017). Por lo tanto, debido a que el método utilizado en la generación de nuestro modelo de quemadura es un método manual, consideramos que probablemente hubo diferencias sutiles en la profundidad de la quemadura realizada en cada animal, lo que probablemente afectó el proceso de reparación epidérmica, por lo que la variabilidad de los datos pudo haber enmascarado algunos resultados.

También en el proceso de reparación cutánea, la formación del tejido de granulación es fundamental ya que esta matriz impide la entrada de agentes patógenos, permite la migración celular y activa las vías de señalización necesarias en la fase de inflamación y proliferación, donde las células inmunes ayudan a eliminar el tejido dañado y los patógenos oportunistas (Chester et. al., 2017). De acuerdo con los resultados observados en el análisis histológico, tampoco encontramos diferencias significativas en la formación o la cantidad de tejido de granulación presente entre los grupos tratados con los dos constructos biológicos y el resto de los grupos. Al D7 los animales tratados con los constructos, presentaron una formación de tejido de granulación muy parecida al del grupo control, este tejido presentó coloraciones en tonalidades rojo intenso que denotan una elevada vascularización (panel 2), así como una extensión mayor al 50% de la cama de la herida para todas las condiciones (Fig. 12). Este resultado nos sugiere que, si bien no hay diferencias significativas en la extensión e histología del tejido de granulación entre los grupos, el uso de constructos no impidió que el proceso de reparación cutánea se iniciara con normalidad. En una cicatrización no patológica, durante las etapas más avanzadas del proceso de reparación cutánea el tejido de granulación se va desprendiendo de la zona de la herida debido a la reepitelización de la misma, y las células que lo conforman en su mayoría son células inmunes que entran en un proceso de apoptosis. Histológicamente el tejido de granulación cambia de coloración y se encuentra menos invadido, para finalmente desprenderse por completo en etapas más avanzadas de la reparación cutánea (Reinke et. al., 2012). Esta característica es evidente tanto al D14 como al D21, donde los resultados histológicos nos sugieren que los animales de todas las condiciones podrían encontrarse en etapas avanzadas de la reparación cutánea debido a que presentan coloraciones menos rojas y en tonalidades del rosa al marrón que indican diferentes grados de apoptosis celular en el tejido de granulación (panel 2). Para esta característica no se observó algún efecto que pudiera indicarnos que el uso de los constructos biológicos modifique de alguna manera la formación del tejido de granulación. Estas últimas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos

por Chen y colaboradores en 2015, donde comparan la reepitelización de las heridas de tres cepas de ratones BALB/c, sus observaciones muestran que solo existen diferencias significativas en la cantidad del tejido de granulación y el grado de reepitelización entre las diferentes cepas de ratones BALB/c durante los primeros tres días de la cicatrización de las heridas. Por lo tanto, es probable que en nuestro modelo de cicatrización estemos observando tardíamente la formación del tejido de granulación y, al no evaluar la ventana de cicatrización temprana que incluye los primeros tres días, no registremos las diferencias que probablemente se estén generando en este corto periodo de tiempo.

Asimismo, en el proceso de cicatrización, la angiogénesis es un fenómeno importante que ayuda a regenerar las redes vasculares en la zona afectada, debido a que durante la generación de la herida los vasos sanguíneos son dañados. En fases tempranas de la reparación cutánea se inician cascadas de señalización que promueven la formación de un coagulo, así como la migración de células del sistema inmune hacia la zona de la herida, estas células, principalmente los macrófagos llevan a cabo un aumento en la secreción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) para promover la formación de nuevos vasos sanguíneos y reestablecer la red vascular en la herida, en fases más avanzadas la secreción de este factor de crecimiento es mediada principalmente por fibroblastos dérmicos y queratinocitos (Castell et. al., 2013 & Dash et. al., 2018). Como ya se mencionó en la metodología, para evaluar semi-cuantitativamente la vascularización dérmica, nos basamos en la presencia de vasos sanguíneos en la zona central de la cama de la herida. Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control. Sin embargo, al D14 los animales tratados con AHR+hADMSC presentan una tendencia de mayor vascularización comparados con el grupo control (Fig.14), estas observaciones concuerdan con los resultados encontrados por Dias y colaboradores en 2018, donde en un modelo de rata muestran que el uso del amnios humano en el tratamiento de las heridas cutáneas presentó un aumento en la angiogénesis. Aunque, nuestro resultado no es el mismo al D21, ya que para este día la condición PPR presentó una tendencia de mayor vascularización en la zona central de la lesión. En trabajos anteriores tanto

de Gu y colaboradores en 2014, así como de Vinish y colaboradores en 2015, se ha utilizado el marcador de células endoteliales CD31 para examinar la formación de vasos sanguíneos mediante una tinción inmunohistoquímica. Con el uso de esta técnica, se ha demostrado que las ADMSC tienen la capacidad de potenciar la neovascularización en modelos murinos mediante la secreción de factores de crecimiento angiogénicos. De manera que, consideramos que para evaluar la vascularización dérmica es necesario implementar técnicas de marcaje de inmunohistoquímica como la utilización de un anticuerpo específico para CD31, ya que se ha demostrado que es un marcador de células endoteliales, el cual nos permitirá realizar una cuantificación precisa de la tasa de angiogénesis para cada condición.

El conjunto de los resultados presentados en esta discusión nos permite proponer que, las hADMSC sembradas en el andamio del amnios humano radioestelizado, tienen un efecto benéfico en la cicatrización debido a que la presencia de estas células potencia la reparación cutánea en dos parámetros de los cinco medidos para este estudio. Esta propuesta también está sustentada en el hecho de que trabajos anteriores han mostrado en modelos *in vivo* que las células troncales mesénquimales tienen propiedades inmuno-moduladoras y promueven la reparación de lesiones mediante la secreción de factores de crecimiento (Wu et. al., 2007; Lingling et. al. 2013; Joung et. al., 2018), por consiguiente, deducimos que el uso de las hADMSC en el andamio biológico contribuye de manera positiva en la reparación de lesiones por quemadura.

No obstante, consideramos conveniente optimizar los métodos de análisis para evaluar de manera más precisa la influencia que tienen las hADMSC sembradas en los constructos biológicos durante el proceso de reparación cutánea, así pues, estamos convencidos de que un aumento en el número de animales utilizados en este protocolo de investigación podría ayudar de manera significativa al análisis de los datos mitigando la variabilidad de la profundidad de las heridas. Esta propuesta la hacemos con base en el trabajo de Dias y colaboradores, en el que utilizan 18 ratas por condición en un modelo de quemadura muy similar al nuestro.

En cuanto a la vascularización dérmica, con el uso de un anticuerpo específico para CD31 se puede realizar una cuantificación precisa de la tasa de angiogénesis. Por último, para analizar la formación del tejido de granulación y la reepitelización se podrían hacer experimentos con ventanas de tiempo más cortas en las que se incluyan los tres primeros días después de la generación de la herida, ya que, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que en esta ventana de tiempo se observan mayores diferencias en cuanto a la reepitelización y formación del tejido de granulación en ratones (Chen et al., 2015).

Aunque nuestros resultados mostraron que el uso del constructo biológico AHR+hADMSC tiene una influencia positiva en la cicatrización de las lesiones promoviendo el cierre de la herida y el recambio de colágenas, es preciso llevar a cabo otros experimentos considerando un control celular para confirmar que el efecto de potenciación que se observa en la cicatrización de las heridas es debido a la asociación entre el AHR y las hADMSC.

Igualmente, se debe evaluar en ensayos *in vivo*, que las hADMSC se mantengan viables, sean capaces de proliferar y de secretar factores de crecimiento, así como, citosinas inmuno-moduladoras, tal y como se observa en los ensayos *in vitro* de Sánchez y colaboradores, donde las hADMSC son sembradas en el AHR. Así, podemos comprobar que estas células pueden tener realmente un efecto paracrino que favorezca la cicatrización *in vivo*. Asimismo, en trabajos anteriores se ha evaluado la secreción de factores de crecimiento como el VEDF, EGF, bFGF y citosinas anti-inflamatorias mediante la técnica de ELISA a partir de muestras de sueros de los animales tratados (Lingling et al, 2013).

Por otra parte, la presencia de las hADMSC en la herida, así como su proliferación, puede ser observada mediante la co-localización de marcadores de viabilidad y proliferación como el GFP y Ki67, respectivamente (Jung et. al., 2018).

En cuanto a lo que el modelo de quemadura se refiere, a pesar de la gran cantidad de estudios en los que se usan cerdos, ratones, conejos y otros modelos animales para investigar la cicatrización, uno de los principales problemas para reproducir la reparación de lesiones humanas en estos modelos, es la fisiología básica de la piel e inmunología de cada organismo, entonces, el proceso de cicatrización es

marcadamente diferente (Lenie et. al., 2014). Además, en modelos murinos, la principal diferencia es la contracción de la piel, ya que estos animales cuentan con una capa de tejido muscular intercalado en la hipodermis que les confiere un mayor potencial de contracción y, por lo tanto, el cierre de la lesión en estos modelos está dado principalmente por la contracción de la piel y no por la formación de tejido de granulación y reepitelización como en los humanos. En los ratones, la formación de tejido de granulación es poca, y sustancialmente diferente al tejido de granulación formado en lesiones de tejido humano (Zomer, et. al., 2017). Ésto no quiere decir que se deba cambiar el modelo animal utilizado para evaluar el proceso de cicatrización, sino que se deben considerar las diferencias y adaptar los métodos de análisis para obtener resultados que puedan ser comparables con la cicatrización en humanos.

X. Conclusiones

En mamíferos adultos, la reparación de lesiones por quemaduras, es un conjunto de procesos biológicos subsecuentes que se encuentran bajo un estricto control mediante señalizaciones bioquímicas desencadenadas de forma subsecuente en las diferentes fases del proceso de cicatrización. Por lo tanto, cualquier disturbio o alteración en alguna de las fases podría contraer complicaciones en la herida, desde infecciones hasta la formación de una cicatriz anormal hipertrófica o queloide. En quemaduras profundas con extensiones corporales mayores al 70% de TBSA, la reparación cutánea se encuentra expuesta a múltiples factores que podrían afectarla debido a la naturaleza de las heridas, ya que en estos casos hay una mayor pérdida de agua, electrolitos y proteínas, además de estar expuesta a una mayor cantidad de agentes patógenos que pudieran generar alguna infección. Es por esta razón que se han utilizado coberturas temporales que ayuden a regular el equilibrio hidroelectrolítico y funcionen como una barrera provisional contra agentes patógenos oportunistas. Sin embargo, el uso de estas coberturas se puede optimizar con el uso de células troncales mesénquimales las cuales contribuyen de manera positiva en la reparación cutánea mediante la secreción de factores de

crecimiento. Los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a concluir que el uso del constructo biológico AHR+hADMSC contribuye de manera positiva el proceso de cicatrización debido a que la presencia de las hADMSC promueve el cierre de la herida y ayudan a la reparación del tejido dañado mediante el aumento en el recambio de colágena tipo III por colágena tipo I en la fase de remodelación de la lesión. Por otro lado, el uso del constructo PPR+hADMSC, presenta características histológicas que nos sugieren que la interacción entre el andamio con las células no es óptima y se requieren más análisis para poder esclarecer las diferencias biológicas que existen entre la interacción de las hADMSC y los andamios de amnios humano y la piel porcina radioesterilizados que pudieran estar mediando las propiedades que se sabe tienen estas células en el proceso de reparación de lesiones.

XI. Referencias

- Álvarez J. et al. (2012). Una segunda piel: tratamiento con sustitutos dérmicos. *Rev Med.* Vol. 4(1):37-41.
- Bainbridge P. et. al. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care.* Vol. 22 (8).
- Bohr S. et. al. (2013). Resolving D2 prevents secondary thrombosis and necrosis in a model mouse burn wound model. *Wound Repair regen* Vol. 21(1): 35-43. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2012.00853.x.
- Boya Vegue J. et. al. (2010). Atlas de Histología y Organografía Microscópica. Capítulo 10: Piel. 3° Edición. Madrid: Médica Panamericana.
- Castaño O. et al. (2018). Instructive microenvironments in skin wound healing: Biomaterials as signal releasing platforms. *Advanced Drug Delivery.* DOI: 10.10106/j.addr.2018.03.012.
- Castell R. E., Herrera E. M. y Campos M. A. (2013). Capítulo 11: Piel y Anexos. En *Histología y biología celular* (207). México: McGraw Hill.
- Chen L. et. al. (2015). The murine excisional wound model: Contraction revisited. *Wound Repair Regen.* Author manuscript, Vol. 23(6): 874-877. DOI:10.1111/wrr.12338.

- Chester D. & Brown A. (2017). The role of biophysical properties of provisional matrix proteins in wound repair. ELSEVIER B.V. <https://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.08.004>.
- Chu H. D. (2009). Sección 3: Generalidades de la biología, el desarrollo y la estructura de la piel. Capítulo 7: Desarrollo y estructura de la piel. En Wolff Klaus (2009). Dermatología en medicina general. Volumen 1. 7° Edición. España: Médica panamericana.
- CINVESTAV (2018). Epifast. Subdirección de Vinculación Tecnológica. Consultado el 14 de abril del 2018 desde el sitio web: <http://svt.cinvestav.mx/Productos-Transferidos/Epifast-M%C3%A1sInformaci%C3%B3n>.
- Cooper D. et al. (2015). A brief history of clinical xenotransplantation. International Journal of Surgery. Art ID IJSUI978_proof. DOI:10.1016/j.ijssu.2015.06.060.
- Dash B. et al. (2018). Stem Cells and Engineered Scaffolds for regenerative Wound Healing. Bioengineering. Vol. 5 (3). DOI:10.3390/bioengineering5010023.
- Diagnóstico y Tratamiento del Paciente “Gran Quemado”, México: Secretaria de Salud; 2009. Consultado el 14 de abril del 2018 desde el sitio web: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/040_GP_C_GranQuemado/IMSS_040_08_EyR.pdf.
- Dias M. et al. (2018). Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. Acta Cir. Bras. Vol. 33(2):144-155. DOI: 10.1590/s0102-865020180020000006.
- Diniz F. et al. (2018). Matrix Metalloproteinase-1(MMP-1) and (MMP-8) gene polymorphisms promote increase and remodeling of the collagen III and V in posterior tibial tendinopathy. Histology and Histopathology. DOI: 10.14670/HH-11-982
- Eckes B. et al. (2000). Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. Matrix Biology. Vol. 19: 325-332.
- Ehanire T. et al. (2013). A systematic review of the psychometric properties of self-reported scales assessing burn contractures reveals the need for a

new tool to measure contracture outcomes. *Wound Repair Regen* Vol.21: 4, 520–529.

- Gartner P. L. & Hiatt L. J. (2002). Capítulo 14: Sistema Tegumentario. En *Texto Atlas de Histología*. 2° Edición. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Gelse K. et al. (2003). Collagens Structure, Function, and Biosynthesis. *Advanced Drug Reviews*. Vol. 55: 1531-1546. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002.
- Geneser Finn (1995). *Atlas Color de Histología*. Capítulo 11: La Piel. 5° Edición. Madrid: Médica Panamericana.
- Ghieh F. et al. (2015). The Use of Stem Cells in Burn Wound Healing: A Review. *BioMed Reserch International*. Art. ID 684084. DOI:10.1155/2015/684084.
- Gimble J. et al. (2010). Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using sdipose tissue-derived cells. *Stem Cell Research & Therapy*. Vol. 1(19). DOI:10.1186/scri19.
- Girard D. et al. (2017). Biotechnological Management of skin Burn Injuries: Challenges and Perspectives in Wound Healing and Sensory Recovery. *Tissue Engineering: Part B*. Vol.23 (1): 59-84. DOI: 10.1089/ten.teb.2016.0195.
- Gu J. et al. (2014). Adiposed-derived stem cells seeded on PLCL/P123 electrospun nanofibrous scaffold enhance wound healing. *Biomed. Mater*. Vol. 9 035012, 9 pp. DOI: 10.1088/17448-6041/9/3/035012.
- Harasymiak I. et al. (2013). Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Celular & Molecular Biology Letters*. Vol.18:479-493. DOI:10.2478/s11658-013-0101-4.
- Hirt N. et al. (2011). Biologicals and Fetal Cell Therapy for Wound and Scar Managment. *ISRN Dermatology*. Art.ID: 549870. DOI: 10.5402/2011/549870.
- Hocking Anne (2011). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. *Advances in Wound Care*. Vol. 1 (4): 166-171. DOI:10.1089/wound.2011.0294.
- Hunain A. et al., (2011). Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 22 (468-478).

- Jung Oh et. al., (2018). In vivo migration of mesenchymal stem cells to burn injury sites and their therapeutic effects in a living mouse model. *Journal of Controlled Release*. COREL 9247. DOI:10.1016/j.jconrel.2018.04.020
- Kierszenbaum A. & Tres L. (2016). Capítulo 11: Sistema Tegumentario. En *Histología y biología celular: Introducción a la anatomía patológica*. 4° Edición (353). España: ELSEVIER
- Koob et al. (2014). Properties of dehydrated human amnion/chorion composite grafts: Implications for wound repair and soft tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 102(6), 1353-1362.
- Kretschmar K. et. al. (2014). Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*;4:a013631 doi: 10.1101/cshperspect.a013631
- Lenie J. et. al. (2014). Human hypertrophic and keloid scar models: principles, limitations and future challenges from a tissue engineering perspective. *Experimental Dermatology*, Vol.23 382-386. DOI: 10.1111/exd.12419.
- Lindroos B. et al. (2011). The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev and Rep*. Vol. 7:269-291. DOI: 10.1007/s12015-010-9193-7.
- Lingling S. et. al. (2013). Adipose tissue-derived stem cell (ADSCs) transplantation promotes regeneration of expanded skin using a tissue expansión model. *Wound Rep. Reg*. Vol. 21 746-754. DOI:10.1111/wrr.12080.
- Luo G. et al. (2010). Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Wound Rep Reg*. Vol. (18): 506-513. DOI:10.1111/j.1524-475X.2010.00616.x.
- Makoto Takeo, Wendy Lee & Mayumi Ito (2015). Wound Healing and skin Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*;5:a023267. DOI: 10.1101/cshperspect. a023267.
- Mamede A. et al. (2012). Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue res*. Vol. 349:447-458. DOI:10.1001/s00441-012-1424-6.

- Mescher Anthony L. (2016). Basic Histology Text and Atlas. Chapter 18: Skin. 40° Edición. United States: Mac Graw Hill Education.
- Mizuno H. et al. (2012). Consice Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. Stem Cells. Vol. 30: 804-810. DOI: 10.1002/stem.1076.
- Moctezuma P. L. et al. (2015). Epidemiología de las quemaduras en México. Rev Esp Med Quir Vol.20:78-82.
- Olczyk, P. et al. (2014). The role of the extracelular matrix components in cutaneous wound healing. BioMed Research International. Article ID 747484, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/747584>.
- OMS. (2017). Quemaduras. Información recuperada de OMS Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/es/>
- Oryan A. & Moshiri A. (2013). Tissue Engineering: Alternative Option in Managing Large and Massive Tissue Deficits. Tropical Medicine & Surgery. Vol. 1(1). DOI: 10.4172/tpms.1000e101.
- Oryan A. et al. (2017). Burn wound healing: present concepts, tratment strategies and future directions. Journal of Wound Care. Vol. 26(1). DOI:134.148.010.012.
- Portas M, Pomerane A. Genovese J, Perez R. & Gisone P. (2002). Diagnóstico y Tratamiento de las Quemaduras Radioinducidas. Buenos Aires: Craveri. Pag. 120.
- Reinke J.M. & Sorg H. (2012). Wound Repair and Regeneration. Eur Surg Res Vol. 49:35-43. DOI: 10.1159/000339613.
- Richardson R. et al. (2013). Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound healing research. J Invest Dermatol. Vol. 13(6): 1655-1665. DOI: 10.1038/jid.2013.16.
- Roa R. & Taladriz R. (2015). Uso Actual de Sustitutos Dérmicos en Cirugía Reparadora. Rev Chil Cir. Vol 67(6):647-652.
- Ross Michael H. & Wojciech Pawlina (2015). Histología Texto y Atlas. Correlación con Biología Molecular y Celular. Capítulo 15: Sistema Tegumentario. 7° Edición. Philadelphia: Wolters Kluwer.

- Sánchez et al. (2015). Generation of Two Biological Wound Dressings as a Potential Delivery System of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering. Biomaterials* doi: 10.1097/MAT.0000000000000277.
- Secretaria de Salud (2016). Modelo para la Prevención de Quemaduras en Grupos Vulnerables en México. Información recuperada del sitio web: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/207108/ModeloQuemaduras.pdf>
- Secretaria de Salud. (2017). Atención a niños con quemaduras. Información recuperada de Instituto de Salud del Estado de México Sitio web: <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=171>
- Singer A. et al. (2017). Burn Wound Healing and tissue Engineering. *Journal of Burn Care & Research*. Vol. 38 (3): e605-e613. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000538.
- Singh et al. (2011). Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. *Journal of Tissue Viability*, 20(2), 49-54.
- Stanford Children's Health (2017). Clasificación de las quemaduras. Información recuperada de <http://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=clasificacindelasmaquemas-90-P09576>.
- Vig, K. et. al. (2017). Advances in skin regeration using tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 18, 789. DOI: 10.3390/ijms18040789.
- Vinish M. et. al. (2015). Dendritic cells modulate burn wound healing by enhancing early proliferation. *Wound Rep. Reg.* Vol 24 6-13. DOI:10.1111/wrr.12388.
- Wasiak J. et al. (2008). Dressing for superficial and partial thickness burns. *Cochrane Database of Systematic*. Issue 4. Art. No.: CD002106. DOI: 10.1002/14651858.CD002106.pub3.
- Wu Yaojiong et al. (2007). Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells Translational and Clinical Research*. Vol. 25: 2648-2659.
- Ya-Chieh H. et al. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nat Med*. Vol.20(8): 847–856. doi:10.1038/nm.3643.

- Yamamoto T. et al. (2018). Skin xenotransplantation: Historical review and clinical potencial. *Journal Burns*. Vol. 55 (12). DOI:10.1016/j.burns.2018.02.029.
- Yin-Zhe A. et al. (2017). Physiochemical properties and resorption progress of porcine skin-derived collagen membranes: In vitro and in vivo analysis. *Dent Mater J*. DOI:10.4012/dmj.2017-065
- Zhao R. et al. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *Int. J. Mol. Sci*. Vol. 17, 2085. DOI: 10.3390/ijms17122085.
- Zomer H. et. al. (2017). Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *J. Dermatol Sci*, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.009>.
- Zou Yanhai & Shuliang Lu (2017). Dermis, acellular dermal matrix, and fibroblasts from different layers of pig skin exhibit different profibrotic characteristics: evidence from in vivo study. *Oncotarget*. Vol. 8(14): 23613-23627.