



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Obtención y caracterización de muestras de un modelo murino
de quemadura profunda para su análisis por secuenciación
de RNA de célula única**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

INGRID VIANNEY RODRÍGUEZ CANO

TUTOR

DRA. EDNA AYERIM MANDUJANO TINOCO

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en C. JOSÉ FRANCISCO GONZÁLEZ GARCÍA



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: AVILA CHAVEZ EUCLIDES
VOCAL: Profesora: COELLO COUTIÑO MARTHA PATRICIA
SECRETARIO: Profesora: MANDUJANO TINOCO EDNA AYERIM
1er. SUPLENTE: Profesora: GARCÍA ESCAMILLA NATIVIDAD
2° SUPLENTE: Profesora: VELÁZQUEZ SALGADO ROSALINDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, bajo la dirección de la Dra. Edna Ayerim Mandujano Tinoco y el apoyo técnico del M. en C. José Francisco González García y forma parte del proyecto interinstitucional:

“Análisis de secuenciación de RNA de célula única sobre la dinámica de la heterogeneidad celular en respuesta al microambiente cicatrizal generado por una quemadura de segundo grado profundo”

Registrado y financiado por CONACyT, con clave:

FORDECYT-PRONACES/2096009/2020.

**Ingrid Vianney
Rodríguez Cano
(Sustentante)**

**Dra. Edna Ayerim
Mandujano Tinoco
(Asesora)**

**M. en C. José Francisco
González García
(Supervisor técnico)**

| | |
|---|----|
| ÍNDICE | |
| ABREVIATURAS POR ORDEN ALFABÉTICO | 4 |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS | 6 |
| GLOSARIO | 8 |
| RESUMEN | 9 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1.1 La piel: Función y estructura..... | 10 |
| 1.2 Epidermis..... | 11 |
| 1.3 Dermis | 12 |
| 1.4 Hipodermis | 14 |
| 2. El proceso de cicatrización de la piel | 16 |
| 2.1 Definición de una quemadura | 19 |
| 3. Clasificación de las quemaduras | 20 |
| 3.1 Por su etiología..... | 20 |
| 3.2 Por la profundidad del daño | 22 |
| 3.4 Por la extensión del área afectada..... | 25 |
| 3.5 Por la intensidad del daño | 26 |
| 4. Epidemiología de las quemaduras | 28 |
| 5. El modelo murino como una herramienta para estudiar la cicatrización de quemaduras | 29 |
| 6. La importancia de estudiar los perfiles transcripcionales durante la cicatrización de una quemadura y la introducción de la tecnología de secuenciación de RNA de célula única (scRNAseq) | 32 |
| 7. La técnica de scRNAseq como estrategia de estudio en procesos de cicatrización cutánea | 33 |
| 8. Planteamiento del problema | 36 |
| 9. Hipótesis | 36 |
| 10. Objetivo general | 37 |
| 11. Objetivos específicos | 37 |
| 12. Diseño y metodología | 38 |
| 12.1 Modelo murino de quemadura de segundo grado profundo..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 12.2 Obtención de muestras y caracterización histológica..... | 40 |
| 12.3 Tinción con Hematoxilina y Eosina..... | 41 |
| 12.4 Tinción Tricrómica de Masson | 42 |
| 12.5 Preparación de los reactivos utilizados..... | 43 |
| 12.6 Definición y obtención del “borde de la quemadura”..... | 45 |
| 12.7 Obtención de suspensiones celulares de muestras de piel sana y del borde de la quemadura..... | 46 |
| RESULTADOS | 48 |
| DISCUSIÓN | 70 |
| CONCLUSIONES | 76 |
| BIBLIOGRAFÍA | 77 |
| ANEXOS | 82 |

ABREVIATURAS POR ORDEN ALFABÉTICO

CICUAL - Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio

CXCL1 - Ligando 1 de la quimiocina (motivo C-X-C) (del inglés C-X-C motif Chemokine Ligand 1)

CXCL8 - Ligando 8 de la quimiocina (motivo C-X-C) (del inglés C-X-C motif Chemokine Ligand 8)

CX3CL1 - Ligando 1 de la quimiocina (motivo C-X3-C) (del inglés C-X3-C motif Chemokine Ligand 1)

CCL2 - Ligando 2 de quimiocina con motivo C-C (del inglés C-C motif Chemokine Ligand 2)

EGF - Factor de Crecimiento Epidermal (del inglés Epidermal Growth Factor)

FGFs - Factor de Crecimiento de Fibroblastos (del inglés Fibroblast Growth Factor)

FGF2 - Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (del inglés Fibroblast Growth Factor)

HGF - Factor de Crecimiento de Hepatocitos (del inglés Hepatocyte Growth Factor)

H & E - Hematoxilina y Eosina

IFN - Interferón

IGF - Factor de crecimiento similar a la insulina (del inglés Insulin-like Growth Factor)

IL- Interleucina

IL-1 - Interleucina 1

IL-8 - Interleucina 8

IL-1 β - Interleucina 1 Beta

MEC - Matriz Extracelular

MMPs - Metaloproteinasas de matriz extracelular (del inglés Matrix Metalloproteinases)

OMS - Organización Mundial de la Salud

PDGF - Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (del inglés Platelet Derived Growth Factor)

PQ - Post - Quemadura

RNA - Ácido Ribonucleico

scRNAseq - Secuenciación de RNA de Célula Única (del inglés Single cell RNA Sequencing)

TGF α - Factor de Crecimiento Transformante Alfa (del inglés Transforming Growth Factor Alpha)

TGF β - Factor de Crecimiento Transformante Beta (del inglés Transforming Growth Factor Beta)

TIMPs - Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas (del inglés Tissue Inhibitor of Metalloproteinase)

TNF - Factor de Necrosis Tumoral (del inglés Tumor Necrosis Factor)

VEGF - Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor)

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Estructura de la piel.

Figura 2. Clasificación de las capas de la epidermis.

Figura 3. Clasificación de las capas de la dermis.

Figura 4. Esquema de la hipodermis.

Figura 5. Esquema de las fases de cicatrización de la piel.

Figura 6. Clasificación de las quemaduras por su etiología.

Figura 7. Clasificación de las quemaduras de acuerdo con la profundidad del daño térmico en las capas de la piel.

Figura 8. Clasificación de las quemaduras por la extensión del área afectada, según la regla de los 9 de Wallace.

Figura 9. Clasificación de las quemaduras según la intensidad de daño.

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de ratones en modelos animales en el estudio de cicatrización de heridas.

Figura 10. Implementación del modelo murino de quemadura de segundo grado profundo.

Figura 11. Enzimas utilizadas para la digestión de la piel.

Figura 12. Establecimiento del modelo murino de quemadura de segundo grado profundo.

Figura 13. Seguimiento clínico del proceso de cicatrización de una quemadura de segundo grado profundo en ratón y su evolución a través del tiempo.

Figura 14. Seguimiento histológico de la quemadura de segundo grado profundo por tinción H & E a diferentes tiempos de evolución postquemadura.

Figura 15. Seguimiento histológico de la quemadura de segundo grado profundo por tinción tricrómica de Masson a diferentes tiempos de evolución postquemadura.

Figura 16. Acercamiento de la figura 14 B = 3dpq.

Figura 17. Acercamiento de la figura 14 D = 7dpq.

Figura 18. Acercamiento de la figura 14 F = 14dpq.

Figura 19. Definición del borde de la quemadura y delimitación de la zona a disectar en el modelo murino.

Figura 20. Delimitación y marcaje de zonas de Jackson en el modelo murino: N = zona de necrosis, E = zona de estasis, H = zona de hiperemia.

Figura 21. Disección del tejido del modelo murino.

Figura 22. Obtención del borde de la quemadura y zonas de Jackson delimitadas.

Figura 23. Obtención del área de la quemadura definida como borde de la quemadura.

Figura 24. Estructuras del tejido de 3 dpq, con tinción de Hematoxilina & Eosina, ZT = zona de transición, H = zona de hiperemia, E = zona de estasis.

Figura 25. Rendimientos celulares después de la disociación de la epidermis y la dermis de ratón.

GLOSARIO

Quemadura. Las quemaduras son lesiones en la piel u otro tipo de tejidos causadas por calor, sustancias químicas, electricidad, luz del sol o radiación nuclear.

Herida. Una herida es una lesión física en el cuerpo que provoca daño a la estructura del área lesionada.

Lesión por quemadura. Es una alteración o daño que se produce en alguna parte del cuerpo a causa de una quemadura y que daña las capas de la piel.

Cicatriz. Es un proceso de reparación complejo que tiene como resultado el cierre de la herida, la restauración del epitelio y la sustitución de la dermis por tejido fibroso compuesto por colágeno.

Epidermis. Es la capa más externa de la piel, se encuentra conformada por células en continua renovación, como las células basales, los melanocitos y las células escamosas.

Dermis. Es la capa de tejido conjuntivo que se encuentra situada debajo de la epidermis, está constituida por vasos sanguíneos, linfáticos, fibras elásticas, terminaciones nerviosas, glándulas sudoríparas y folículos pilosos.

Hipodermis. Es la capa más profunda de la piel. Consiste en una red de colágeno y células grasas. Actúa como amortiguador, ayuda a retener el calor corporal y a proteger el cuerpo de lesiones.

Matriz extracelular. Representa una red tridimensional que contienen todos los órganos, tejidos y células del cuerpo.

scRNAseq. Es una técnica con enfoque genómico que sirve para la detección y el análisis cuantitativo de moléculas de ARN mensajero en células individuales obtenidas de muestras biológicas.

Alogénico. Tejido que se trasplanta a otro individuo de la misma especie.

RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo obtener y caracterizar muestras de piel de ratón después de una quemadura grave, para su posterior análisis por secuenciación de RNA de célula única.

Para ello, se generó un modelo de quemadura de segundo grado profundo en ratones hembra de la cepa *Balb/c*, a las que se les produjo una lesión térmica utilizando un caudín precalentado. Una vez generado el modelo murino, se utilizó el tejido circundante de la quemadura y se realizó la caracterización histológica de la piel durante el proceso de cicatrización (0 a 21 días post-quemadura) con la finalidad de definir: 1) la zona y el área de la herida a estudiar y 2) el tiempo (días post-quemadura) que mejor represente a las tres fases del proceso de cicatrización (inflamación, reepitelización y remodelación).

Los resultados obtenidos nos permitieron evaluar los cambios clínicos e histológicos que ocurren en la piel quemada a lo largo del proceso de cicatrización. A partir del análisis histomorfológico definimos que los días 3, 7 y 14 post quemadura son los que mejor representan las etapas de inflamación, reepitelización y remodelación de la matriz extracelular, respectivamente, durante el proceso de reparación de este tipo de heridas. Además, definimos un área de 4 mm como el “borde de la quemadura” o la zona que representa la mayor actividad celular a partir de la cual inicia la reparación del daño, y establecimos los tiempos de incubación, y las enzimas necesarias para digerir el tejido y obtener los conteos y las viabilidades celulares requeridas para realizar el experimento futuro de secuenciación de RNA de célula única.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La piel: Función y estructura.

La piel, también llamada membrana cutánea, es el órgano más grande del cuerpo humano, ya que cuenta con aproximadamente 2 m² de superficie y un espesor que oscila entre 1 y 2.5 mm en la mayor parte del cuerpo (en párpados mide 0.5 mm alcanzando hasta 4 mm en el talón); y representa aproximadamente 5 kg del peso corporal total (Tortora & Derrickson, 2017). La piel se compone de tres capas principales: epidermis, la capa más externa; dermis, la capa media; e hipodermis, la capa profunda, cada una de las cuales contribuye a la capacidad protectora de la piel (Kanitakis, 2002) (Figura 1).

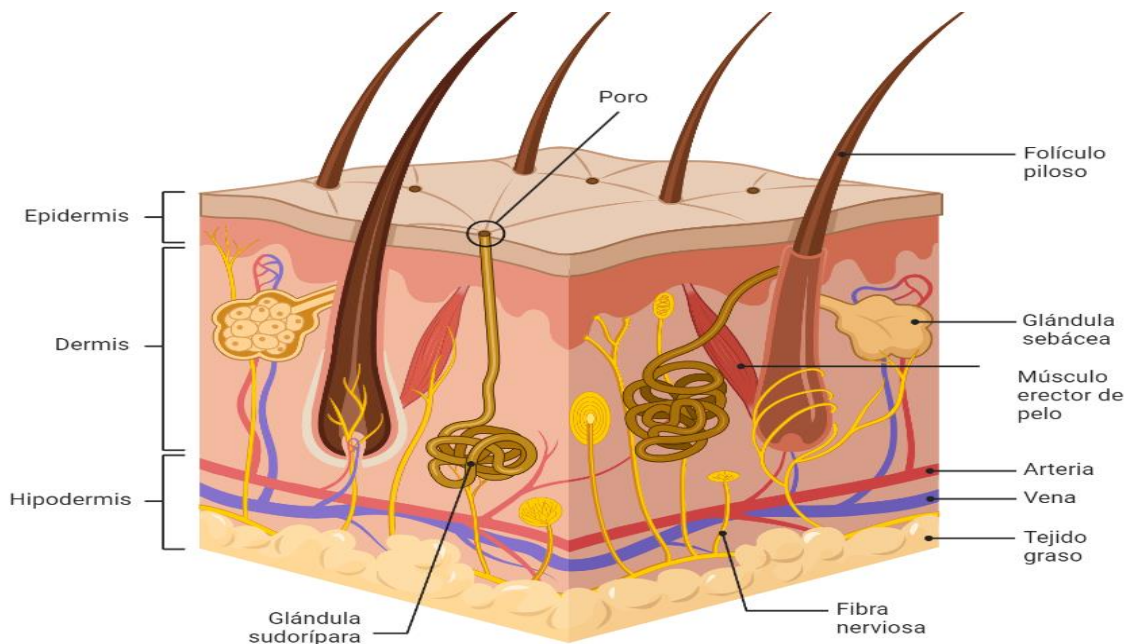


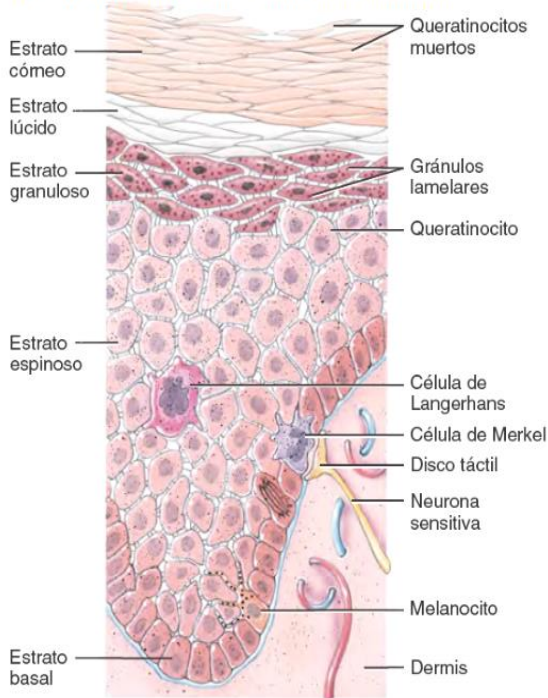
Figura 1. Estructura de la piel. Se esquematiza la anatomía de la piel, la cual se compone de 3 capas principales; epidermis, dermis e hipodermis, además de poseer varios anexos, tal como; folículos pilosos, poros, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas arterias y venas. Imagen realizada en Biorender.

1.2 Epidermis

La epidermis, es la capa más superficial y es la encargada de cubrir la totalidad del área corporal, se encuentra conformada por una fina capa de células, las cuales se encuentran en continua renovación; los queratinocitos representan entre el 90 y 95%, las células de Langerhans, que representan del 5 al 10%, los melanocitos representan alrededor del 8% y las células de Merkel son las menos numerosas de la epidermis (Tortora & Derrickson, 2017).

Estructuralmente la epidermis consta de 5 subcapas de células llamadas queratinocitos, estas células son producidas en la capa basal más interna y migran hacia la superficie de la piel, madurando y experimentando una serie de cambios, los cuales dan lugar a un proceso conocido como queratinización o cornificación que finalmente hace que cada estrato sea distinto (Figura 2).

A) Principales tipos de células en la epidermis.



B) Microfotografía de porción de piel y de los diferentes estratos.

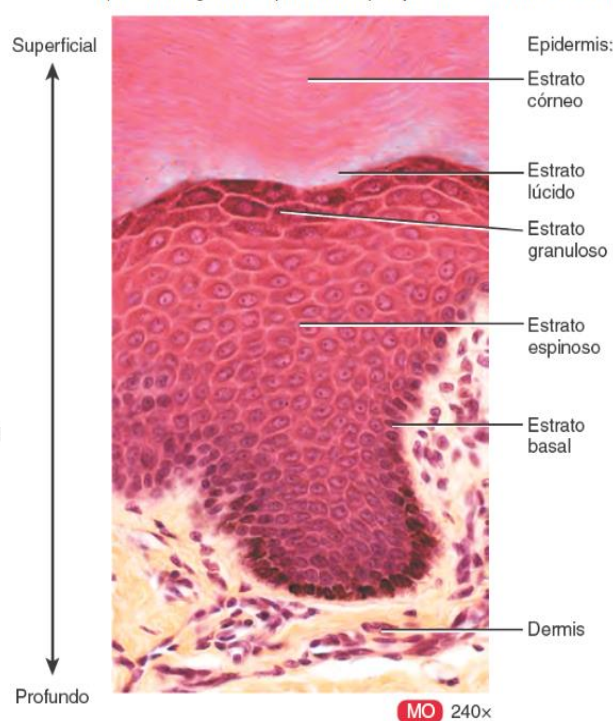


Figura 2. Clasificación de las capas de la epidermis. En el inciso A, se esquematizan los 5 estratos característicos de la epidermis, que se diferencian de acuerdo con la posición y la morfología de los queratinocitos. En el inciso B, se muestra una microfotografía de los 5 estratos clasificados como estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. Tomado y modificado de (Tortora & Derrickson, 2017).

1.3 Dermis

La dermis se localiza por debajo de la epidermis, su principal función es brindar soporte, resistencia y elasticidad a la piel, asimismo desempeña un papel clave en la distribución de nutrimentos hacia las capas externas. Otra característica de esta capa es que, debido a la vascularización y a la red nerviosa formada en su interior, actúa procesando información sensitiva referente al dolor, presión, tacto y temperatura.

La dermis se encuentra constituida por tejido conectivo, compuesto de células como fibroblastos, macrófagos, mastocitos, linfocitos, eosinófilos y monocitos, además contiene una elevada proporción de fibras de colágena y elastina. Esta capa a su vez se divide en 2 subcapas (dermis papilar y dermis reticular), que se diferencian entre sí por el grosor y por la distribución de las fibras de tejido conjuntivo principalmente; sin embargo, es importante mencionar que las subcapas no se encuentran separadas una de la otra (Valdés et al., 2012) (Figura 3).

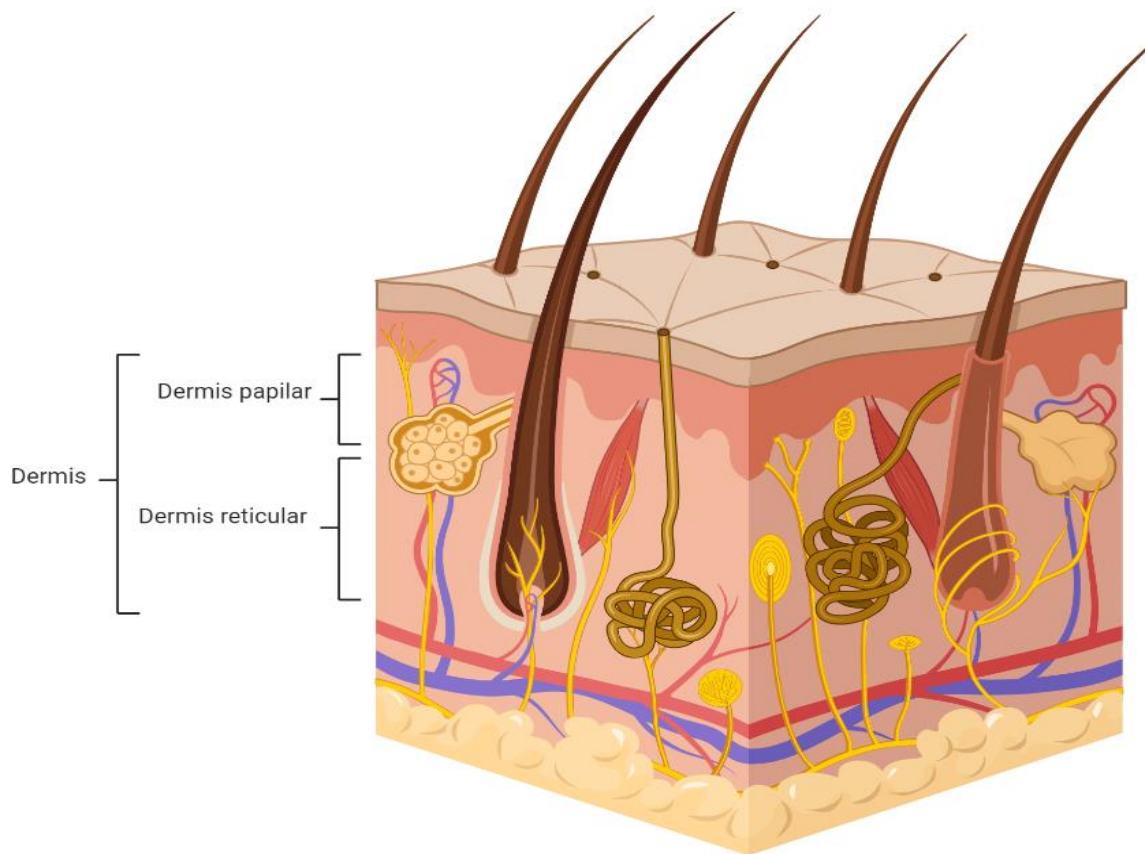


Figura 3. Clasificación de las capas de la dermis. Se esquematiza la capa correspondiente a la dermis, zona que se encuentra por debajo de la epidermis y misma que está dividida en 2 subcapas: la dermis papilar y la dermis reticular. La región papilar, está constituida por mastocitos, fibroblastos, numerosas terminaciones nerviosas, receptores sensoriales y vasos linfáticos, mientras que la región reticular está conformada principalmente por fibras elásticas y fibras de colágena, las cuales proporcionan resistencia y elasticidad. Imagen realizada en Biorender.

Dermis papilar. Esta capa recibe su nombre por su alto contenido en papilas y su continua relación con la epidermis, es decir, la fina capa epidérmica de la piel se acopla estrechamente a las crestas de las papilas dérmicas.

La dermis papilar se encuentra formada por tejido conectivo laxo y una fina red de fibras de colágena. En las papilas, se encuentran las asas capilares que permiten el abastecimiento nutritivo de la epidermis, además contienen numerosos receptores sensoriales, terminaciones vasculares y vasos linfáticos iniciales.

Dermis reticular. Se trata de la capa más profunda y ancha de la dermis y su grosor variable contribuye a una de las diferencias en el grosor de la piel. Esta capa se encuentra constituida por una densa capa de fibras de colágena, las cuales se encuentran fuertemente entrelazadas, y además contiene fibras elásticas que le confieren resistencia y elasticidad a la piel. Entre los espacios de las fibras se encuentran adipocitos, folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y nervios.

1.4 Hipodermis

Debajo de la dermis se localiza una capa más, la hipodermis o capa subcutánea, la cual se compone de tejido conjuntivo laxo y tejido adiposo donde hay presencia de vasos sanguíneos y nervios. Su función fundamental es almacenar energía, conservar el calor y brindar protección mecánica frente a golpes (Wong et al., 2016) (Figura 4).

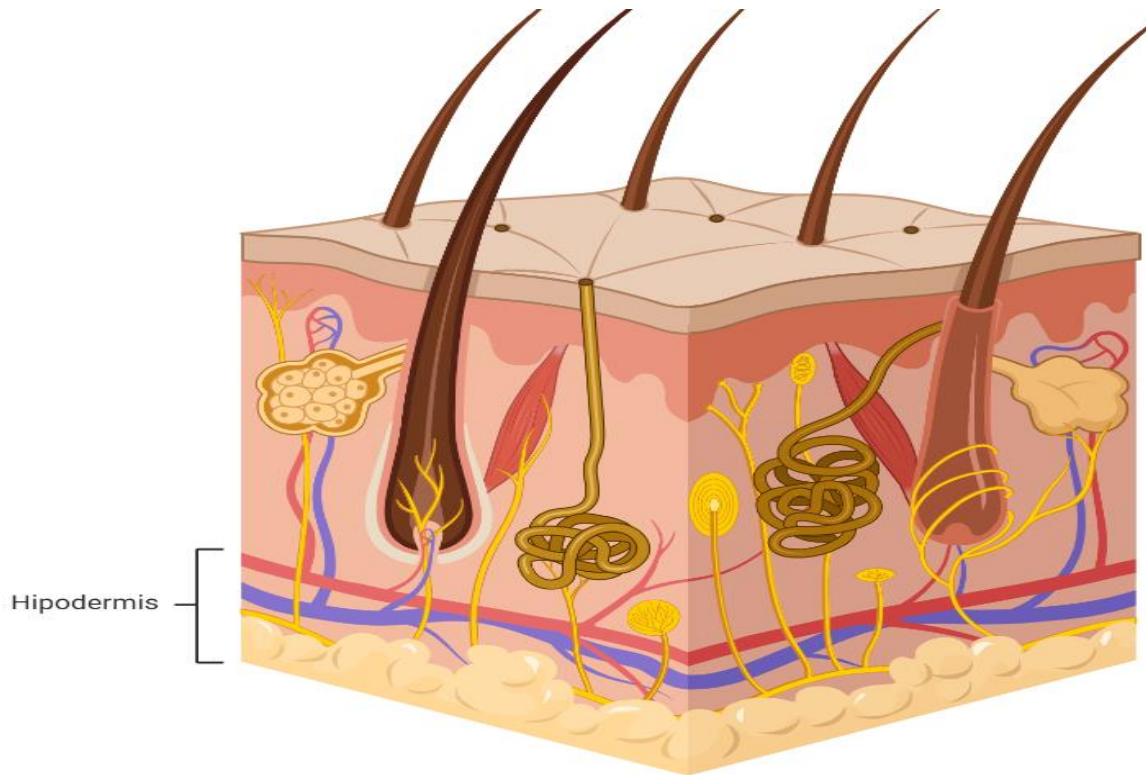


Figura 4. Esquema de la hipodermis. Se muestra una imagen representativa de la capa subcutánea, conformada por tejido adiposo, red de colágeno, vasos sanguíneos y nervios, es la capa encargada de la termorregulación, almacenamiento de energía y capacidad protectora frente a golpes. Imagen realizada en Biorender.

La piel forma parte del sistema tegumentario y es un órgano que ejerce diversas funciones, como; barrera protectora que actúa contra daños ocasionados por agentes físicos y químicos, evita la entrada de microorganismos, controla la pérdida de agua, electrolitos y tiene funciones específicas como la termorregulación, además de que por sus terminaciones nerviosas es un órgano sensorial muy importante (Kanitakis, 2002).

Dado que la piel es un órgano involucrado en la protección de los seres vivos y actúa como un escudo, la piel está expuesta a constantes y múltiples factores externos que pueden alterar su homeostasis. Cuando la barrera natural de la piel se altera, las funciones y su aspecto se ven comprometidos y los daños repercuten negativamente en nuestra salud: sin embargo, la capacidad de respuesta de la piel ante agresiones físicas, químicas y biológicas es tan compleja que le permite “repararse” después de haber sufrido un daño.

2. El proceso de cicatrización de la piel

El proceso de cicatrización de la piel se encuentra encaminado a la reparación correcta de las heridas por medio de reacciones e interacciones celulares, este proceso se compone de una cascada coordinada de eventos celulares, moleculares y bioquímicos, donde se distinguen 3 fases principales: inflamación, reepitelización o proliferación y remodelación, las cuales se ejecutan de manera conjunta, secuencial y superpuesta, pero que mantienen características distintas entre sí (Figura 5).

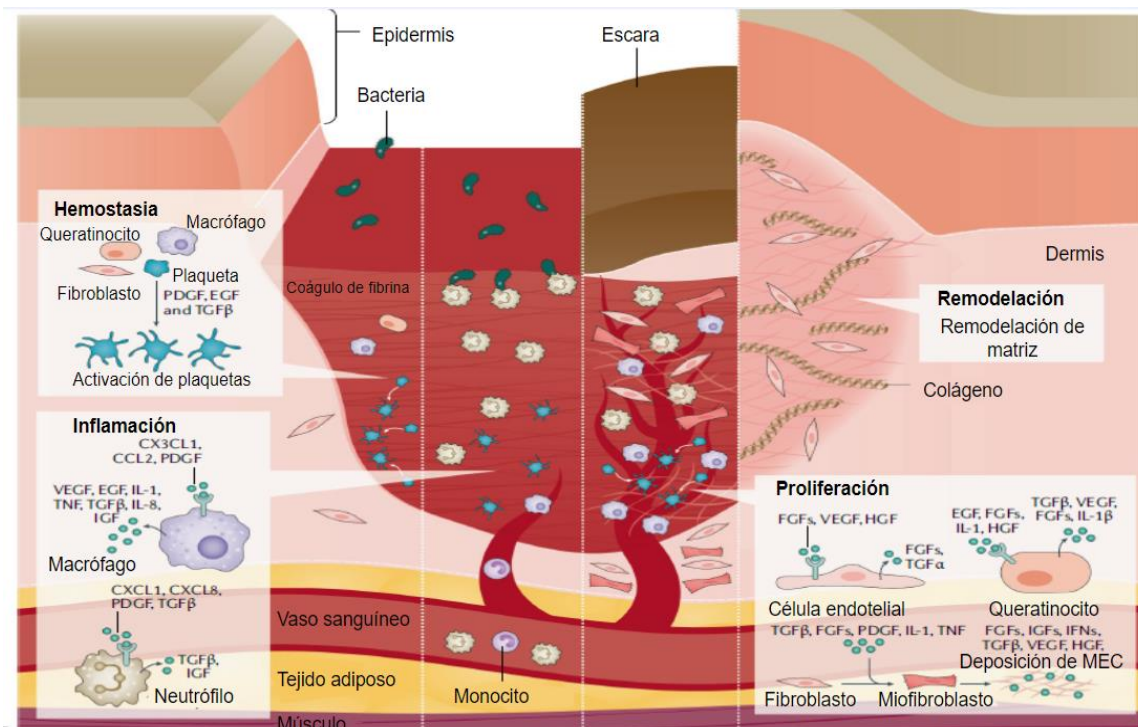


Figura 5. Esquema de las fases de cicatrización de la piel. El proceso de reparación de quemaduras consta de 3 etapas consecutivas y superpuestas entre sí; inflamación, reepitelización y remodelación de la matriz extracelular, en las que se requiere del reclutamiento y la actividad de distintos tipos celulares que incluyen células mieloides, linfoides, fibroblastos y queratinocitos. Tomado y modificado de (Jeschke et al., 2020).

Por ejemplo, en presencia de una lesión que produce pérdida de la continuidad de la piel por un daño de tipo escisional o mecánico se forma de manera inmediata una red la cual se encuentra conformada por plaquetas, fibrina y células inmunológicas que tienen la característica de sellar la zona y actuar como una primera línea de defensa ante la posible presencia de patógenos conocida como hemostasia. Después se inicia la respuesta inflamatoria con la liberación de señales que activan y atraen células al sitio de daño como neutrófilos y macrófagos enfocadas a evitar la presencia de patógenos en el área y eliminar el material biológico dañado

limpiando el lecho de la herida para favorecer la formación de tejido nuevo; en seguida se presenta la fase de reepitelización, en ella se da un remplazo del coágulo formado en la hemostasia, dado principalmente por fibroblastos y su secreción de colágena tipo III en el sitio, también en esta fase se presenta la formación de nuevos vasos sanguíneos que facilitan el suministro de oxígeno y nutrimentos al nuevo tejido, creando una matriz extracelular que promueve la migración de queratinocitos que darán lugar a un epitelio joven. Por último, en la fase de remodelación se lleva a cabo el recambio de la colágena tipo III por la colágena tipo I y las fibras de colágena se reorganizan aplanando la cicatriz y adquiriendo características similares a la piel original (Jeschke et al., 2020).

En lesiones como las quemaduras, el proceso de reparación no ocurre de la misma manera, ya que factores como la etiología de la lesión, la superficie corporal quemada y la profundidad del daño son determinantes para el curso de la cicatrización y su tratamiento. Dichos factores determinan, por ejemplo, la formación o no de una escara (tejido necrótico), si la fase hemostática se encuentra disminuida o ausente y además si las alteraciones inflamatorias ocurren a nivel local y/o sistémico, la cuales pueden provocar complicaciones clínicas severas. Dichas complicaciones pueden conducir en el mejor de los casos a la formación de cicatrices hipertróficas muy pronunciadas e incluso a una respuesta inflamatoria severa que en la mayoría de los casos conlleva a la muerte (Rowan et al., 2015).

Como resultado de las campañas de prevención y estudios que se han realizado en los últimos años, los accidentes y daños causados por quemaduras han disminuido

drásticamente. A pesar de ello, el tratamiento de los pacientes afectados representa aún un desafío clínico debido a las dificultades derivadas del proceso inflamatorio exacerbado y cierre lento de las heridas, de manera que el estudio de los procesos celulares y moleculares involucrados en la reparación del daño es fundamental para la búsqueda de estrategias terapéuticas que mejoren la arquitectura y la funcionalidad de la piel afectada.

2.1 Definición de una quemadura

Las quemaduras de la piel son el resultado de un traumatismo físico, químico o biológico, que produce pérdida de la continuidad de la piel y que induce la desnaturalización de las proteínas tisulares, produciendo desde una leve afectación del tegumento superficial hasta la destrucción total de los tejidos implicados. Las quemaduras de la piel producen tres efectos: pérdida de líquidos, pérdida de calor, lo que puede causar hipotermia y pérdida de la acción de barrera frente a los microorganismos, aumentando la susceptibilidad de infección (Evers et al., 2010). Estas lesiones varían desde un simple enrojecimiento, como lo observamos en las quemaduras de primer grado, hasta la destrucción total de la piel y los tejidos subyacentes en las quemaduras de tercer grado. Cabe resaltar, que las lesiones son severas cuando el porcentaje del cuerpo lesionado alcanza el 20% de superficie corporal quemada, poniendo en riesgo la vida del paciente (Daigler et al., 2015).

3. Clasificación de las quemaduras

3.1 Por su etiología

Las quemaduras pueden clasificarse dependiendo del agente causal que las provoca en: quemaduras químicas, térmicas, eléctricas, quemaduras por fricción y por agentes biológicos (Figura 6).



Figura 6. Clasificación de las quemaduras por su etiología. En el esquema se observa que según el agente causal, existen 5 categorías principales de quemaduras. Imagen realizada en Biorender.

A continuación, se describe de forma breve el tipo de quemadura de acuerdo con el agente etiológico que las origina (Hettiaratchy S. et al. 2004):

- Las quemaduras térmicas se producen por el contacto con una fuente de calor que origina el exceso de temperatura y genera lesiones en la piel y tejidos subcutáneos. Se suelen subdividir en quemaduras por contacto con líquidos calientes (conocidas como escaldaduras), por fuego directo y radiación.
- Las escaldaduras se producen cuando la piel entra en contacto prolongado con líquidos con altas temperaturas, son las quemaduras más recurrentes en la infancia, sobre todo en los niños menores de 2 años.
- Las quemaduras por fuego directo se producen por contacto con fuego o llamas, el cual es el agente más frecuente de quemaduras graves.
- Las quemaduras por radiación son ocasionadas por el contacto con material radioactivo, los cuales emiten partículas beta, radiación gamma o rayos X de baja intensidad.
- Las quemaduras por congelamiento se originan por temperaturas extremadamente bajas, las cuales afectan al organismo de tal forma que disminuyen la microcirculación y provocan enrojecimiento, ampollas, necrosis de la piel e incluso daños irreversibles en las zonas afectadas.
- Las quemaduras químicas ocurren por exposición con agentes como ácidos fuertes, fenoles, gas mostaza, sustancias químicas corrosivas, limpiadores y los álcalis. Dependiendo del tiempo de exposición y la cantidad de sustancia, la quemadura tendrá menor o mayor gravedad.

- Las quemaduras eléctricas suelen afectar a la piel y a los tejidos subyacentes, son ocasionadas por el contacto con fuentes eléctricas, pueden ser causadas por tormentas eléctricas, armas paralizantes o algún flujo de corriente.
- Las quemaduras por agentes biológicos son secundarias al contacto con diversos seres vivos como insectos, medusas, peces, batracios, y ciertas plantas como la ortiga.
- Las quemaduras por fricción son generadas por contacto brusco y repetido, es decir, si la piel roza bruscamente contra una superficie que produce una abrasión.

3.2 Por la profundidad del daño

Para evaluar la gravedad de una quemadura, no sólo se tiene en cuenta el agente causal, sino que además es importante considerar otros factores como la profundidad del daño y la extensión afectada.

Las quemaduras de primer grado son el tipo de quemaduras menos graves y tienen la particularidad de presentar daño únicamente en la capa superficial de la piel, conocida como epidermis. Son producidas por lo general por rayos solares. La singularidad clínica de este tipo de quemaduras es la presencia de enrojecimiento (presencia de eritema), sin formación de ampollas, con dolor moderado a severo al contacto, con un tiempo de curación de entre 3 y 7 días con mínimos cuidados y sin dejar cicatriz (Oryan et al., 2017; Jeschke et al., 2020).

En las quemaduras de segundo grado, existe una subclasificación y se divide en dos tipos; superficial y profundo, sin embargo, el caso más común para las quemaduras profundas es que se encuentren de forma mixta; es decir, de forma superficial y profunda en el mismo tejido. Las quemaduras de grado superficial son producidas por líquidos calientes generalmente, mientras que las quemaduras de segundo grado profundo son ocasionadas por fuego directo (González, 2018).

En el caso de las quemaduras de segundo grado superficial, se presenta el daño en la capa de la epidermis y en la dermis papilar, se muestra una coloración roja, formación de ampollas y dolor severo en el área afectada. El proceso de cicatrización de la quemadura tiene una duración de entre 1 a 3 semanas y generalmente no hay formación de cicatriz, sin embargo, se observan cambios en la pigmentación de la piel. Los agentes etiológicos más comunes que producen este tipo de quemaduras son; las escaldaduras por líquidos calientes y las que se producen en consecuencia de sólidos calientes (plancha, estufa) (González, 2018).

Por otro lado, en las quemaduras de segundo grado profundo se afecta tanto la epidermis como la dermis completa (región papilar y reticular), además se pierden todas las estructuras de dichas capas, no hay formación de ampollas, el dolor es de menor intensidad y el tiempo de curación de la lesión se extiende de 3 a 6 semanas con formación de cicatriz, en este caso particular, los agentes causales de quemaduras de segundo grado profundo son los que provocan quemaduras

térmicas y quemaduras eléctricas principalmente (Jeschke et al., 2020; González, 2018).

Finalmente, la quemadura de tercer grado afecta todas las capas de piel, es decir, la epidermis, la dermis e hipodermis, en este tipo de quemaduras se observan vasos trombóticos y hay ausencia de dolor debido a la destrucción de las terminales nerviosas, su coloración y sus características clínicas son muy específicas, ya que estas quemaduras presentan un color marrón oscuro, amarillo pálido, blanquecinas o de color negro en caso de que las quemaduras hayan sido ocasionadas por altas temperaturas y prolongada exposición. Generalmente se observan con aspecto seco, de consistencia dura y acartonada, no repara de primera intención y en la mayoría de las situaciones, se requiere de injertos de piel sana para su recuperación (Jeschke et al., 2020) (Figura 7).

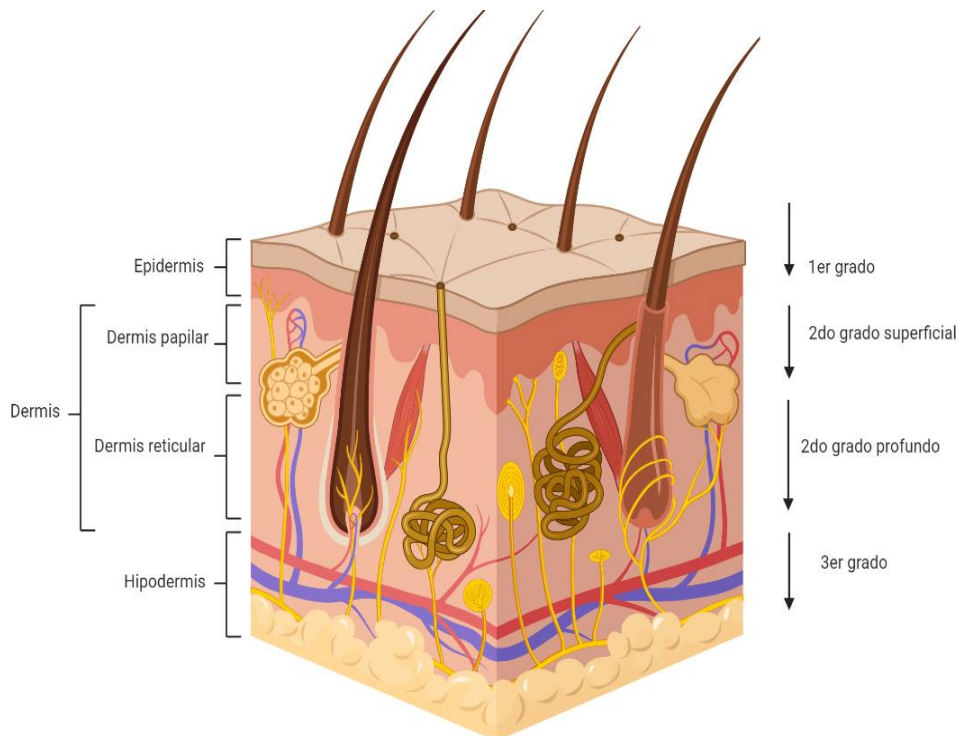


Figura 7. Clasificación de las quemaduras de acuerdo con la profundidad del daño térmico. Se esquematizan las 4 categorías principales de quemaduras de acuerdo con la profundidad del daño generado en las capas de la piel. Imagen realizada en Biorender.

3.4 Por la extensión del área afectada.

Es importante tener en cuenta la extensión del área afectada para conocer la severidad de la quemadura. La extensión se expresa como el porcentaje de superficie corporal quemada (SCQ). Para calcular la extensión aproximada de la zona afectada en adultos, se ha empleado tradicionalmente la regla de los 9 de Wallace, que asigna valores de 9 o múltiplos de nueve a las distintas zonas del cuerpo como son: tórax, abdomen, espalda superior e inferior, glúteos, muslos y extremidades superiores. Cabe mencionar que este modelo solo se utiliza para quemaduras de segundo y tercer grado (espesor parcial y total) y se pueden realizar algunas modificaciones de acuerdo con el índice de masa corporal y la edad del paciente (Moore et al., 2023) (Figura 8).

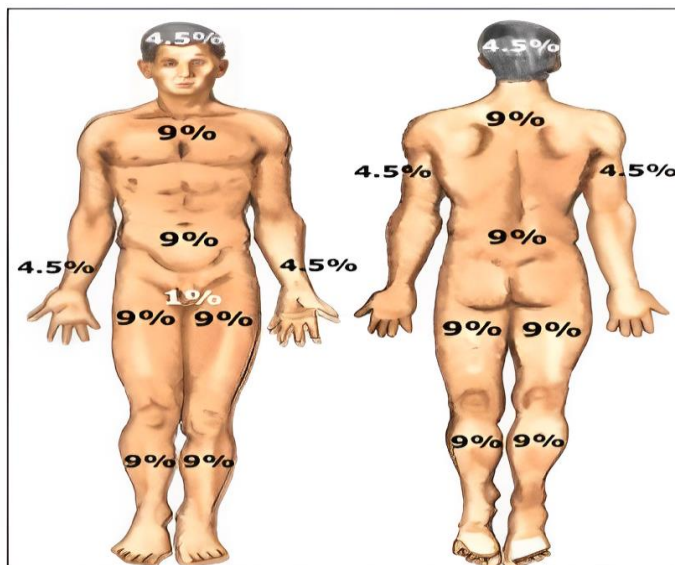


Figura 8. Clasificación de las quemaduras por la extensión del área afectada. De acuerdo con la regla de los 9 de Wallace, el daño generado por una quemadura se evalúa según la extensión cutánea afectada en un paciente, en el esquema se observa el valor asignado a cada segmento corporal. Tomado y modificado de: (De los Santos, 2005).

Para poder llevar a cabo un buen manejo de las quemaduras y brindar la atención necesaria a los pacientes, es importante determinar de manera precisa el porcentaje de superficie corporal quemada, sin embargo, en el caso de los pacientes pediátricos se requieren consideraciones especiales, es por eso que, en este tipo de pacientes, se utilizan otras referencias (gráficas de Lund y Browder) que calculan el área quemada con ayuda de monogramas estándar de superficie corporal. Otro método que suele utilizarse para medir la extensión del área afectada es tomar como referencia la palma de la mano del paciente, que corresponde aproximadamente al 1% de su superficie corporal. Este método es empleado tanto para adultos como para niños y se usa en quemaduras pequeñas (Chong et al., 2020).

3.5 Por la intensidad del daño

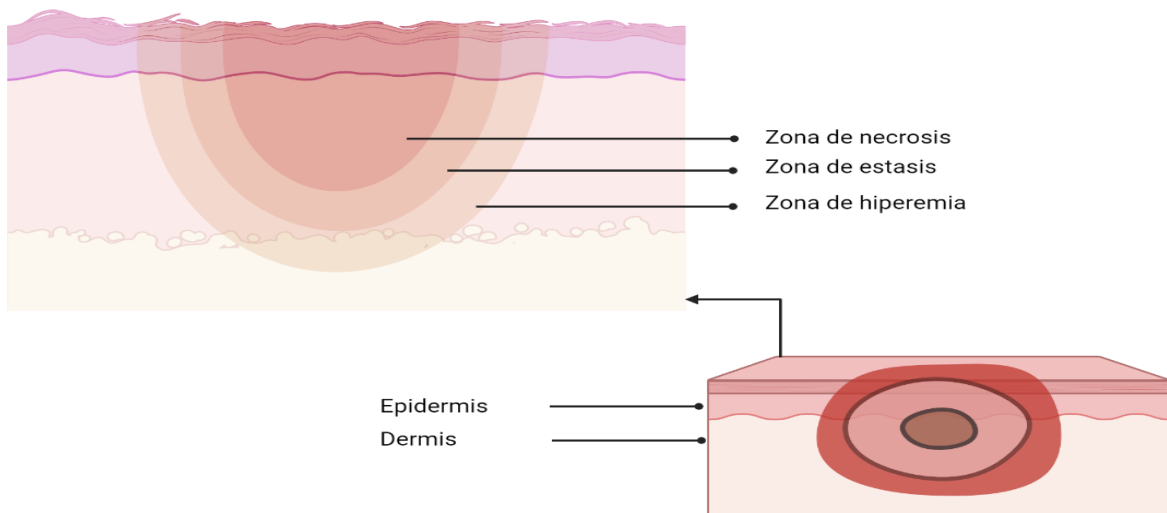
Después de una lesión cutánea provocada por una quemadura, se pueden identificar tres zonas principales; zona de coagulación o necrosis, zona de estasis y zona hiperémica, las cuales fueron descritas por Jackson en 1947 y se distinguen según la intensidad del daño alcanzado (Uraloğlu et al., 2018; Hettiaratchy et al., 2004).

Zona de coagulación o necrosis: Es la zona más dañada y es en donde se recibe el impacto del agente etiológico que la provoca. Es ahí donde se produce la mayor destrucción celular y por consiguiente es el área de mayor profundidad. El agente etiológico ocasiona coagulación de las proteínas y pérdida irreversible de tejido.

Zona de estasis: Es el área circunvecina a la zona de coagulación; la profundidad de la quemadura en esta área es menor. Esta zona es muy importante, ya que el tejido de esta región se puede recuperar de acuerdo con el tratamiento que reciba el paciente, puede evolucionar hacia la necrosis o la profundización, si la herida se seca o se infecta. De ser tratada adecuadamente el proceso de cicatrización evolucionará de manera satisfactoria, epitelizando en el tiempo esperado (Lu et al., 2022).

Zona hiperémica: Es el área más externa de la quemadura, localizada en la periferia del daño, en esta zona aumenta la perfusión tisular por la dilatación de los vasos, debido a la liberación de mediadores proinflamatorios. El tejido dañado en esta zona se recupera de manera favorable, a menos que exista una sepsis grave (Hettiaratchy et al., 2004) (Figura 9).

Figura 9. Clasificación de las quemaduras según la intensidad de daño. Después de una quemadura, se generan tres zonas particulares en el área de la lesión que son: zona de coagulación, zona de



estasis y zona de hiperemia, estas zonas se identifican de acuerdo a la localización, la intensidad del daño y la extensión del tejido dañado. Imagen realizada en Biorender.

4. Epidemiología de las quemaduras

De acuerdo con la OMS, las quemaduras constituyen un problema de salud pública a nivel mundial y provocan alrededor de 180,000 muertes al año, de las cuales la mayoría se produce en los países de ingreso bajo y mediano, y casi dos tercios, en las regiones de África y de Asia Sudoriental (OMS, 2018).

Actualmente se han realizado estudios comparativos de tendencia en la epidemiología de las quemaduras y los resultados obtenidos muestran que, en muchos países de ingreso alto, la tasa de muerte por quemaduras ha ido disminuyendo considerablemente en los últimos años, sin embargo, en los países de ingreso bajo y mediano, aún se presenta una tasa de mortalidad alta (Smolle et al., 2017).

Por otra parte, también existen las quemaduras no fatales, que son una de las principales causas de morbilidad, que incluye hospitalización prolongada, desfiguración y discapacidad, lo que suele generar estigmatización, rechazo y dificultad para reincorporarse a la vida laboral/social. De hecho, las quemaduras se encuentran entre las principales causas de pérdida de años de vida ajustados en función de la discapacidad en los países de ingreso bajo y mediano (Oryan et al., 2017; Rowan et al., 2015). A pesar de los grandes avances tecnológicos y de la disminución de los accidentes provocados por quemaduras, su tratamiento representa un reto clínico debido al grado de destrucción, la extensión de la lesión, las infecciones locales y sistémicas, el dolor y las complicaciones derivadas de un proceso cicatrizal lento y a su impacto sobre la vida del paciente. Además, las quemaduras representan uno de los traumas más severos al cual puede verse expuesto un individuo, ya que este tipo de trauma tiene efectos locales y sistémicos bien establecidos, pero no muy bien comprendidos. Por lo anterior, el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que orquestan el proceso de cicatrización de este tipo de lesiones es fundamental para avanzar en la medicina traslacional (Lang et al., 2019).

5. El modelo murino como una herramienta para estudiar la cicatrización de quemaduras

En los últimos años, se han desarrollado diferentes modelos animales de lesión por quemadura, en los cuales se incluyen roedores, caballos, y cerdos principalmente, con la finalidad de poder estudiar diferentes aspectos y mecanismos asociados al

proceso de cicatrización. Gracias a estos modelos se ha logrado tener un panorama más amplio de los fenómenos involucrados en este proceso de reparación de quemaduras en etapas tempranas y tardías (Abdullahi et al., 2014).

Los modelos animales se definen como una especie no humana que se utiliza con fines de investigación, los cuales ayudan a replicar algunos aspectos de un proceso biológico o de una enfermedad presente en los seres humanos (Abdullahi et al., 2014).

Dentro de los modelos animales, el modelo murino (ratón) es el más utilizado para estudiar diversos aspectos del proceso de cicatrización de la piel quemada y esto se debe a la similitud estructural y a la forma en que interviene el proceso de curación de una herida en comparación con el del ser humano. Los modelos murinos son ideales para estudiar distintos procesos celulares, bioquímicos y moleculares que se desencadenan después de una quemadura, además el mantenimiento de estos modelos requiere de condiciones sencillas, controladas y relativamente económicas (Ericsson et al., 2013).

Sin embargo, existen diferencias y algunas desventajas de utilizar este modelo animal en la investigación de las quemaduras y sus efectos. Por ejemplo, es importante señalar que la piel de los roedores, a diferencia de la piel humana, es más elástica y cuenta con una capa delgada extra llamada panículo carnoso, el cual se caracteriza por que su función principal es estimular y acelerar el cierre de herida

por medio de la contracción de la piel sin formar cicatriz hipertrófica, mientras que la piel humana, por el contrario, se repara principalmente mediante la formación de tejido de granulación y la reepitelización (Rodrigues et al., 2019). Otra desventaja de estos modelos experimentales es que no reproducen de manera efectiva ciertas enfermedades humanas (Tabla 1).

Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de ratones en modelos animales para el estudio de cicatrización de heridas.

| Ventajas | Desventajas |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ● Son fáciles de manejar ● Modelo animal más utilizado ● Son económicamente accesibles ● El modelo puede estandarizarse ● El modelo mimetiza las fases de cicatrización | <ul style="list-style-type: none"> ● Cuestión ética ● Su esperanza de vida es más corta ● No reproducen de manera efectiva ciertas enfermedades humanas ● En un gran porcentaje los ratones cierran sus heridas por contracción ● Tiene diferencias fisiológicas |

Conocer las ventajas y limitaciones de este tipo de modelos, es crucial para el diseño y desarrollo de tratamientos y a pesar de las desventajas que ya mencionamos, el modelo murino de quemadura ha sido una herramienta de investigación fundamental para comprender los mecanismos involucrados en el proceso de cierre, ya que reproduce eficazmente las primeras fases de cicatrización, además de que se pueden estudiar *in vivo* los efectos de distintas estrategias

experimentales sobre la velocidad y calidad de la reparación de la herida (Abdullahi et al, 2014).

6. La importancia de estudiar los perfiles transcripcionales durante la cicatrización de una quemadura y la introducción de la tecnología de secuenciación de RNA de célula única (scRNAseq)

El transcriptoma es el conjunto de lecturas de todos los genes que se encuentran en una célula, es decir, es el grupo de moléculas de RNA (mensajero y no codificante) presente en una célula o tejido específico y su estudio nos ha permitido comprender los cambios de expresión génica que ocurren en ciertos tejidos y órganos durante diversos procesos fisiopatológicos (Olsen & Baryawno, 2018). Desafortunadamente, hasta ahora no se han realizado estudios masivos (secuenciación de RNA convencional o RNAseq) sobre los cambios transcripcionales generados por una quemadura, lo que restringe nuestro entendimiento acerca de los mecanismos moleculares y las vías de señalización que controlan las actividades de las células relacionadas con la reparación. Además, dichas técnicas no tienen la capacidad de revelar la heterogeneidad celular presente en un tejido. Afortunadamente, con los nuevos avances tecnológicos, ahora es posible llevar a cabo el estudio de cambios transcripcionales en las poblaciones celulares que conforman a un tejido (Wang et al., 2021).

La secuenciación de RNA de célula única (scRNAseq), es una técnica novedosa que permite estudiar, de manera independiente, la expresión génica de cientos o

miles de células aisladas en una muestra biológica, proporcionando información detallada sobre la heterogeneidad y el funcionamiento celular, la evolución de un proceso biológico y la diferenciación celular. A grandes rasgos la técnica de scRNAseq se basa en los siguientes pasos: (Aljanahi et al., 2018).

1. Obtención y aislamiento de células individuales.
2. Captura de mRNA de células individuales.
3. Amplificación.
4. Preparación de bibliotecas.
5. Secuenciación.
6. Análisis de resultados.

Los resultados que se obtienen con la técnica de scRNAseq, brindan información valiosa, ya que permiten conocer la expresión génica de cada célula que conforma un tejido, además hace posible el análisis respecto a la forma en la que se expresan los genes en las diferentes poblaciones celulares y éste a su vez nos proporciona información del comportamiento en diferentes microambientes, es decir, de cómo es que las poblaciones cambian en presencia de un daño o de una patología.

7. La técnica de scRNAseq como estrategia de estudio en procesos de cicatrización cutánea

Hace no más de cinco años, el proceso de cicatrización de heridas escisionales se empezó a estudiar desde la perspectiva transcriptómica de células individuales o

scRNAseq. Diversos estudios realizados en modelos murinos han demostrado que la heterogeneidad de las poblaciones de fibroblastos es mucho mayor de lo que se proponía (Guerrero et al., 2019). De hecho, existen poblaciones de fibroblastos con programas transcripcionales que podrían promover la regeneración de ciertas estructuras de la dermis (como los folículos pilosos) (Abbasi et al., 2020), sin embargo, la mayoría de los fibroblastos tienen programas fibróticos altamente activos (Abbasi et al., 2020). Con las mismas perspectivas experimentales, se han estudiado las interacciones moleculares que ocurren para que se activen las células troncales que residen en los folículos pilosos (Joost et al., 2018) y los programas transcripcionales que dirigen la migración de los queratinocitos en la fase de reepitelización.

Gracias a estos avances, los científicos han complementado la información que se obtiene de otras técnicas de estudio y análisis para conocer y comprender fenómenos celulares, bioquímicos y moleculares que intervienen en el proceso de cicatrización. Como ya se mencionó previamente, hasta ahora la cicatrización de las quemaduras no se ha estudiado desde esta perspectiva molecular, por lo que en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación se ha propuesto utilizar la tecnología de scRNAseq para conocer los programas transcripcionales que dirigen las distintas fases de la reparación de quemaduras profundas. Para alcanzar ese objetivo, la primera fase experimental consiste en definir las zonas y el área de la quemadura que se estudiará, así como los tiempos post-quemadura que definirán a cada una de las fases de cicatrización (inflamación,

reepitelización y remodelación). Una vez que se hayan definido esas características, otro punto crucial para realizar la scRNAseq es optimizar el proceso de obtención de células individuales que cumplan con la cantidad y viabilidad requeridas para el experimento.

8. Planteamiento del problema

Las quemaduras son un problema serio de salud pública, debido a que, en los casos de sobrevivencia, los pacientes tienden a tener secuelas graves, como cicatrices que afectan la apariencia, funcionalidad y reducción de movilidad del área afectada y en consecuencia discapacidades físicas. A pesar de que se han realizado avances significativos (a nivel histológico y bioquímico) en el estudio del proceso de cicatrización de este tipo de heridas, aún nos falta conocer los eventos celulares y moleculares que se coordinan para que ocurra o no la reparación de la herida. Este conocimiento científico es fundamental para el avance en el diagnóstico y la terapia clínica de las quemaduras y sus secuelas más importantes. Los resultados del presente trabajo sientan las bases histomorfológicas para en el futuro realizar el análisis transcriptómico de las poblaciones celulares que participan en la cicatrización de una quemadura grave.

9. Hipótesis

A partir de la generación del modelo murino de quemadura de segundo grado profundo, se definirán los tiempos que representan las 3 fases de cicatrización. La etapa aguda ocurrirá en los primeros 5 días post quemadura, la fase de reepitelización en un periodo entre los 5 -10 días postquemadura y la remodelación temprana de la matriz extracelular se observará en un periodo de entre 15 - 25 días postquemadura.

10. Objetivo general

Obtener y caracterizar muestras de piel de ratón, después de una quemadura de segundo grado profundo, para su análisis por secuenciación de RNA de célula única

11. Objetivos específicos

- a) Generar un modelo murino de quemadura de segundo grado profundo

- b) Caracterizar histomorfológicamente muestras de piel después de 1, 3, 5, 7, 9, 14,16, y 21 días post-quemadura.

- c) Definir el área de la quemadura que se utilizará para el análisis de secuenciación de célula única.

- d) Obtener suspensiones celulares para el análisis de secuenciación de célula única.

12. Diseño y metodología

12.1 Modelo murino de quemadura de segundo grado profundo.

Para el modelo murino de quemadura se utilizaron ratones hembra de la cepa Balb/c de 6-8 semanas de edad. Los animales (20-25 gramos de peso) se anestesiaron con una mezcla de ketamina (10 µL intramuscular / xilacina 10 µL intraperitoneal) y bajo el efecto de la anestesia, los animales se rasuraron de la parte dorso lateral derecha. Para generar la lesión por quemadura, se sometieron a una quemadura térmica utilizando un cautín (contacto de 2 segundos). El cautín se precalentó a 95°C durante 15 minutos. La quemadura generada correspondió a una quemadura térmica de espesor total (segundo grado profundo) de 2.5 cm², lo que equivale al 8% de la superficie corporal total del ratón (Figura 10). Los protocolos necesarios para el manejo animal que requiere el modelo de quemadura han sido previamente aprobados por el CICUAL del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” para el protocolo con registro 60-20.

Definición de los grupos de estudio. 9 grupos de estudio para su comparación:

- **Grupo control:** Ratones sanos de la edad correspondiente a los que fueron quemados.
- **Grupo de inflamación:** Ratones correspondientes al día post-quemadura (pq) 1, 3 y 5.

- **Grupo de reepitelización:** Ratones correspondientes a los días pq 7 y 9.
- **Grupo de remodelación:** Ratones correspondientes a los días pq 14, 16 y 21.
- **Criterios de inclusión.** Ratones hembra de la cepa Balb/c de 6-8 semanas de edad.
- **Criterios de eliminación.** Animales que mueran durante el proceso de quemadura.
- **Criterios de exclusión.** Animales que presenten alteraciones no relacionadas con el daño generado por la quemadura, tales como ectoparasitosis, autofagia, etc.

Tamaño de la muestra. 3 animales por grupo de estudio.

En la siguiente figura, se describe la metodología utilizada para generar el modelo murino de quemadura de segundo grado profundo (Figura 10).

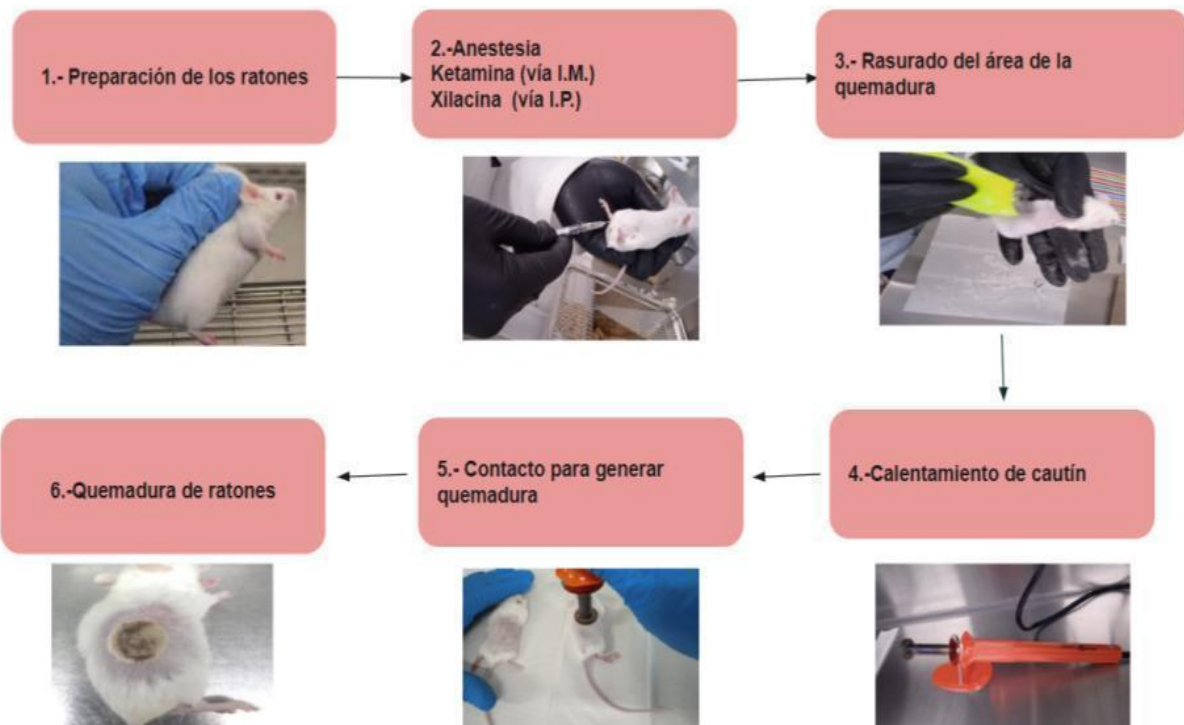


Figura 10. Implementación del modelo murino de quemadura de segundo grado profundo.

12.2 Obtención de muestras y caracterización histológica.

Para la obtención de las muestras, los animales se sacrificaron en los días post-quemadura previamente mencionados. La eutanasia de los animales se llevó a cabo con sobredosis de isoflurano para minimizar sufrimiento y reducir daños en el tejido cicatrizal. Posteriormente se llevó a cabo la disección de la piel, correspondiente a 0.5 mm de piel aledaña a la quemadura y a el área total de la zona quemada por el cautín. La piel se fijó en tubos falcón de 15 mL con 5 mL de fijador Safefix (Fijador de tejidos, Fisher Scientific, E.E.U.U.).

Una vez fijadas, las muestras de tejido fueron procesadas para inclusión en parafina de la siguiente manera: utilizando cassette de inclusión con medidas de 1.5 x 2.1 cm (Simport, Canadá), las secciones tomadas de las muestras fueron deshidratadas en alcoholes al 50, 70, 85, 95, 100% por un tiempo de 30 minutos en cada uno, en solución alcohol/xilol 1:1 por 15 minutos y en xilol al 100% durante 10 minutos, a continuación en xilol/parafina a 60°C en estufa (Horno de secado, Luzeren, China) por 30 minutos y por último en parafina por 12 horas, para finalmente ser incluidas en parafina para cortes histológicos de 3 micras de espesor. Dichos cortes se realizaron usando un micrótopo (micrótopo de rotación RM2125 RT, Leica microsystems, Alemania) y fueron montados en laminillas electro cargadas.

12.3 Tinción con Hematoxilina y Eosina

Fundamento: Esta tinción ayuda a identificar diferentes tipos de tejidos por medio de colores contrastantes, ya que permite visualizar fácilmente los componentes celulares, los cambios morfológicos y brinda información sobre el patrón (distribución), forma y estructura de las células en el tejido (Feldman & Wolfe, 2014). La hematoxilina es un colorante básico que tiñe de violeta azulado los ribosomas y la cromatina, mientras que la eosina es un colorante ácido que tiñe de rosa anaranjado el citoplasma, la pared celular, el colágeno y el tejido conjuntivo principalmente.

Para llevar a cabo esta tinción, las laminillas fueron previamente desparafinadas, para ello se colocaron en un horno (Horno de secado, Luzeren, China) por 10 minutos a 60°C, después se incubaron durante 10 minutos en xilol a la misma temperatura. Posteriormente los tejidos fueron rehidratados colocándose secuencialmente en alcoholes al 100, 95, 85, 70, 50% y finalmente en agua destilada por tiempos de 5 minutos cada uno. Tras este último paso, los tejidos se tiñeron con hematoxilina de Harris (Hycel, México) durante 8 minutos y se procedió a virar el color con solución saturada de carbonato de litio, para después contra teñir con eosina al 1% por un tiempo de 30 segundos y retirando el exceso con agua destilada hasta verificar que el corte no tenga exceso de colorante. Finalmente, las muestras fueron montadas utilizando medio de montaje (Entellan, Merck, Alemania) cubiertas con un cubreobjetos (González, 2018).

12.4 Tinción Tricrómica de Masson

Fundamento: Las coloraciones tricrómicas permiten visualizar de forma selectiva fibras musculares, fibras de colágena, fibrina y eritrocitos por el empleo combinado de tres soluciones colorantes diferentes. La colágena se observa en color verde azulado, el músculo en rojo o marrón, el citoplasma en rosado y los núcleos en negro (Van De Vlekkert et al., 2020).

Las muestras fijadas en Safefix, se desparafinaron previamente colocando las muestras en el horno (Horno de secado, Luzeren, China) por 10 min a 60°C, para después colocar los cortes en xilol (1) durante 5 minutos y xilol (2) por 2 minutos,

posteriormente se llevó a cabo la rehidratación colocando las muestras en 2 tipos de alcohol al 100% y alcohol al 96% durante 2 minutos y finalmente en agua destilada por un tiempo de 5 minutos. Se procedió a incubar las muestras 12 horas a temperatura ambiente en fijador de Bouin y una vez transcurrido el tiempo las muestras se lavaron con agua destilada hasta diluir el color amarillo, después fueron incubadas en hematoxilina férrica de Weigert por 10 min, lavándose posteriormente con agua corriente hasta eliminar el colorante. Posteriormente las muestras se incubaron con fucsina ácida/escarlata de Biebrich durante 15 min para después ser lavadas con agua destilada; después se colocaron 10 min en ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico y posteriormente se retiró el exceso de colorante con lavados con agua destilada. Posteriormente, las muestras fueron incubadas 10 min en azul de anilina al 2%, seguido de un lavado con agua destilada y diferenciando con solución de ácido acético al 1% en agua destilada de 3 a 5 min. Finalmente se deshidrataron las muestras con los alcoholes al 96%, 100% y xilol por 2 minutos cada uno y se montaron con medio de montaje (Entellan, Merck, Alemania) cubiertas con un cubreobjetos (González, 2018).

12.5 Preparación de los reactivos utilizados

Fijador de Bouin

A 750 mL de una disolución saturada de ácido pícrico acuoso añadir 250 mL de formalina (37%-40%) y 50 mL de ácido acético glacial.

Hematoxilina de Hierro de Weigert:

- Solución 1
- 1g de hematoxilina en 100 mL de etanol al 95%.
- Solución 2
- 4 mL de cloruro férrico al 29%, 95 mL de agua destilada y 1 mL de HCl concentrado.
- Mezclar en partes iguales la solución 1 y 2.

Fucsina ácida- Escarlata de Biebrich:

- Escarlata de Biebrich 1% en agua 90 mL.
- Fucsina ácida 10 mL.
- Ácido acético glacial 1 mL.

Ácido fosfotúngstico- fosfomolibdico.

- Ácido fosfomolibdico 5 g.
- Ácido fosfotúngstico 5 g.
- Agua destilada 200 mL.

Azul de anilina

- Azul de anilina 2.5 g.
- Ácido acético glacial 2 mL.
- Agua destilada 100 mL.

Para el análisis histomorfológico, se tomaron fotomicrografías de los tejidos teñidos, estas se obtuvieron como el producto de 8 imágenes secuenciales capturadas a través de un objetivo 10X en un microscopio Imager Z.1 Carl Zeiss. Las imágenes fueron integradas con la aplicación “Tiles” del software Zen Blue 3.0.

12.6 Definición y obtención del “borde de la quemadura”.

El “borde de la quemadura” se delimitó considerando las zonas de Jackson definidas en los análisis histológicos como 2 mm de la zona hiperémica y 2 mm de la zona de estasis. Previamente a la disección del tejido, la eutanasia de los animales se realizó mediante sobredosis con isofluorano. Posteriormente se disectó toda la piel dorsal con ayuda de bisturí y tijeras, el tejido disectado se mantuvo hidratado con PBS 1X frío y se extendió en una gasa estéril para remover el panículo carnoso y grasa excedente con ayuda de un bisturí pequeño, evitando causar daño o crear cortes en el tejido. Después, el borde de la quemadura se obtuvo con ayuda de dos sacabocados con diámetros de 20 y 18 mm (los diámetros varían según el día y la contracción de la herida en cada animal) obteniendo una circunferencia de 40 mm de grosor. Los tejidos disectados se colectaron en tubos falcon rotulados para su posterior procesamiento. El “borde de la quemadura” es el área que se utilizará para el análisis futuro por scRNAseq.

12.7 Obtención de suspensiones celulares de muestras de piel sana y del borde de la quemadura.

Inmediatamente después de la disección de los tejidos (piel sana y borde de la quemadura a 3, 7 y 14 días post-quemadura), éstos se incubaron con dispasa II (Sigma Aldrich, E.E.U.U.) durante 90 minutos a 37°C para retirar mecánicamente la epidermis con ayuda de unos fórceps estériles. La epidermis se mantuvo en dispasa II a 37°C, mientras que la dermis se incubó en una mezcla de dispasa II, colagenasa I (Sigma Aldrich) y liberasa DH (Sigma Aldrich) durante 90 minutos más a 37°C (Figura 11). Los mecanismos de acción de cada enzima se muestran en la Figura 11. 10 min previos al término de incubación de la dermis, se adicionó tripsina a la epidermis y se incubó a 37°C. Pasado el tiempo de incubación requerido, tanto la epidermis como la dermis se mezclaron en una proporción 1:2 y se disociaron mecánicamente utilizando el sistema de homogeneización “gentleMACS Dissociator” (MiltenyiBiotec, Alemania). Los agregados celulares y el tejido no-homogenizado se removieron utilizando los filtros MACS SmartStrainers (MiltenyiBiotec) y las células aisladas se almacenaron en suspensión de PBS 1X con 0.04% de albúmina ultrapura. La viabilidad celular se cuantificó con azul tripano en un contador semi automatizado (Corning, E.E.U.U.) (Figura 11).

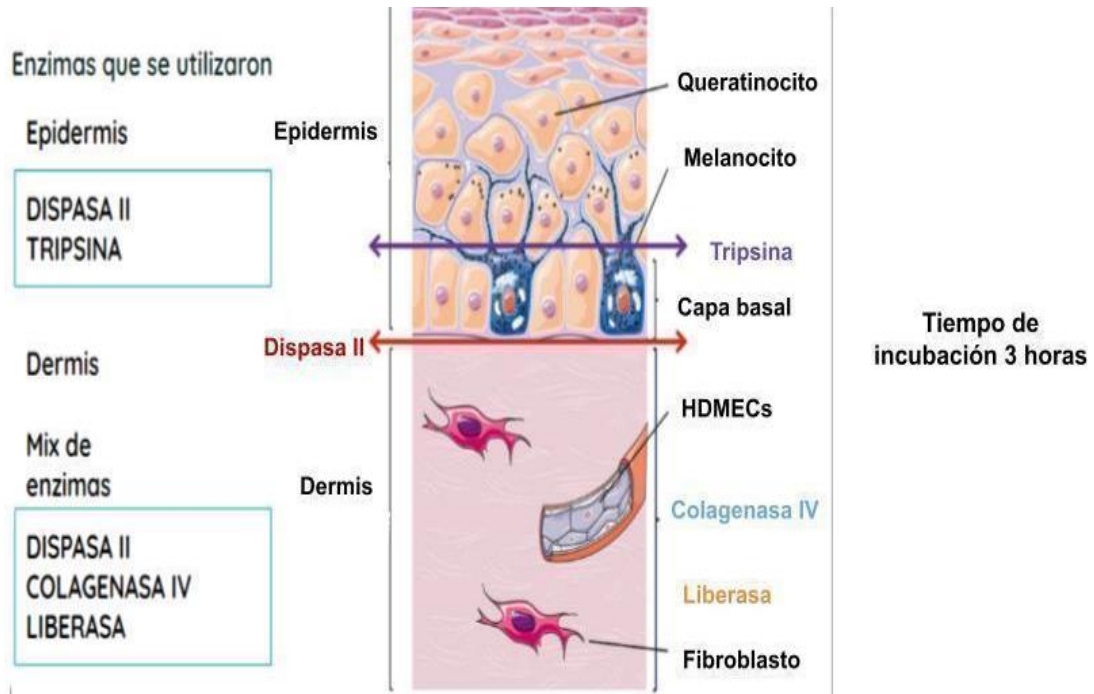


Figura 11. Enzimas utilizadas para la digestión de la piel. Se esquematizan las capas de la piel y los principales tipos celulares de cada una, así como las enzimas que se utilizaron para la digestión del tejido. Las flechas de colores muestran en qué zonas de la piel se ejerce cada actividad enzimática. Tomado y modificado de (Henrot et al., 2020).

RESULTADOS

Generación del modelo de quemadura de segundo grado profundo.

En el presente trabajo se utilizó la metodología previamente estandarizada en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, para generar un modelo murino de quemadura. Este modelo se utiliza para estudiar los diferentes aspectos del proceso cicatrizal de este tipo de lesión, la figura 12 A muestra la región corporal (dorso lateral derecha) donde se realizó la quemadura, que se observa perfectamente delimitada inmediatamente después de que se realiza el procedimiento. Además, se llevó a cabo el análisis histológico mediante la tinción con hematoxilina / eosina (H & E), del tejido quemado y de los bordes de la herida. En la figura 12 B se observa que la quemadura que se generó en el modelo murino corresponde a una quemadura de segundo grado profundo, ya que se observa daño total en la epidermis (III), por contacto con la placa metálica caliente y daño en la dermis papilar y reticular, en donde se observa desnaturalización de las fibras de colágena y demás proteínas de la matriz extracelular (IV). En (I) se observa el tejido que no tuvo contacto directo con la placa caliente, en donde no se pierde la continuidad de la piel y los folículos pilosos conservan su estructura (Figura 12).

A.



B.

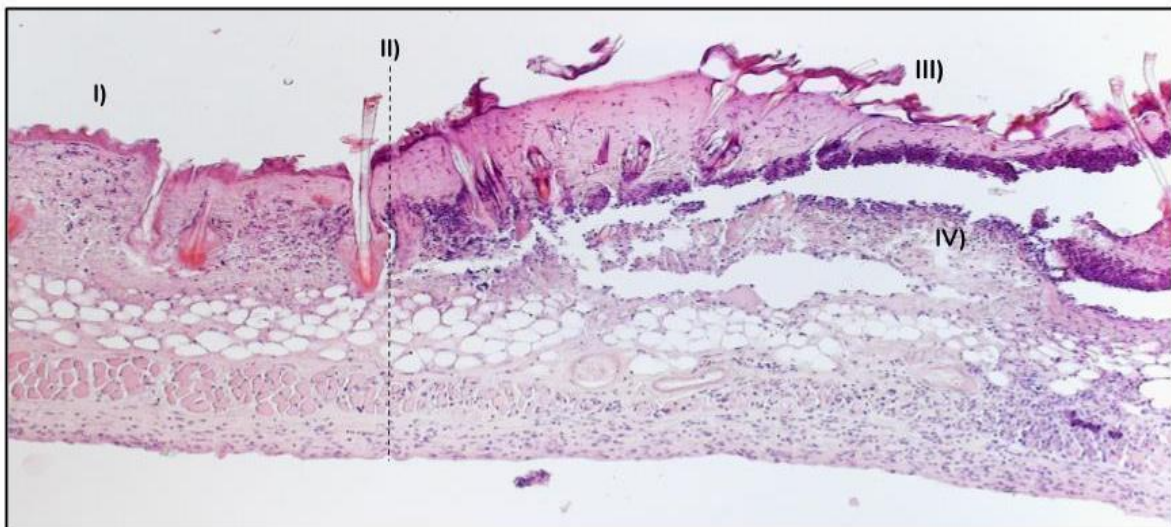


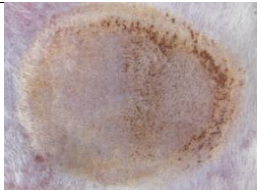

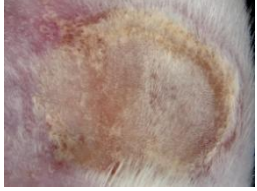





Figura 12. Establecimiento del modelo murino de quemadura de segundo grado profundo. A) Vista del modelo murino y B) la tinción con hematoxilina y eosina de secciones de piel de ratón quemada que muestra el grado de daño a 1 día post-quemadura. (I). Piel aledaña, II). Región de frontera entre la piel sana y la piel quemada, III). Región de piel quemada, IV). Región dermal.

Como parte del proceso del establecimiento del modelo murino de quemadura, los animales se monitorearon durante 21 días para tener parámetros semi cuantitativos del dolor que registran los animales después del procedimiento. Para ello, se utilizó como referencia la escala del dolor propuesta por Langford Dale J., en el año 2010, en donde se evalúan 5 rasgos faciales característicos que exhiben los comportamientos asociados al dolor (Langford et al., 2010). En el Anexo 1 se muestran las fotografías correspondientes a cada parámetro y se puede observar que a través de los valores asignados por los codificadores: el valor de 0 (representa dolor ausente), 1 (representa dolor moderadamente visible) o 2 (grave) (Langford et al., 2010), los ratones presentan dolor moderadamente visible a 1 y 3 dpq que se denota principalmente en las características de la nariz y las mejillas. Después de esta etapa aguda de recuperación los animales se muestran activos, sin pérdida de peso e hidratados como se registró previamente en el laboratorio (González, 2018).

Durante el tiempo de estudio se llevó a cabo un registro de evidencia fotográfica de la evolución de la quemadura, para ello se realizaron observaciones morfológicas y análisis histológicos de la piel quemada para evaluar cambios histopatológicos que ocurren a lo largo del proceso de reparación y cicatrización. En la Figura 13, se observa que morfológicamente al día 1 pq la superficie de la lesión está muy bien delimitada por el contacto con la placa caliente. En el día 3 pq, la lesión presentó formación de escara en los bordes superiores y es de color café claro. El progreso de la lesión permaneció sin alteraciones notables al día 5 pq; sin embargo, los bordes de la escara comenzaron a desprenderse. Para el día 7 pq se observa que

hay mayor proporción de escara desprendida con presencia de zonas cruentas y la escara presenta apariencia compacta. En el día 9 pq, se puede percibir un incremento de zonas cruentas, la escara tiene aspecto grueso y una coloración rojiza. En los días 14 y 16 pq se observa de manera muy notable la contracción de la herida y la reducción en el área cruenta. Finalmente, en el día 21 pq se logra observar una herida contraída desde el centro de la cicatriz y con apariencia de piel fina (Figura 13).

| Día post-quemadura | Morfología de la lesión | Día post-quemadura | Morfología de la lesión |
|-------------------------|---|--------------------|---|
| 0 (Tejido sano control) |  | 9 |  |
| 1 |  | 14 |  |
| 3 |  | 16 |  |
| 5 |  | 21 |  |

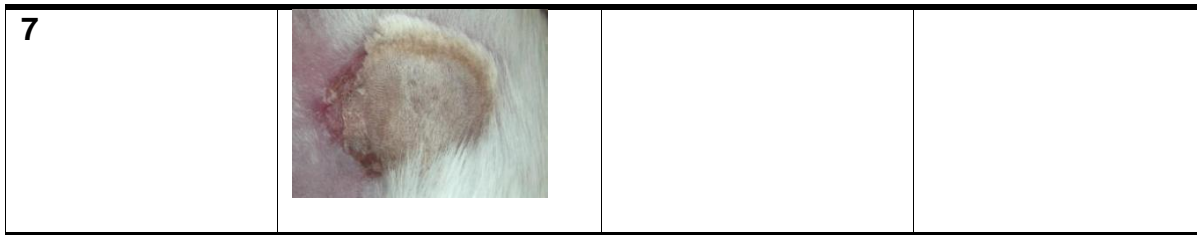


Figura 13. Curso temporal del proceso de cicatrización de una quemadura profunda de segundo grado en ratón. Las microfotografías de la piel quemada fueron tomadas a diferentes tiempos durante el proceso de cicatrización.

Caracterización histomorfológica de muestras de piel después de 1, 3, 5, 7, 9, 14,16, y 21 días de la quemadura.

Así como se llevó a cabo la evaluación y seguimiento morfológico del proceso de cicatrización de la quemadura profunda de segundo grado, se realizó la evaluación histomorfológica utilizando la tinción de Hematoxilina y Eosina (H & E) y la tinción tricrómica de Masson en las muestras de piel disectadas de la zona de la quemadura, el tejido aledaño y el tejido sano. Estas tinciones resultan útiles ya que ponen de manifiesto los cambios de estructura y el reclutamiento celular en diferentes tiempos de estudio. La tinción H & E es una tinción clave que nos permite mejorar la visualización de los hallazgos y cambios histológicos dependientes de la inflamación en el proceso de cicatrización de quemaduras. Por su parte, la tinción tricrómica de Masson permite evidenciar los cambios que ocurren en el proceso de cicatrización a diferentes días con respecto al empaquetamiento y la distribución de las fibras de colágena.

Con este análisis temporal identificamos tres tiempos claves para el estudio del proceso cicatrizal (Figuras 14 y 15). Primero, el tiempo 3 dpq (Figuras 14 y 15 B) en donde se aprecia zona de daño directo por quemadura de espesor total con longitud de 10.71 mm; 40.5% menor que la longitud de la quemadura original (18 mm). Inmediatamente después y hacia ambos lados se observan regiones con daño en gradiente, de más a menos, alcanzando la piel normal después de los 2 mm. En la zona de la quemadura directa (zona de contacto con la placa caliente) es evidente que todas las proteínas de la dermis se encuentran coaguladas, la zona central se observa necrosis coagulativa del tejido conjuntivo de la dermis subyacente, aunque se observan reminiscencias de anexos cutáneos (folículos pilosos y sus glándulas sebáceas). Por debajo del daño se aprecia infiltrado celular abundante y particularmente en la zona de transición de la piel aledaña a la quemadura y la piel quemada (ver Figura 16), además es posible observar que el infiltrado celular muestra una tendencia de incremento en comparación con el día 1 pq (Figuras 14 y 15 A). Los extremos sin daño correspondientes a la piel normal se observan con la arquitectura típica del tejido.

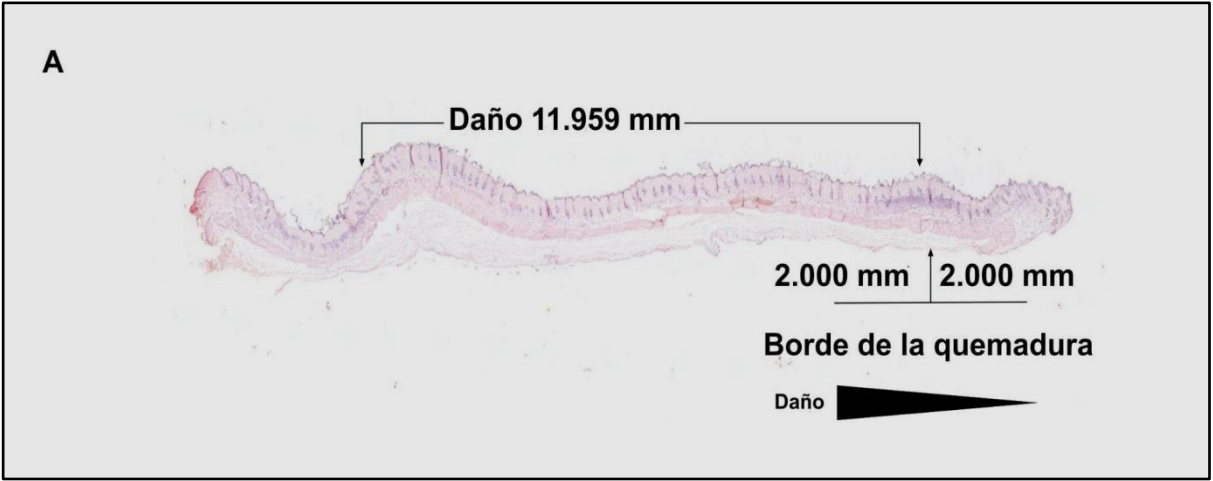
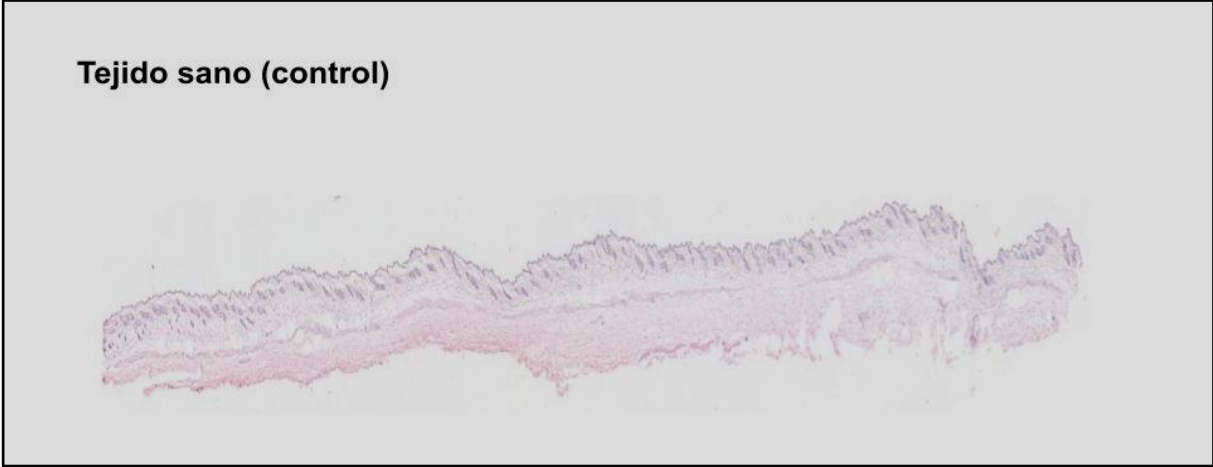
Segundo, el tiempo 7 dpq (Figuras 14 y 15 D) que mantiene en promedio (dependiendo de la contracción de la piel en cada animal) las mismas dimensiones longitudinales que los días 3 y 5 pq, con una reducción promedio de 34.72% respecto a la longitud de la quemadura original que se realizó. Sin embargo, se observa que el grosor de la herida es del doble que en los días anteriores. A este tiempo, la región central sigue siendo claramente necrótica y ocupa de un 30 a un 35% del área de la quemadura. Las zonas de daño en gradiente que se observaban

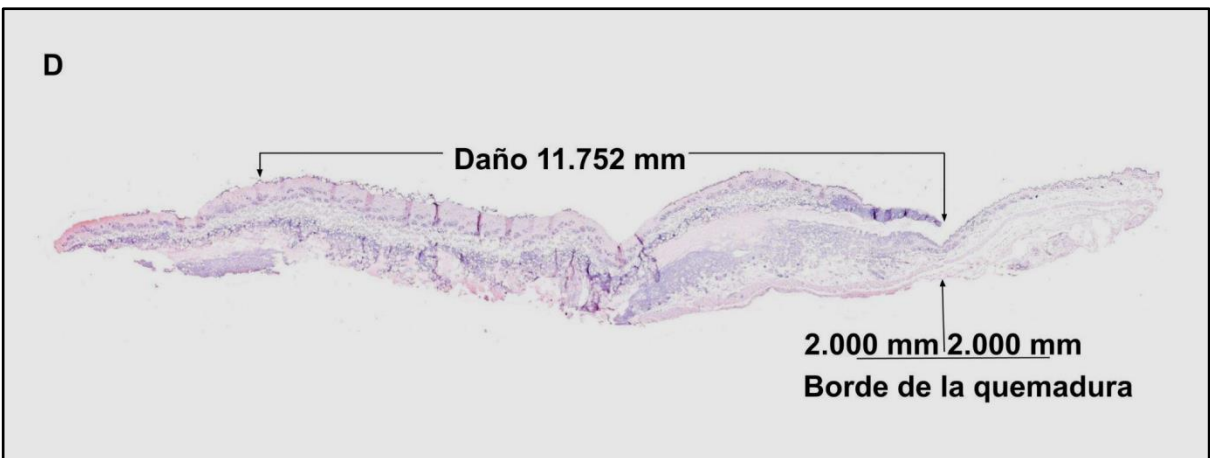
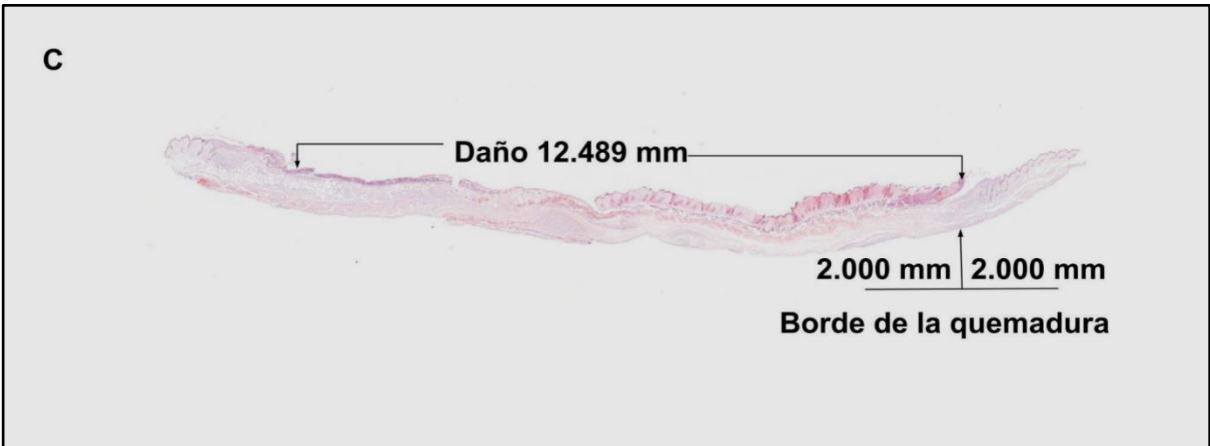
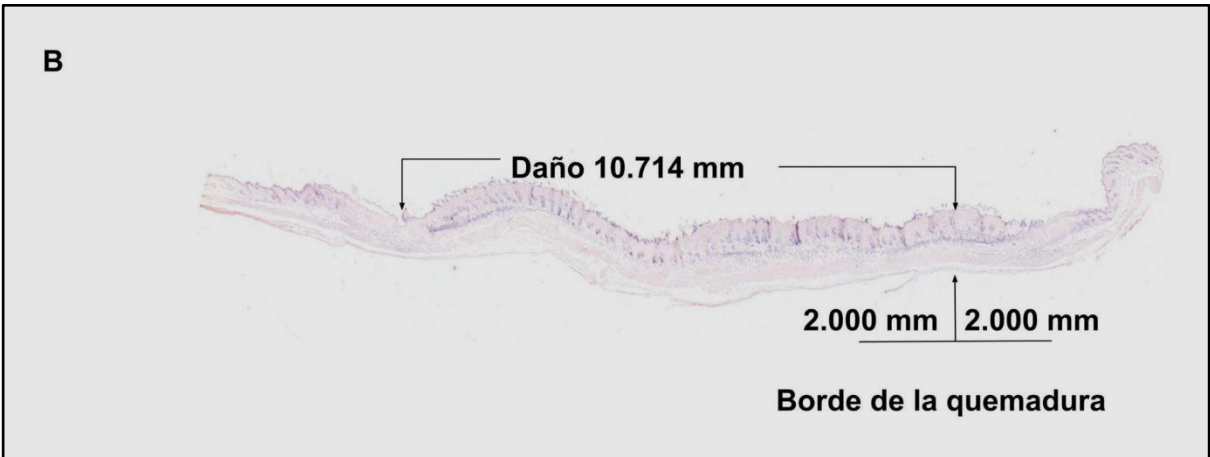
anteriormente ahora lucen con infiltrado celular moderado y son más pequeñas (ver Figura 17). Además, se observa la formación de un epitelio nuevo engrosado en comparación con los días 3 y 5 pq. También la dermis se encuentra en proceso de reparación con extensión de fibras de colágena con forma ondulada y fusiforme, así mismo se nota un incremento de anexos cutáneos. El tejido inmediato posterior al daño directo se observa como piel normal y sin mayor infiltrado celular que el tejido sano.

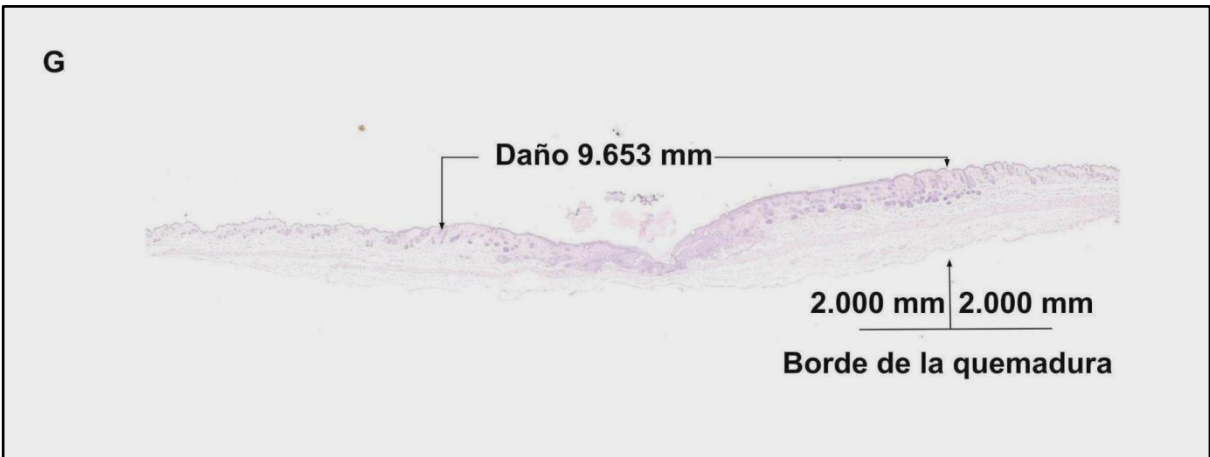
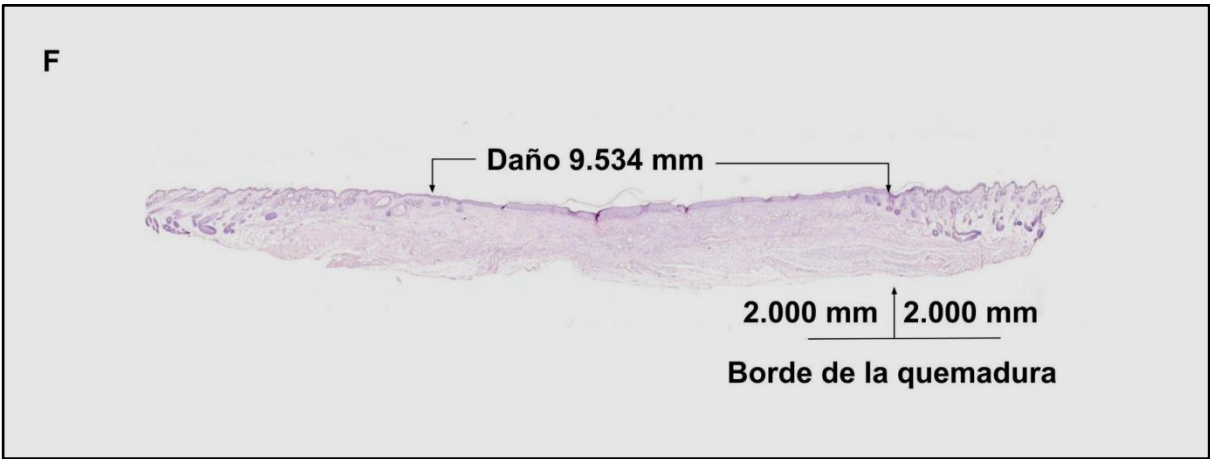
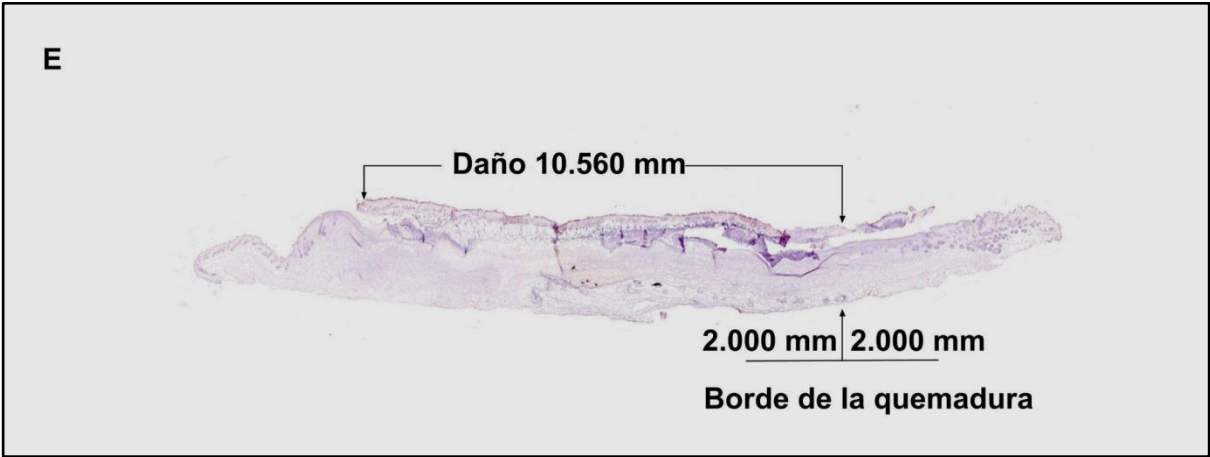
Tercero, el tiempo 14 dpq (Figura 14 F) en donde la longitud promedio del daño causado por la quemadura realizada fue de 9.53 mm; 47.05% menor que la longitud de la quemadura original, lo que evidencia la contracción de la herida que provoca que los bordes se aproximen en un tiempo considerablemente corto. En este tejido ya no se observa con claridad el centro necrótico, lo que sí es evidente es que la lengua epitelial que empezó a crecer en el día 7 pq ahora ha cubierto toda la región dañada, aunque este epitelio aún es inmaduro ya que se observan regiones acantóticas y sin papilas. La dermis está formada predominantemente por fibras de colágena laxas que se observan en mayor proporción que los días anteriores y con infiltrado celular en gradiente del centro del daño hacia los extremos (ver Figura 18). Se aprecian claramente los bordes de la cicatriz y la piel aledaña luce con aspecto normal.

Del día 16 al día 21 pq (Figura 14 G y H), la zona de daño disminuye cerca de un 50% a la longitud original de la quemadura. Se aprecia el adelgazamiento del epitelio en la región de reparación, las fibras de colágeno presentan mejor

disposición en la capa de la dermis y la arquitectura de la piel dañada es muy similar en comparación con los extremos de piel sana.







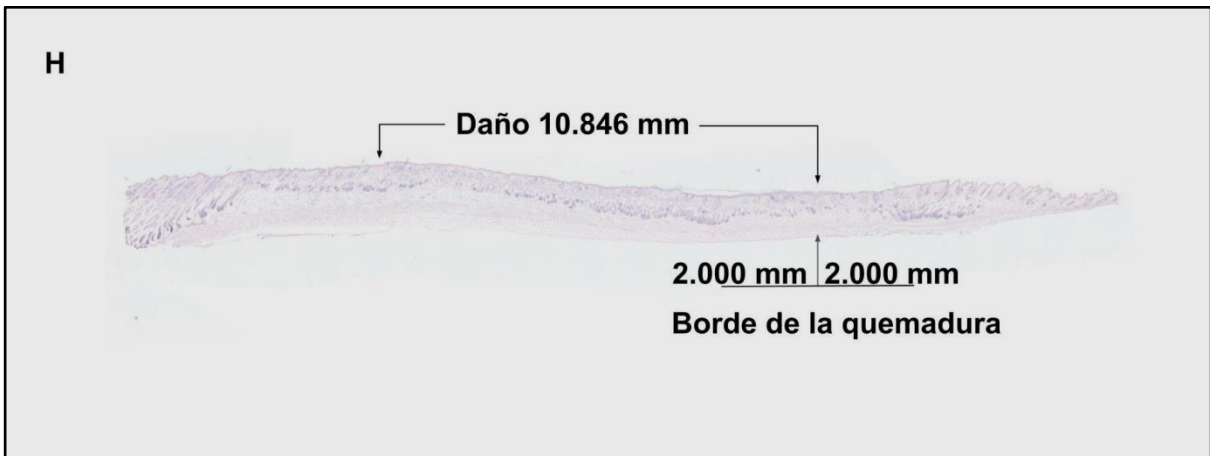
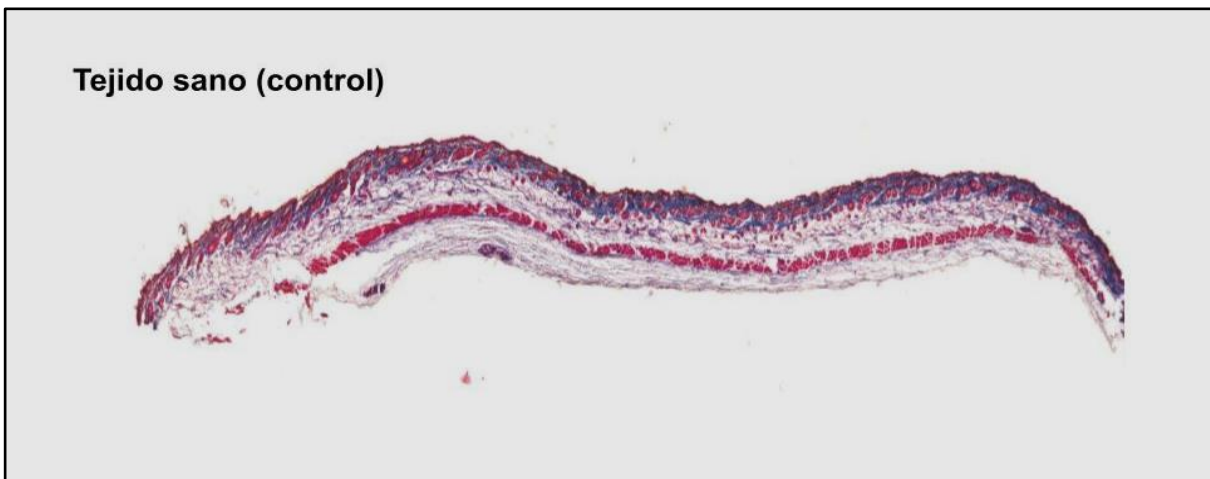
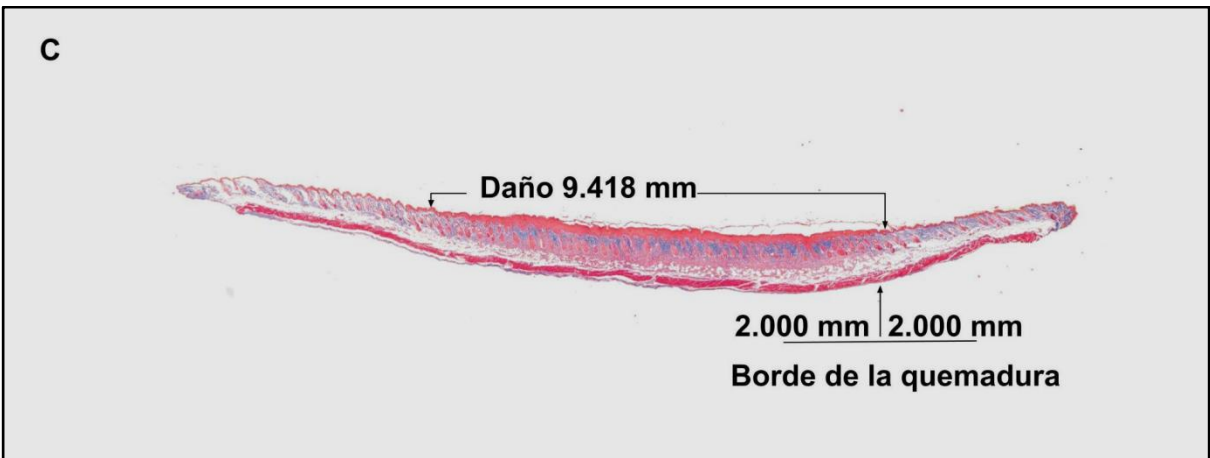
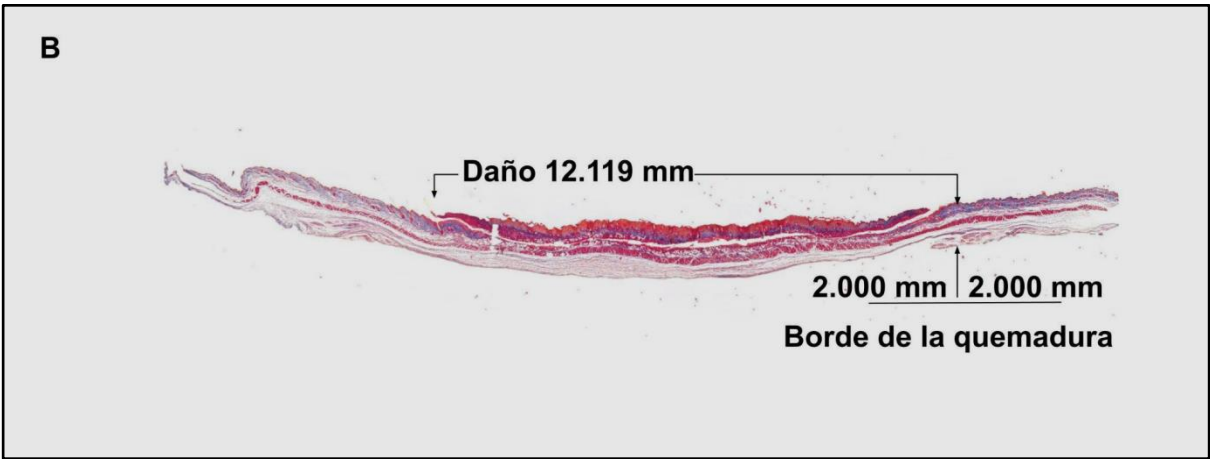
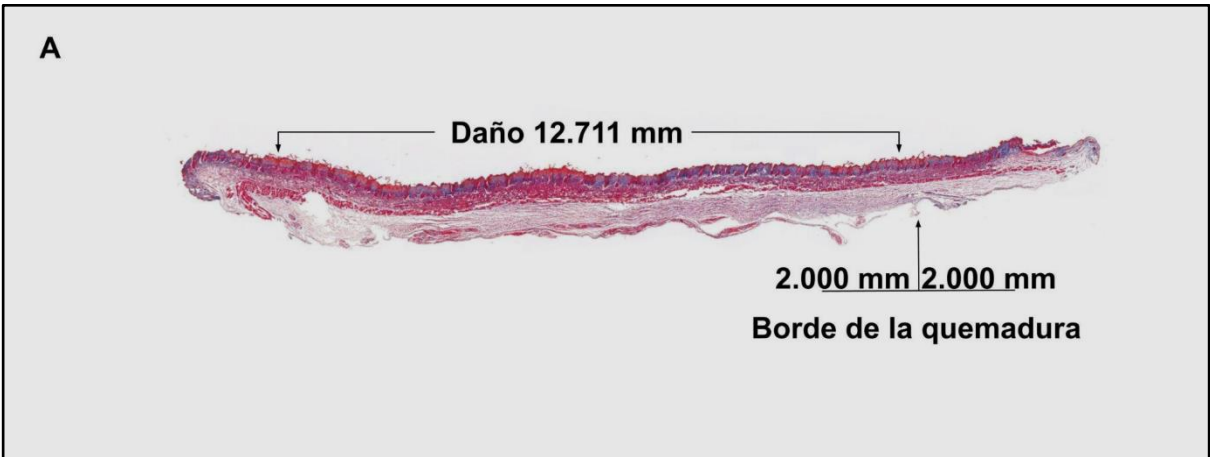
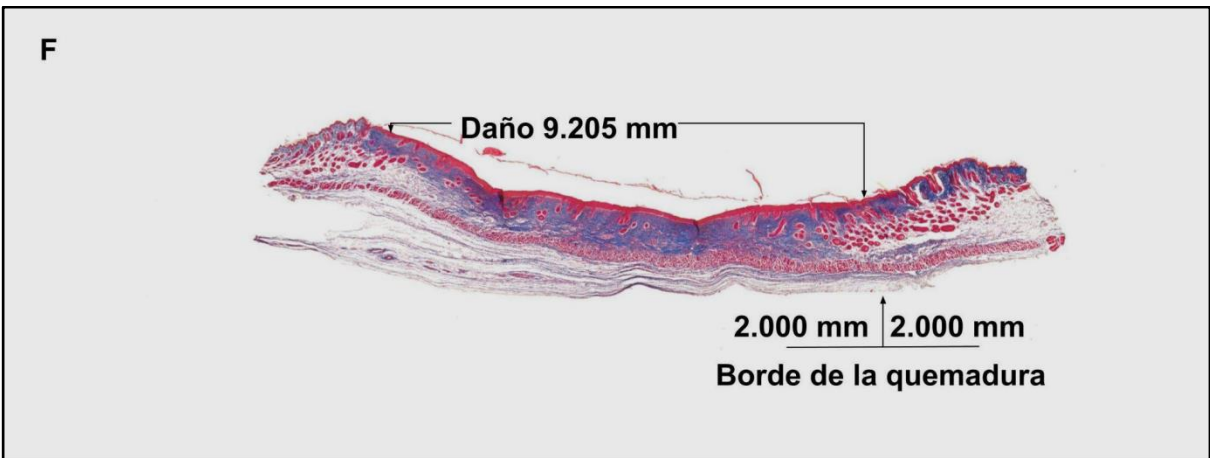
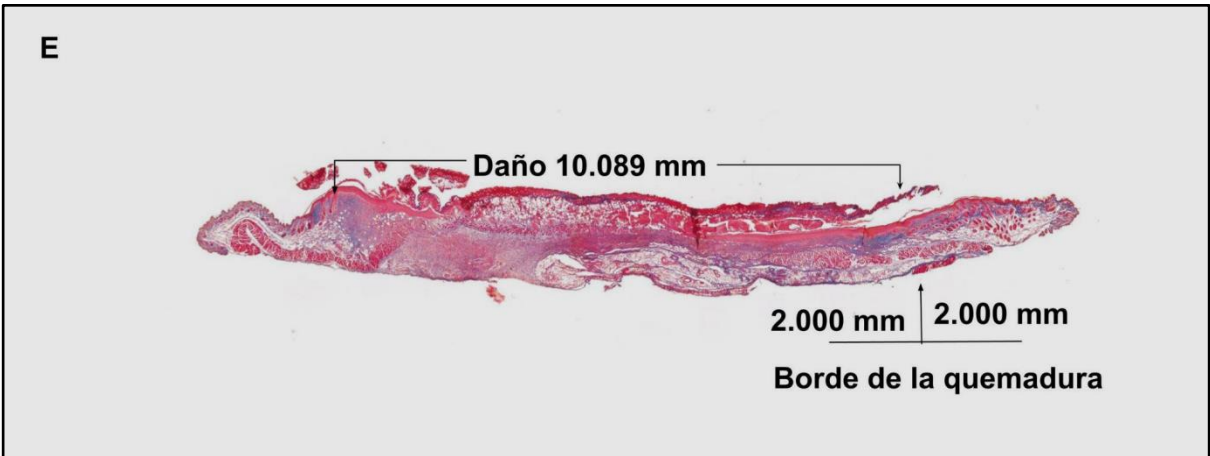
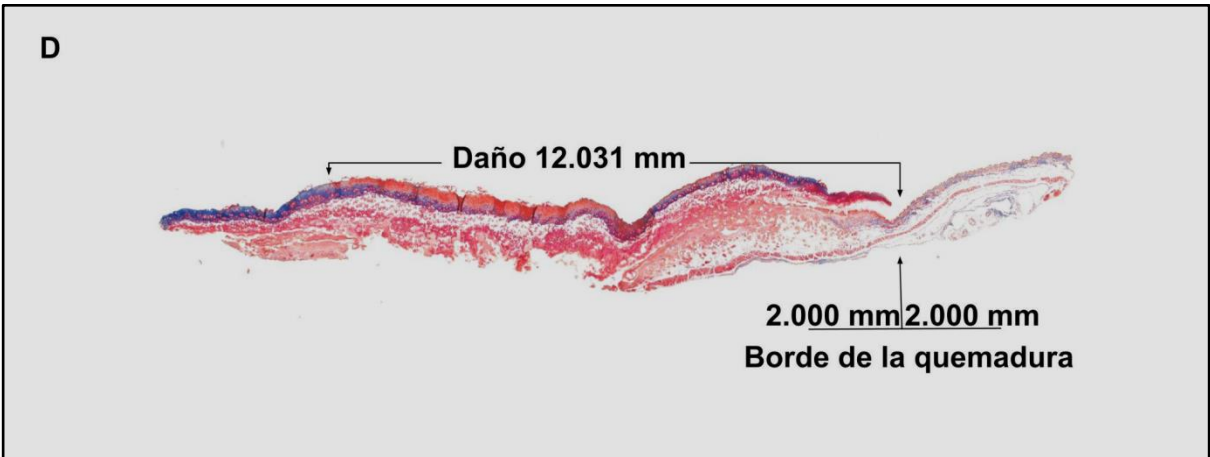


Figura 14. Seguimiento histológico de la quemadura profunda de segundo grado por tinción H&E a diferentes tiempos de evolución post-quemadura (pq). Se muestran imágenes representativas de cortes histológicos obtenidos de la zona lesionada a los días pq; 0 Tejido sano (control), 1 (A), 3 (B), 5 (C), 7 (D), 9 (E), 14 (F), 16 (G) y 21 (H), n = 3 animales por grupo.







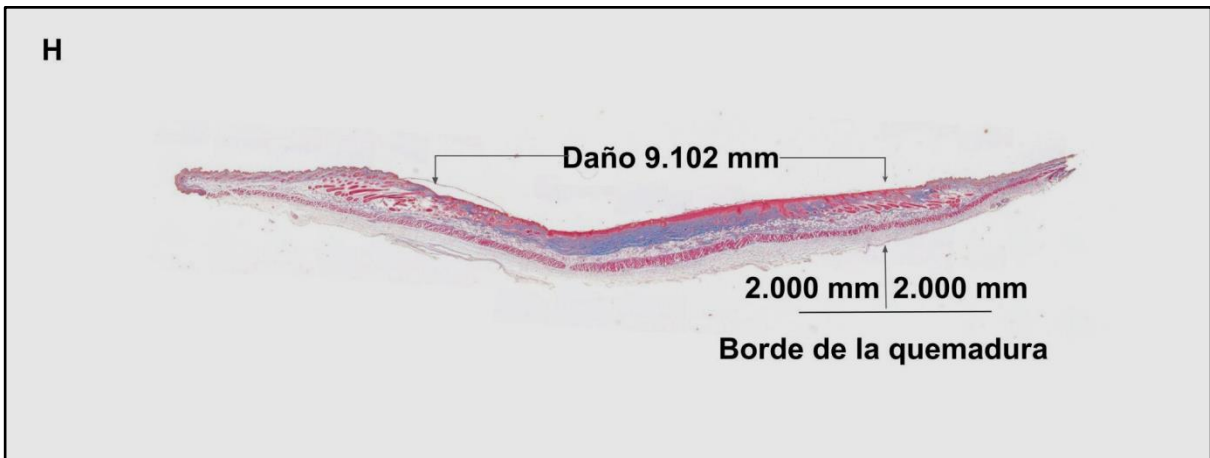
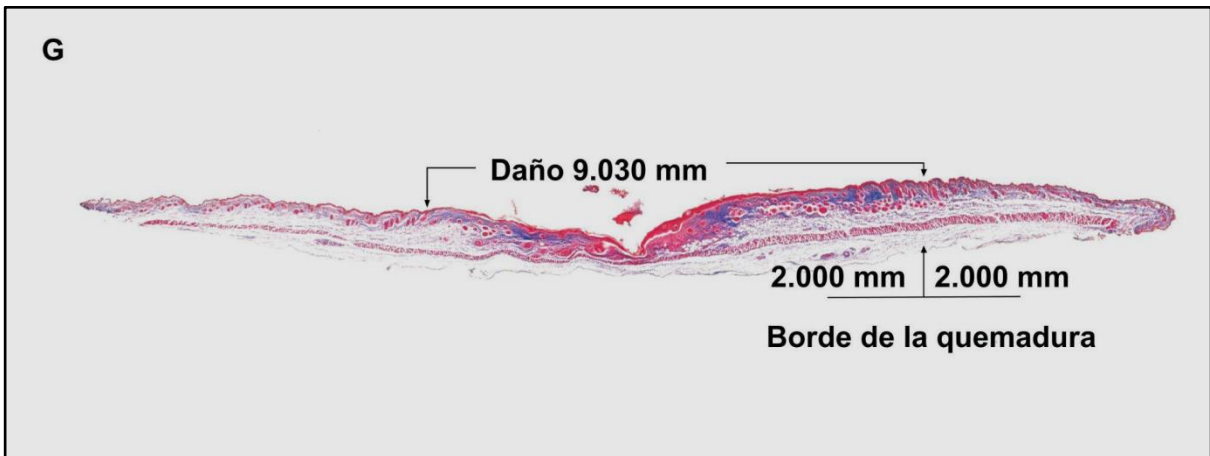


Figura 15. Seguimiento histológico de la quemadura profunda de segundo grado por tinción tricrómica de Masson a diferentes tiempos de evolución post-quemadura (pq). Se muestran imágenes representativas de cortes histológicos obtenidos de la zona lesionada a los días pq; 0 Tejido sano (control), 1 (A), 3 (B), 5 (C), 7 (D), 9 (E), 14 (F), 16 (G) y 21 (H), n = 3 animales por grupo.

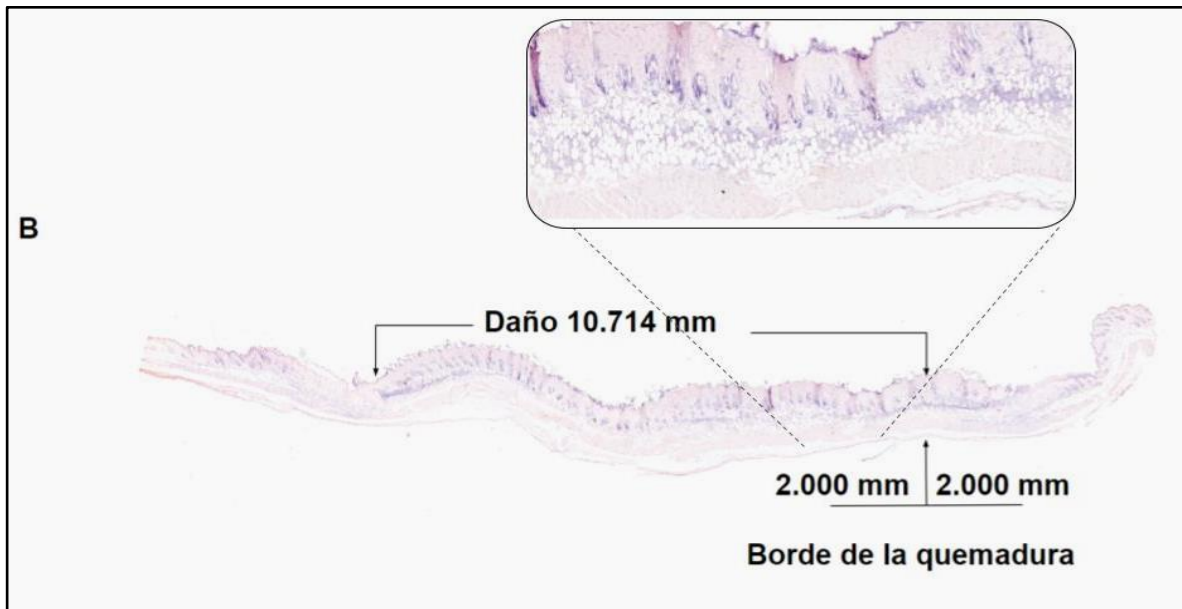


Figura 16. Acercamiento de la figura 14 B = 3dpq. A partir del seguimiento histológico de la quemadura de segundo grado profundo, se realizó una tinción hematoxilina / eosina del día 3 pq, esta imagen a mayor aumento permite visualizar el infiltrado celular incrementado en la etapa de inflamación del proceso cicatrizal de la quemadura.

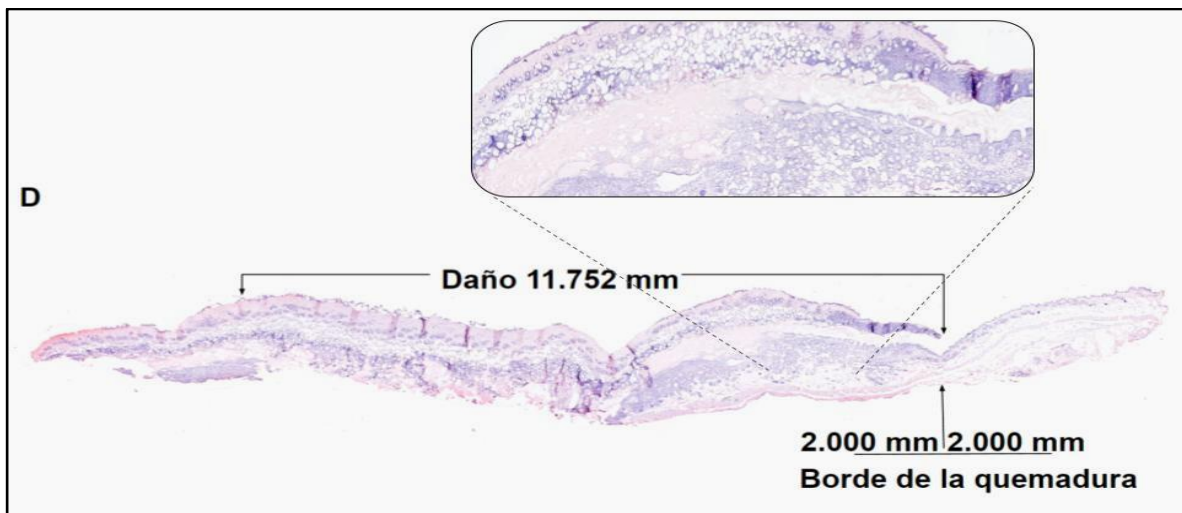


Figura 17. Acercamiento de la figura 14 D = 7dpq. La figura es un acercamiento de la tinción con hematoxilina / eosina del día 7 pq, en esta figura se aprecia el infiltrado inflamatorio moderado,

además es posible observar el aspecto de formación de epitelio nuevo. Este día corresponde a la etapa de reepitelización del proceso de reparación y cicatrización en una quemadura.

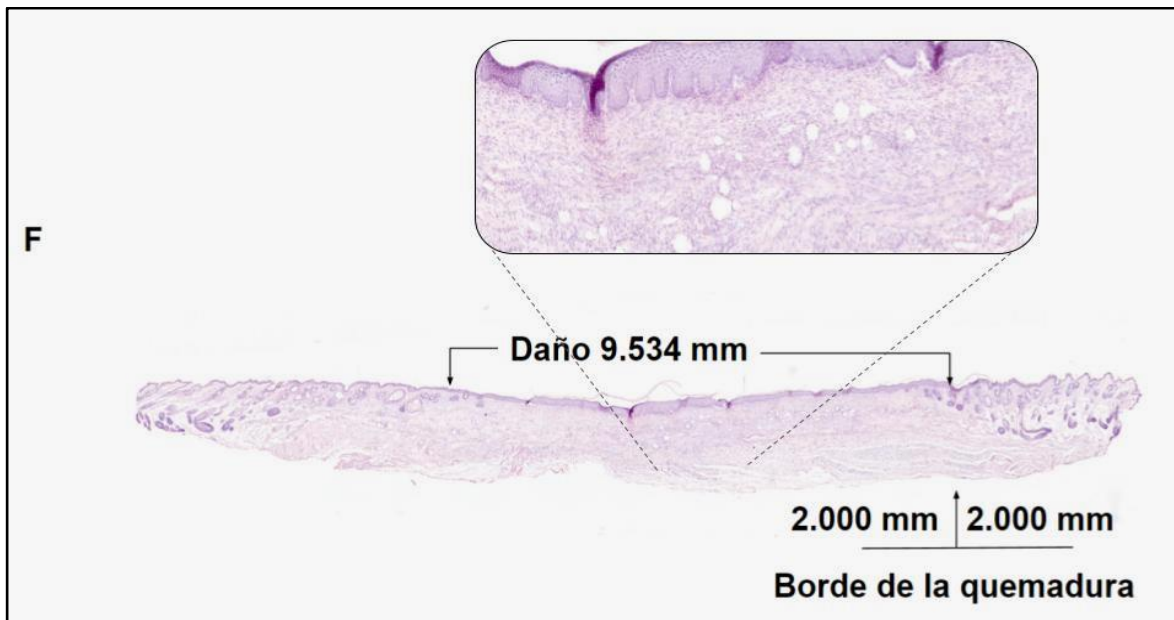


Figura 18. Acercamiento de la figura 14 F = 14dpq. La imagen correspondiente señala un acercamiento de la tinción con hematoxilina / eosina del día 14 pq, donde el infiltrado celular se muestra en gradiente desde el centro de la lesión hacia los extremos, se puede observar además que la piel aledaña a la quemadura tiene un aspecto de tejido sano. Este día corresponde a la etapa de remodelación de la matriz extracelular del proceso cicatrización en una quemadura.

Los resultados de nuestro análisis histomorfológico nos permitió definir los días 3, 7 y 14 pq como los tiempos representativos de las etapas de inflamación, proliferación y remodelación del proceso cicatrizal de las quemaduras generadas en el modelo murino. Asimismo, el “borde de la quemadura” se definió como el área de tejido que se encuentra 2 mm hacia afuera y 2 mm hacia adentro de la frontera visible

generada por el daño térmico, ya que esta zona es en donde ocurre el proceso de reparación del daño.

Definición del área de la quemadura que se utilizará para el análisis de secuenciación de célula única.

Una vez que se definió el “borde de la quemadura” en los cortes histológicos de la piel quemada (como se describió en la sección anterior) era necesario diseñar la estrategia para disectar específicamente esa zona del tejido, como se esquematiza en la Figura 19. Así, delimitamos las zonas de Jackson definidas en los análisis histológicos como 2 mm de zona hiperémica y 2 mm de zona de estasis (Figura 19 y 20).

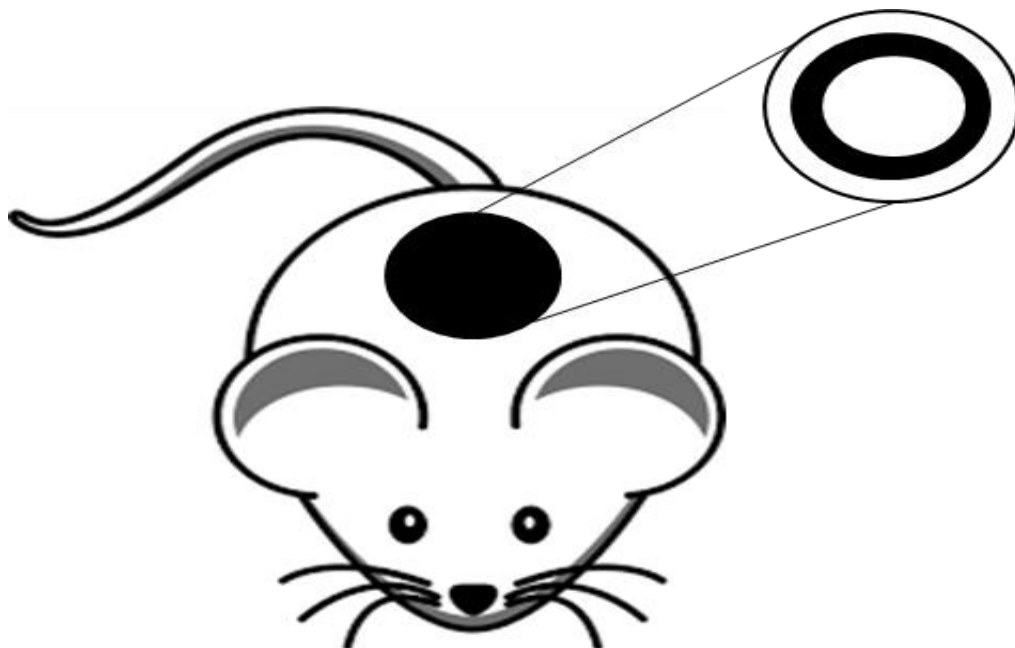


Figura 19. Definición del borde de la quemadura y delimitación de la zona a disectar en el modelo murino.

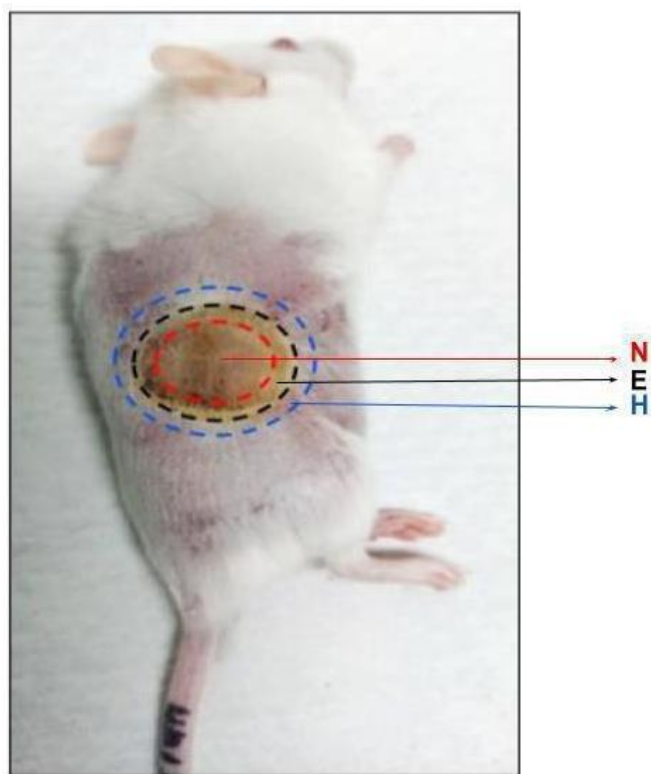


Figura 20. Delimitación y marcaje de zonas de Jackson en el modelo murino; N = zona de necrosis, E = zona de estasis, H = zona de hiperemia.

Una vez marcadas y delimitadas las áreas de interés, se procedió a disectar el tejido dañado con ayuda de un bisturí y tijeras (Figura 21).

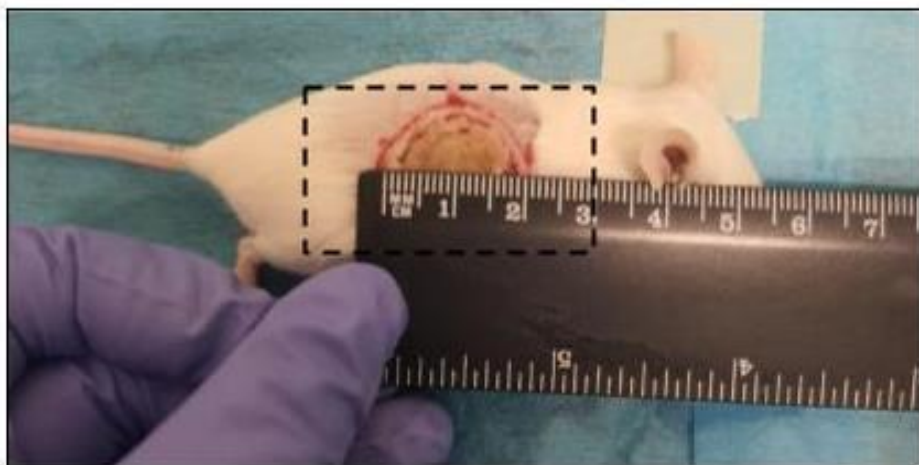


Figura 21. Disección del tejido del modelo murino.

Ya que se tiene la piel disectada, se procedió a mantener el tejido en PBS 1 X frío, para después extenderlo sobre una gasa estéril y remover el panículo carnoso y el exceso de grasa, evitando ocasionar daños al tejido. Posteriormente, se obtuvo el borde de la quemadura con ayuda de 2 sacabocados con diámetros de 20 mm y 18 mm, (cabe mencionar que el diámetro de los sacabocados varía según el día y la contracción que presenta la herida durante el proceso de cicatrización) (Figura 22).



Figura 22. Obtención del borde de la quemadura y zonas de Jackson delimitadas.

Finalmente se obtuvo el área de la quemadura definida de 4 mm de grosor y los tejidos disectados se colectaron en tubos falcon para su posterior procesamiento. (Figura 23).

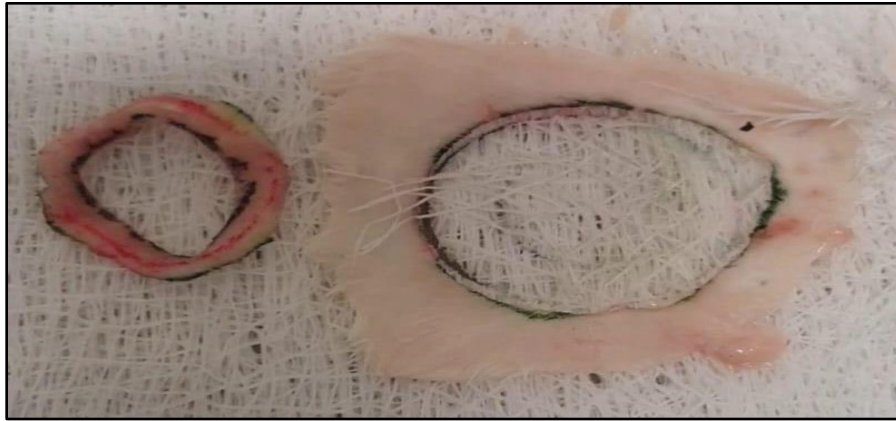


Figura 23. Obtención del área de la quemadura definida como borde de la quemadura.

En la Figura 24 se muestra un corte histológico teñido con H&E, en donde se pueden observar las estructuras del tejido que se analizará por scRNAseq a 3 dpq, se observa claramente la zona de transición y los 2 mm de zona de hiperemia y estasis (Figura 24).

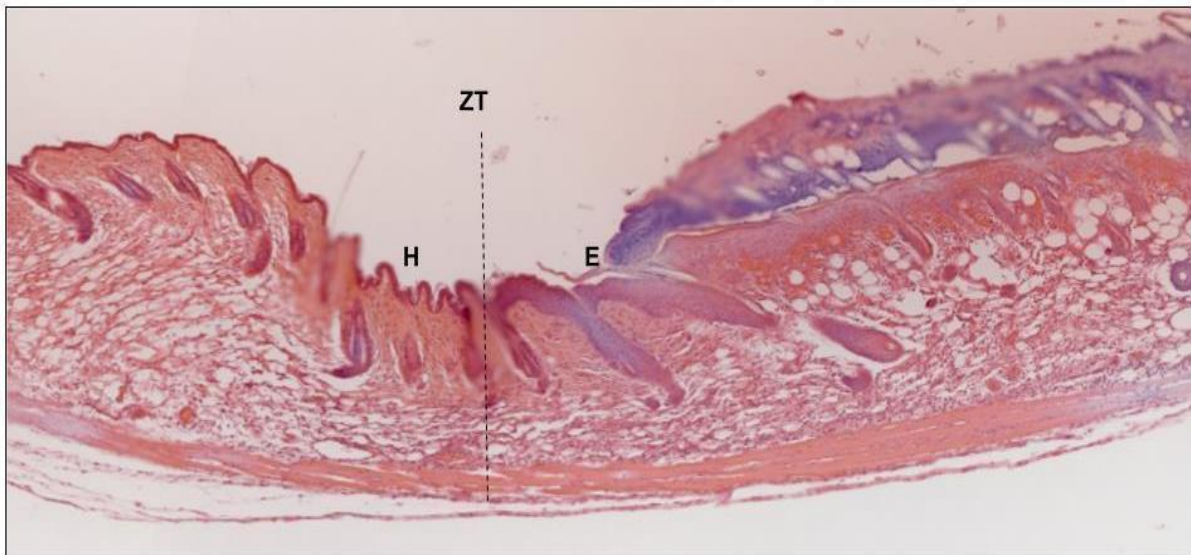


Figura 24. Estructuras del tejido de 3 dpq, con tinción de hematoxilina / eosina, ZT = zona de transición, E = zona de estasis, H = zona de hiperemia.

Obtención de suspensiones celulares para el análisis de secuenciación de célula única.

Una vez que se disectaron los tejidos, se realizó un experimento piloto para obtener suspensiones celulares y conocer la calidad de la muestra. La calidad de la muestra se define en función de la viabilidad celular, el rendimiento celular y la cantidad de detritos o agregados presentes. La metodología de disociación de la piel fue definida según protocolos previamente publicados para análisis de citometría celular, cultivo celular y scRNAseq de células de la dermis (Guerrero et al., 2019). El tipo de enzimas, las concentraciones de cada enzima, las temperaturas y los tiempos de incubación que utilizamos en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo es la que se describe en la sección de metodologías.

En la Figura 25 A y 25 B se presentan los conteos celulares obtenidos en el experimento piloto para las muestras de piel sana (3.2×10^6 células, > 90% viabilidad) y piel quemada (3, 7 y 14 pq) (1×10^7 células, > 90% viabilidad). Dichos conteos son el resultado de la disociación de 3 tejidos provenientes de diferentes ratones, que se mezclan para generar una sola muestra o “pool”. Es importante mencionar que haciendo un seguimiento curso temporal de la viabilidad celular, observamos que ésta se mantiene hasta 45 minutos después de la disociación del tejido en una suspensión de PBS 1 X con 0.04% de albúmina ultrapura. La optimización de este protocolo de disociación será fundamental para realizar en un futuro la secuenciación de célula única (Figura 25).

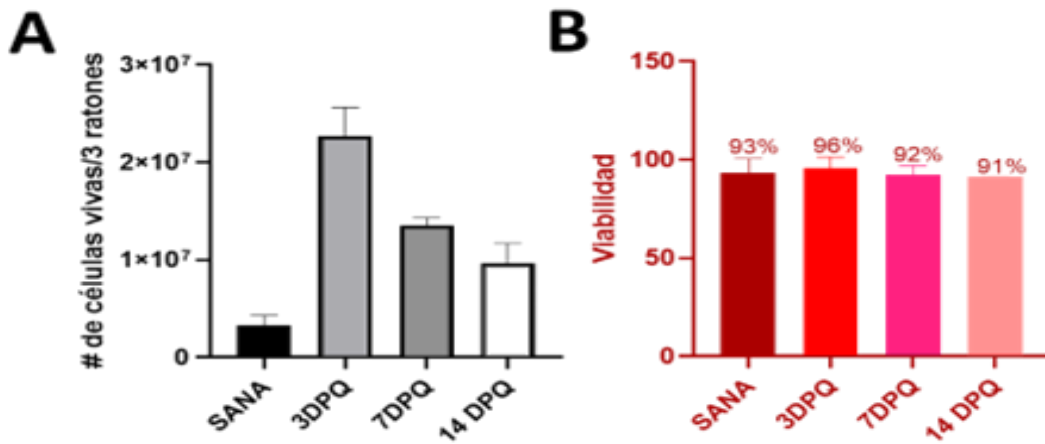


Figura 25. Rendimientos celulares después de la disociación de la epidermis y la dermis de ratón.

A) Conteo de células obtenidas de piel de ratón sana y quemada a los 3, 7 y 14 días post-quemadura (dpq). B) Viabilidad de células obtenidas de ratón sana y quemada (3, 7 y 14 dpq) utilizando azul tripano.

DISCUSIÓN

Afortunadamente, como resultado de las campañas de prevención, se ha disminuido considerablemente la incidencia provocada por las quemaduras y a su vez se ha implementado la búsqueda de nuevos métodos para lograr la reparación del tejido con mayor rapidez y calidad en el proceso de cicatrización. Sin embargo, aunque el tratamiento de quemaduras graves ha progresado de manera importante, este tipo de lesiones siguen representando un reto y un problema de salud, debido al lento proceso de cicatrización y las dificultades que presentan los pacientes que sufren este tipo de problemas. Se sabe además que las quemaduras graves provocan múltiples complicaciones metabólicas que contribuyen al incremento de morbilidad y fallo multiorgánico. Es por eso por lo que son de suma importancia los estudios que tienen como objetivo buscar nuevas estrategias terapéuticas para acelerar y mejorar el proceso de cicatrización (Tejiram et al., 2019; Barrett et al., 2019; Wang et al., 2018).

Tal es el caso de Blaise y colaboradores que en el año 2020 llevaron a cabo un estudio piloto utilizando un modelo murino, el cual se basó en utilizar injertos alogénicos para el tratamiento de una quemadura grave, los resultados obtenidos fueron satisfactorios y representaron un estudio novedoso que en el futuro pueden trasladarse a otros modelos de estudio y tener un alto potencial para su aplicación clínica (Blaise et al., 2020).

Este trabajo representa la fase inicial de un proyecto que busca estudiar los perfiles transcriptómicos de las poblaciones celulares que participan en las diferentes etapas del proceso cicatrizal de una quemadura grave. Para ello fue necesario reproducir un modelo murino de quemadura profunda de segundo grado previamente estandarizado. Este modelo es útil porque nos permite evaluar *in vivo* la velocidad y la calidad de reparación del daño, y obtener células vivas que después pueden caracterizarse a nivel transcriptómico, como se ha realizado en otros estudios que utilizan heridas escisionales largas para analizar características específicas del proceso de cicatrización como son el potencial regenerador de ciertas poblaciones de fibroblastos, los patrones de migración de los queratinocitos en la fase de reepitelización, o el comportamiento de las poblaciones de células troncales que dirigen la reparación del daño (Guerrero et al., 2019; Abbasi et al., 2020; Joost et al., 2018).

Las características del daño generado por la quemadura en nuestro modelo, se evidenció por medio del análisis histomorfológico mediante las tinciones de hematoxilina/ eosina y la tinción tricrómica de Masson, a partir de los resultados obtenidos nos pudimos percatar que la quemadura correspondió a las características de una lesión de segundo grado profundo que han sido observadas por otros grupos de investigación. Por ejemplo, Zhang y colaboradores en 2014 generaron un modelo de quemadura en la cepa de ratones machos Balb/c, los cuales fueron tratados con vapor caliente durante 4 segundos, en el estudio se muestra un seguimiento histológico de las secciones de heridas y a través de las

tinciones realizadas se observó que las capas de la piel (epidermis y dermis) se encontraban dañadas, además de la desnaturalización de las fibras de colágena y las proteínas de la matriz extracelular, lo cual es un indicativo de que la quemadura corresponde a una quemadura de segundo grado profundo con espesor parcial (Zhang et al., 2014) tal y como se observó en nuestro modelo en las figuras 14 y 15. Además, el área corporal quemada (8%) en el ratón equivale a una quemadura en el muslo o una extremidad superior en los humanos (ver Figura 8) que por extensión se consideran como quemaduras graves. Esto es experimentalmente importante ya que la respuesta inflamatoria local y sistémica que se desencadenan después de la quemadura dependen de la extensión y la profundidad del daño generado (Shukla, 2020). Como resultado de los análisis histomorfológicos en nuestro modelo, fue posible definir los tiempos en los que se presentan las características clásicas de las diferentes fases del proceso de cicatrización. El proceso de cicatrización inicia con la fase inflamatoria como respuesta inmediata a la lesión provocada y se encuentra mediada principalmente por células inflamatorias, primero neutrófilos y luego macrófagos que invaden el tejido lesionado y se encargan de remover el tejido muerto, proteger contra infecciones y eliminar los patógenos. En segundo lugar, de manera simultánea y una vez que se concluye la limpieza de la herida, ocurre la fase de proliferación, en la cual los macrófagos segregan los mediadores para iniciar el proceso de reparación de la capa dérmica, en este paso los fibroblastos migran hacia la zona de daño y producen colágeno, además hay formación de tejido conectivo y formación de vasos sanguíneos. La última fase es la de remodelación, en la que las células principales de la epidermis migran desde los bordes de la

herida, hay disminución de actividad de los miofibroblastos y los fibroblastos secretan metaloproteasas con la finalidad de restaurar la integridad y estructura cutánea (Shukla, 2020). En nuestro modelo, la fase inflamatoria ocurre a los 3 días post-quemadura, en donde se observa que hay una gran cantidad de infiltrado inflamatorio que se localiza principalmente en la región necrótica y en los bordes de la quemadura. Posteriormente, la fase de proliferación ocurre a los 7 días post quemadura, en donde se puede apreciar que hay mayor potencial migratorio de células hacia la zona de daño, y comienza el crecimiento de la lengua de epitelización. Finalmente, a los 14 días post-quemadura inicia la fase de remodelación de matriz extracelular, día en el que hay una contracción evidente en la herida, se observa una reepitelización total en la zona de daño y ocurre un rearrreglo en la disposición de las fibras de colágeno resultando en la reparación de la arquitectura de la piel dañada. En la literatura, diversos estudios se han enfocado en estudiar no solo la arquitectura sino también la bioquímica de cada fase por separado. Las características histológicas que observamos en nuestros tejidos corresponden a los que se han publicado para la fase inflamatoria, de reepitelización y de remodelación (Guerrero et al., 2019) previamente.

Además de la extensión y la profundidad, la quemadura generada en nuestro modelo se caracterizó por contar con las tres zonas concéntricas descritas por Jackson en 1947 (Hettiaratchy et al., 2004). En primer lugar, se pudo apreciar la zona central, la cuál fue la zona que presentó máximo daño y se caracterizó por tener tejido necrótico por efecto de la coagulación y del daño térmico con la placa

metálica, esto a su vez provocó la inactividad celular. Aledaña a esta primera zona, se encuentra la zona de daño intermedia o de estasis y es aquí donde se produce la vasoconstricción e isquemia, por lo que el tejido inicialmente viable puede convertirse en tejido necrótico, es decir, la conservación de la piel que presenta la lesión depende de manera directa de los eventos que sucedan en los dos días posteriores a la quemadura, en esta zona existe una gran actividad metabólica de queratinocitos y células de Langerhans, las cuáles son importantes porque secretan inmunomediadores que atraen a las células inflamatorias como neutrófilos y macrófagos responsables de iniciar la respuesta inflamatoria mediada por citocinas. Por último, se observó la zona de hiperemia, la cual se caracterizó por tener un daño menor en comparación con las zonas que rodea y además se caracteriza por conservar la perfusión vascular necesaria para llevar a cabo la oxigenación y suministro de nutrimentos para iniciar el proceso de reparación (Hettiaratchy et al., 2004).

Por último, como resultado de nuestro análisis histomorfológico, pudimos delimitar en nuestro modelo cual es el área del tejido en la que ocurre la mayor actividad celular para la reparación del daño. Esto es un paso crucial para diseñar el experimento de scRNAseq. La zona que delimitamos como el borde de la quemadura corresponde a una circunferencia de 4 mm de grosor, que representan el área del tejido en donde eliminamos las células necróticas, pero capturamos a las células que, aunque dañadas, se activarán para iniciar el reclutamiento de otras estirpes celulares importantes para la reparación del daño. Esto ocurre principalmente en fases agudas como el día 3 pq, pero decidimos mantener el

mismo enfoque para 7 y 14 pq con la finalidad de analizar la dinámica de las poblaciones celulares en la misma zona del tejido. Después de procesar el tejido y realizar la digestión enzimática y disociación mecánica, obtuvimos conteos celulares de más de un millón de células con viabilidad superior al 90%. Estas condiciones son requeridas para el experimento de scRNAseq que se realizará en el futuro (Haque et al., 2017). Hasta la fecha, no se han realizado estudios de scRNAseq en modelos murinos de quemadura, por lo que nuestro diseño experimental es pionero en esta área. Las aportaciones del presente trabajo representan el primer objetivo para poder utilizar la metodología de scRNAseq para estudiar la manera en la que responden las distintas poblaciones celulares en las diferentes etapas de la cicatrización de una quemadura grave.

CONCLUSIONES

1. La quemadura generada en el modelo murino corresponde a las características de una quemadura de segundo grado profundo, ocupa una extensión corporal del 8% del ratón, y mimetiza las tres zonas de Jackson.
2. Los días 3, 7 y 14 después de la quemadura son representativos del inicio de las fases de inflamación, reepitelización y remodelación, respectivamente.
3. El borde de la quemadura se definió como el área de 4 mm que abarca tejido de las zonas de estasis (2 mm) y de hiperemia (2 mm).
4. El método de disociación de la piel quemada permite obtener muestras celulares en condiciones óptimas (conteo y viabilidad) para estudios posteriores como el análisis de scRNAseq.

BIBLIOGRAFÍA

- Tortora J, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. Panamericana. 2018; p. 145 -163.
- Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002 Jul-Aug;12(4):390-9; quiz 400-1. PMID: 12095893.
- Valdés-Rodríguez R, Torres-Álvarez B, González-Muro J, Almeda-Valdés P. La piel y el sistema endocrinológico [The skin and the endocrine system]. *Gac Med Mex.* 2012 Mar-Apr;148(2):162-8. Spanish. PMID: 22622316.
- Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* 2016 Feb;25(2):92-8. doi: 10.1111/exd.12832. Epub 2015 Oct 13. PMID: 26284579.
- Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, Chung KK, Gibran NS, Logsetty S. Burn injury. *Nat Rev Dis Primers.* 2020 Feb 13;6(1):11. doi: 10.1038/s41572-020-0145-5. PMID: 32054846; PMCID: PMC7224101.
- Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, Chan RK, Christy RJ, Chung KK. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care.* 2015 Jun 12;19:243. doi: 10.1186/s13054-015-0961-2. PMID: 26067660; PMCID: PMC4464872.
- Evers LH, Bhavsar D, Mailänder P. The biology of burn injury. *Exp Dermatol.* 2010 Sep;19(9):777-83. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01105.x. Epub 2010 Jul 14. PMID: 20629737.
- Daigeler A, Kapalschinski N, Lehnhardt M. Therapie von Brandverletzungen [Therapy of burns]. *Chirurg.* 2015 Apr;86(4):389-401. German. doi: 10.1007/s00104-014-2919-3. PMID: 25894015.
- Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ.* 2004 Jun 12;328(7453):1427-9. doi: 10.1136/bmj.328.7453.1427. Erratum in: *BMJ.* 2004 Jul 17;329(7458):148. PMID: 15191982; PMCID: PMC421790.

- González J. Efecto del proceso inflamatorio por vía Th1 y Th2 en la cicatrización de quemaduras de segundo grado profundo en un modelo murino. [Tesis de maestría]. Ciudad de México: IPN. 2017 Sep; 76 p.
- Moore RA, Waheed A, Burns B. Rule of Nines. 2022 May 30. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 30020659.
- De los Santos C. Guía básica para el tratamiento del paciente quemado. [Internet]. 2005: p. 19-21.
- Chong HP, Quinn L, Jeeves A, Cooksey R, Lodge M, Carney B, Molony D. A comparison study of methods for estimation of a burn surface area: Lund and Browder, e-burn and Mersey Burns. *Burns*. 2020 Mar;46(2):483-489. doi: 10.1016/j.burns.2019.08.014. Epub 2019 Sep 24. PMID: 31561927.
- Uraloğlu M, Livaoğlu M, Agdoğan Ö, Ersöz Ş, Karaçal N. The effect of low molecular weight heparin on salvaging the zone of stasis in an experimental burn model. *Turk J Med Sci*. 2018 Jun 14;48(3):653-660. doi: 10.3906/sag-1710-73. PMID: 29916226.
- Lu M, Zhao J, Wang X, Zhang J, Shan F, Jiang D. Research advances in prevention and treatment of burn wound deepening in early stage. *Front Surg*. 2022 Oct 21;9:1015411. doi: 10.3389/fsurg.2022.1015411. PMID: 36338639; PMCID: PMC9634408.
- Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns>. Quemaduras; 6 de marzo de 2018.
- Smolle C, Cambiaso-Daniel J, Forbes AA, Wurzer P, Hundeshagen G, Branski LK, Huss F, Kamolz LP. Recent trends in burn epidemiology worldwide: A systematic review. *Burns*. 2017 Mar;43(2):249-257. doi: 10.1016/j.burns.2016.08.013. Epub 2016 Sep 3. PMID: 27600982; PMCID: PMC5616188.
- Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. *J Wound Care*. 2017 Jan 2;26(1):5-19. doi: 10.12968/jowc.2017.26.1.5. PMID: 28103165.

- Lang TC, Zhao R, Kim A, Wijewardena A, Vandervord J, Xue M, Jackson CJ. A Critical Update of the Assessment and Acute Management of Patients with Severe Burns. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019 Dec 1;8(12):607-633. doi: 10.1089/wound.2019.0963. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31827977; PMCID: PMC6904939.
- Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Sep;71(17):3241-55. doi: 10.1007/s00018-014-1612-5. Epub 2014 Apr 9. PMID: 24714880; PMCID: PMC4134422.
- Ericsson AC, Crim MJ, Franklin CL. A brief history of animal modeling. *Mo Med*. 2013 May-Jun;110(3):201-5. PMID: 23829102; PMCID: PMC3979591.
- Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):665-706. doi: 10.1152/physrev.00067.2017. PMID: 30475656; PMCID: PMC6442927.
- Olsen TK, Baryawno N. Introduction to Single-Cell RNA Sequencing. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018 Apr;122(1):e57. doi: 10.1002/cpmb.57. PMID: 29851283.
- Wang Z, Chai C, Wang R, Feng Y, Huang L, Zhang Y, Xiao X, Yang S, Zhang Y, Zhang X. Single-cell transcriptome atlas of human mesenchymal stem cells exploring cellular heterogeneity. *Clin Transl Med*. 2021 Dec;11(12):e650. doi: 10.1002/ctm2.650. PMID: 34965030; PMCID: PMC8715893.
- AlJanahi AA, Danielsen M, Dunbar CE. An Introduction to the Analysis of Single-Cell RNA-Sequencing Data. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018 Aug 2;10:189-196. doi: 10.1016/j.omtm.2018.07.003. PMID: 30094294; PMCID: PMC6072887.
- Guerrero-Juarez CF, Dedhia PH, Jin S, Ruiz-Vega R, Ma D, Liu Y, Yamaga K, Shestova O, Gay DL, Yang Z, Kessenbrock K, Nie Q, Pear WS, Cotsarelis G, Plikus MV. Single-cell analysis reveals fibroblast heterogeneity and myeloid-derived adipocyte progenitors in murine skin wounds. *Nat Commun*. 2019 Feb 8;10(1):650. doi: 10.1038/s41467-018-08247-x. PMID: 30737373; PMCID: PMC6368572.
- Abbasi S, Sinha S, Labit E, Rosin NL, Yoon G, Rahmani W, Jaffer A, Sharma N, Hagner A, Shah P, Arora R, Yoon J, Islam A, Uchida A, Chang CK, Stratton

JA, Scott RW, Rossi FMV, Underhill TM, Biernaskie J. Distinct Regulatory Programs Control the Latent Regenerative Potential of Dermal Fibroblasts during Wound Healing. *Cell Stem Cell*. 2020 Sep 3;27(3):396-412.e6. doi: 10.1016/j.stem.2020.07.008. Epub 2020 Aug 4. Erratum in: *Cell Stem Cell*. 2021 Mar 4;28(3):581-583. PMID: 32755548.

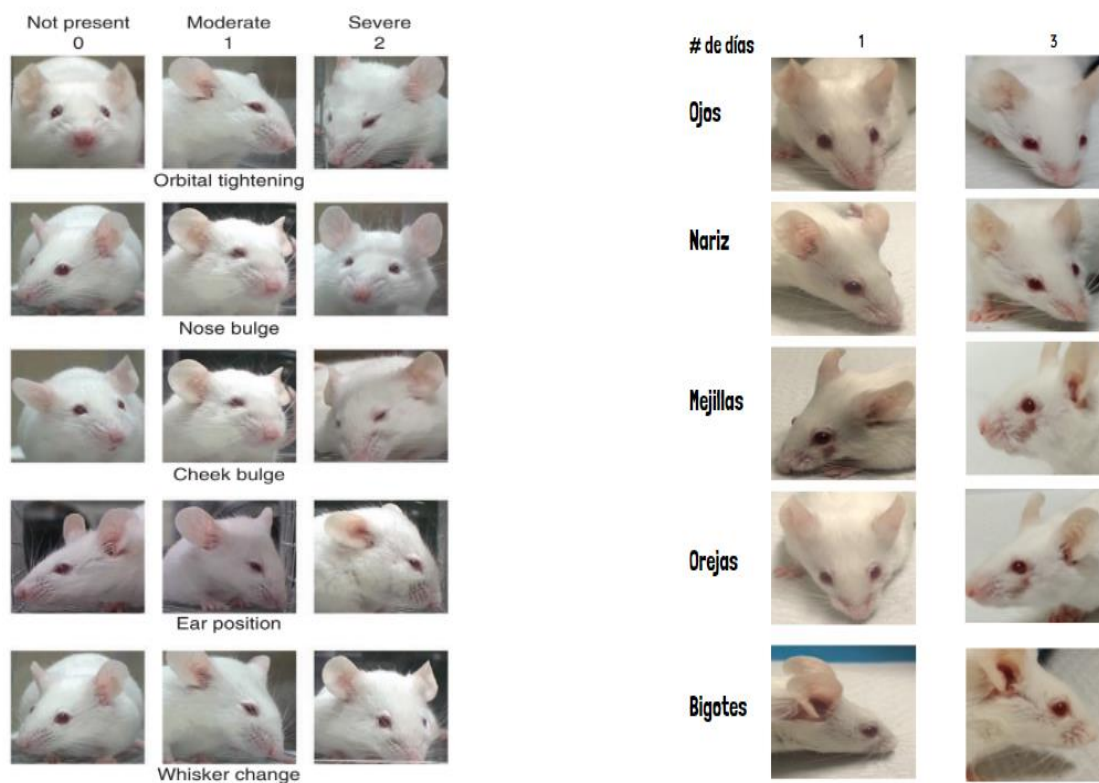
- Joost S, Jacob T, Sun X, Annusver K, La Manno G, Sur I, Kasper M. Single-Cell Transcriptomics of Traced Epidermal and Hair Follicle Stem Cells Reveals Rapid Adaptations during Wound Healing. *Cell Rep*. 2018 Oct 16;25(3):585-597.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2018.09.059. PMID: 30332640.
- Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*. 2014; 1180:31-43. doi: 10.1007/978-1-4939-1050-2_3. PMID: 2501514.
- Van De Vlekkert D, Machado E, d'Azzo A. Analysis of Generalized Fibrosis in Mouse Tissue Sections with Masson's Trichrome Staining. *Bio Protoc*. 2020 May 20;10(10):e3629. doi: 10.21769/BioProtoc.3629. PMID: 33659302; PMCID: PMC7842772.
- Henrot P, Laurent P, Levionnois E, Leleu D, Pain C, Truchetet ME, Cario M. A Method for Isolating and Culturing Skin Cells: Application to Endothelial Cells, Fibroblasts, Keratinocytes, and Melanocytes From Punch Biopsies in Systemic Sclerosis Skin. *Front Immunol*. 2020 Oct 7; 11:566607. doi: 10.3389/fimmu.2020.566607. PMID: 33117350; PMCID: PMC7575752.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. 2010 Jun;7(6):447-9. doi: 10.1038/nmeth.1455. Epub 2010 May 9. PMID: 20453868.
- Tejiram S, Romanowski KS, Palmieri TL. Initial management of severe burn injury. *Curr Opin Crit Care*. 2019 Dec;25(6):647-652. doi: 10.1097/MCC.0000000000000662. PMID: 31567292.
- Barrett LW, Fear VS, Waithman JC, Wood FM, Fear MW. Understanding acute burn injury as a chronic disease. *Burns Trauma*. 2019 Sep 16; 7:23. doi: 10.1186/s41038-019-0163-2. PMID: 31534977; PMCID: PMC6745803.

- Wang Y, Beekman J, Hew J, Jackson S, Issler-Fisher AC, Parungao R, Lajevardi SS, Li Z, Maitz PKM. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018 Jan 1;123:3-17. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.018. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28941987.
- Blaise O, Duchesne C, Banzet S, Rousseau A, Frescaline N. A Murine Model of a Burn Wound Reconstructed with an Allogeneic Skin Graft. *J Vis Exp.* 2020 Aug 8;(162). doi: 10.3791/61339. PMID: 32831317.
- Zhang Y, Bai X, Wang Y, Li N, Li X, Han F, Su L, Hu D. Role for heat shock protein 90 α in the proliferation and migration of HaCaT cells and in the deep second-degree burn wound healing in mice. *PLoS One.* 2014 Aug 11;9(8):e103723. doi: 10.1371/journal.pone.0103723. PMID: 25111496; PMCID: PMC4128658.
- Shukla SK, Sharma AK, Shaw P, Kalonia A, Yashavarddhan MH, Singh S. Creation of rapid and reproducible burn in animal model with a newly developed burn device. *Burns.* 2020 Aug;46(5):1142-1149. doi: 10.1016/j.burns.2019.12.005. Epub 2020 Mar 10. PMID: 32169381.
- Haque A, Engel J, Teichmann SA, Lönnberg T. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med.* 2017 Aug 18;9(1):75. doi: 10.1186/s13073-017-0467-4. PMID: 28821273; PMCID: PMC5561556.

ANEXOS

ANEXO 1

Evidencias Fotográficas” Escala del dolor “.



Anexo 1. Las imágenes de ratones exhiben comportamientos y rasgos faciales (ojos, nariz, mejillas, orejas y bigotes), los cuales brindan información acerca del dolor subjetivo en los ratones, esto es posible observar, a partir del diseño de codificación que consta del cambio de posición y cambio en las expresiones faciales. Cada parámetro está asociado por los valores que propone Langford en su estudio; valor 0 (dolor ausente), valor 1 (dolor moderadamente visible), 2 (sensación grave) (Langford et al., 2010).