



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de la migración e integración de células troncales  
mesenquimales derivadas de tejido adiposo en  
quemaduras de piel a partir de un andamio de piel  
porcina radioesterilizada.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biologo**

**P R E S E N T A :**

**Santiago King Placencia.**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. María Cristina Velasquillo Martínez  
CIUDAD DE MÉXICO, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). El proyecto fue financiado por el fondo CONACyT BASICA proyecto 287405 cuyo responsable es la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez.

Al Dr. Erik Márquez por la procuración constante de biopsias.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) por la donación de amnios humano radio esterilizado bajo la colaboración de la Dra. María Esther Martínez Pardo.

### ***Agradecimientos.***

#### **A mis padres.**

Por su apoyo incondicional durante toda mi vida académica, por entenderme, por sus consejos y por desvivirse para que no me faltará nada y poder cumplir con esta meta, los amo.

#### **A mi hermana.**

Por ser una amiga, retarme siempre a ser mejor y no dejar que nada me derrumbe.

#### **A Diana Luna.**

Por ser mi apoyo, mi mejor amiga y estar durante 8 años en todos los momentos buenos y malos. Gracias por ayudarme a cambiar mi forma de pensar, retarme intelectualmente y hacer que nunca me diera por vencido hasta lograr esta meta. Solo te puedo decir muchas gracias, eres de las personas más importantes en mi vida, te amo.

#### **A mi directora de tesis.**

Por apoyarme en todo lo necesario, por su buena disposición y compromiso.

#### **Al Dr. Roberto Sánchez Sánchez.**

Gracias por tus enseñanzas, por toda tu paciencia y por todo tu apoyo.

### **A mis amigos de la carrera.**

Gracias por todo su apoyo, comprensión, confianza, aventuras, amistad y por hacer mejores mis días durante la licenciatura.

### **A mis amigos psicólogos.**

Gracias por su amistad y permitirme ser parte de sus vidas. En especial gracias a Adriana Duque, por su apoyo incondicional y por ser tan buena amiga durante 5 años.

### **A mis amigos del laboratorio de Biofísica.**

Gracias por su amistad y apoyo, en especial gracias a la Dra. Luisa Durán por aceptarme en dicho laboratorio y permitirme aprender un poco más.

### ***Abreviaturas.***

- **ADMSC:** Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
- **CENIAQ:** Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados.
- **EGF:** factor de crecimiento epidérmico.
- **FGFb:** Factor de crecimiento de fibroblastos básico.
- **hADMSC:** Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano.
- **HB-EGF:** Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina.
- **ININ:** Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.
- **INR:** Instituto Nacional de Rehabilitación.
- **KGF:** Factor de crecimiento de queratinocitos.
- **PPR:** piel porcina radio esterilizada.
- **SCF:** factor de célula troncal.
- **SFB:** Suero fetal bovino.
- **TGF- $\alpha$ :** factor de crecimiento transformante alfa.

## ***Índice.***

<b>1. Introducción</b>	
<b>1.1 Piel</b>	<b>2</b>
1.1.1 Epidermis.	3
1.1.2 Dermis.	5
<b>1.2 Quemaduras.</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Células troncales.</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Apósito de piel porcina radio esterilizada.</b>	<b>10</b>
<b>2. Planteamiento del problema.</b>	<b>11</b>
<b>3. objetivo general.</b>	<b>11</b>
<b>4. objetivos particulares.</b>	<b>12</b>
<b>5. Justificación.</b>	<b>12</b>
<b>6. Hipótesis.</b>	<b>12</b>
<b>7. Método.</b>	<b>13</b>
Obtención de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.	13
Migración celular in vitro.	18
Ensayo de inmunohistoquímica para determinar la migración celular en una quemadura de piel.	21
<b>8. Resultados</b>	<b>25</b>
<b>9. Discusión.</b>	<b>35</b>
<b>10. Conclusión.</b>	<b>37</b>
<b>11. Referencias.</b>	<b>38</b>

## **Índice de Figuras.**

Figura 1. Esquema de la anatomía de piel	2
Figura 2. Composición histológica de la epidermis	4
Figura 3. Clasificación de una quemadura según la profundidad.	6
Figura 4. Origen de los distintos tipos de células troncales.	8
Figura 5. Piel porcina radio esterilizada y liofilizada	11
Figura 6. Muestra de tejido adiposo obtenida por abdominoplastia.	13
Figura 7. Disgregación mecánica de tejido adiposo.	15
Figura 8. Disgregación enzimática.	16
Figura 9. Inactivación de la colagenasa.	17
Figura 10. Pellet de Hadmsc.	18
Figura 11. Caja de 24 pozos con PPR.	19
Figura 12. ADMSC sembradas sobre la PPR.	20
Figura 13. Pruebas de viabilidad de las ADMSC.	30
Figura 14. Prueba de viabilidad realizada en la PPR con ADMSC.	31
Figura 15. Pruebas inmunohistoquímicas en cultivo celular de ADMSC.	33
Figura 16. Pruebas inmunohistoquímicas de piel de ratón.	34
Figura 17. Evaluación de la migración <i>in vivo</i> .	34

## **Índice de tablas.**

Tabla 1. Promedio de células vivas y muertas de los dos tratamientos.	26
Tabla 2. Promedio de células vivas y muertas con respecto del total en los Pozos.	27
Tabla 3. Porcentaje de células vivas y muertas presentes con respecto del total sembradas.	28

## **Índice de Gráficos.**

Gráfica 1. Promedio de células vivas y muertas.	27
Gráfica 2. Porcentaje de viabilidad respecto del total de células encontradas en los pozos.	28
Gráfica 3. Porcentaje de células vivas y muertas con respecto del total sembradas	29

## **Resumen.**

En la actualidad las quemaduras de piel son un problema de salud pública, por lo que se han desarrollado herramientas biotecnológicas que permiten dar un mejor tratamiento de los pacientes. Debido a lo anterior en este trabajo se cultivaron células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo de humano (hADMSC) sobre piel porcina radioesterilizada, para analizar la migración de las células troncales. Se realizaron pruebas de viabilidad en un modelo *in vitro*, con el fin de comparar el porcentaje de células que migraron en un medio que contenía gelatina y un medio sin gelatina, obteniendo como resultado un mayor porcentaje de células vivas en los pozos que contenían gelatina. También se realizaron pruebas inmunohistoquímicas en cortes de parafina, estas pruebas se realizaron utilizando un anticuerpo específico de humano con el fin de determinar si las hADMSC tenían la capacidad de migrar al lecho de la herida de la piel murina, obteniendo como resultado en las muestras experimentales pocas células incorporadas a la piel en reparación. De esta manera se determinó que la piel porcina radio esterilizada es permisiva para la migración de las ADMSC, sin embargo, el porcentaje de incorporación de células a la herida es poco.

## 1. Introducción.

### 1.1. Piel.

La piel es el tejido más externo del cuerpo y es el órgano más grande en términos de peso y superficie (Igarashi, 2007), en humanos representa aproximadamente el 7% de la masa total del cuerpo y su área es de aproximadamente 1.8 m<sup>2</sup> (Krause, 2005), la importancia de este tejido radica en las funciones que desempeña en el organismo, como lo son: protección, ya que protege contra una gran variedad de daños generados por estímulos externos, como daños mecánicos, químicos y biológicos; sensación, debido a que presenta múltiples receptores; termorregulación, conservando el calor corporal y funciones metabólicas como la síntesis de vitaminas, metabolismo del calcio y la protección de varios nichos de células troncales en la piel (Ross, 2006). La piel tiene un origen doble: a) una capa superficial, la epidermis, que proviene del ectodermo superficial; y b) una capa profunda, la dermis, que se desarrolla a partir de la mesénquima subyacente (Sadler, 2007). La epidermis es el estrato que se encuentra en la superficie externa y la dermis (tejido conectivo) se encuentra debajo de la epidermis (Montagna, 2012), Fig.1

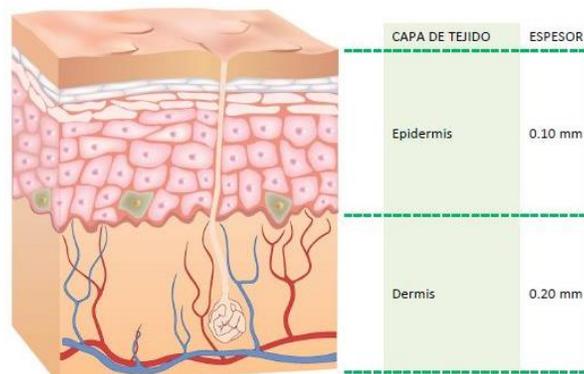


fig. 1 Esquema de la anatomía de la piel. En la figura se pueden observar los dos estratos principales de la piel: la epidermis y la dermis. Siendo la dermis el estrato más amplio con espesor aproximado de 0.20 mm, mientras que el espesor de la epidermis es de aproximadamente 0.10 mm (AITEX, 2017).

### 1.1.1 *Epidermis.*

La epidermis es un epitelio estratificado plano queratinizado (Kühnel, 2005), que se encuentra constituida por dos grupos de células: queratinocitos y células dendríticas (melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel) (Navarrete, 2009). Los queratinocitos son el tipo celular predominante en la epidermis, estos se originan en el estrato epidérmico basal y al abandonar este estrato desempeñan dos actividades: fungir como barrera y sintetizar queratina, laminina y colágena tipo IV (Ross, 2007) (Alitalo, 1982). La función de las células de Langerhans es iniciar la respuesta inmune, estas células se originan de precursores de la médula ósea y forman en la epidermis un entramado celular con sus notables prolongaciones, que funcionan para atrapar antígenos (Fainboim, 2005). Las células de Merkel son mecanorreceptores de tipo I y se encuentran principalmente en los sitios de alta sensibilidad táctil (Fitzpatrick, 2009). Los melanocitos se encuentran en la capa epitelial basal y emiten prolongaciones celulares delgadas que se extienden entre los queratinocitos, los melanocitos derivan de la cresta neural y se desarrollan a partir de melanoblastos bajo el control del factor de célula troncal (SCF), que interacciona con el receptor c-Kit (una tirosina cinasa de la membrana del melanoblasto) (Welsch, 2008). La epidermis puede dividirse en cuatro capas: la capa basal en la cual se generan nuevas células, la capa espinosa en la cual hay presencia de células poliédricas que contienen delgadas tonofibrillas, la capa granulosa que presenta gránulos de queratohialina en sus células y por último la capa cornea compuesta de células muertas y queratinizadas (Sadler, 2007), Fig. 2

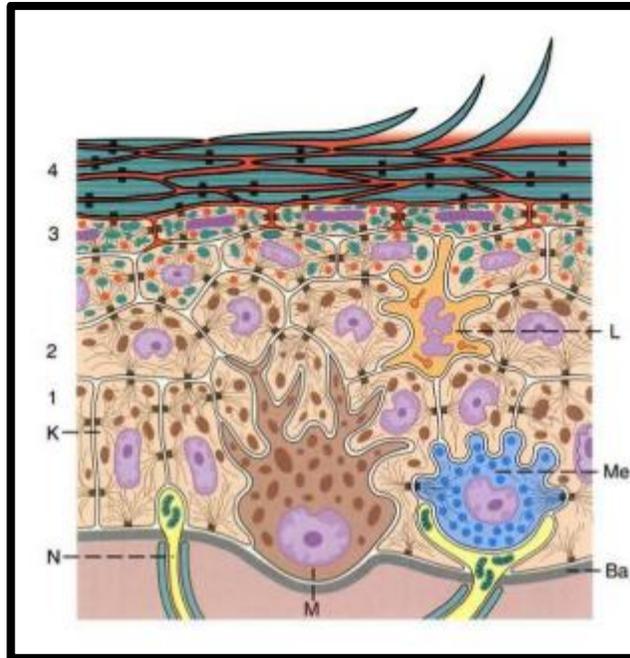


fig. 2 Composición histológica de la epidermis. Se muestran los 4 estratos en los cuales se divide la epidermis y los diferentes tipos celulares presentes: Estrato basal (1), estrato espinoso (2), estrato granuloso (3), estrato córneo (4), células de Langerhans (L), Células de Merkel (Me), Melanocitos (M), Terminaciones nerviosas libre (N), queratinocitos (K) (Welsch, 2008).

El origen de la epidermis en los vertebrados se genera a partir de la epidermis presuntiva (formada posterior a la neurulación y a partir del ectodermo), la cual se convierte en una estructura formada por la capa externa y la capa basal. La capa externa da origen al peridermo, una cubierta temporal que se desprenderá una vez que se diferencia la capa interna (epitelio germinativo que da origen a todas las células del epitelio) para formar la verdadera epidermis. La capa basal se divide para dar origen a otra población externa de células que constituyen la capa espinosa (el conjunto de las dos capas mencionadas anteriormente se le conoce como capa de Malpighi) (Gilbert, 2005). Se ha observado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) está implicado en la proliferación de células epiteliales durante el proceso de la formación del embrión (Green, 1984).

### 1.1.2 *Dermis.*

La dermis es un tejido que contiene una matriz compuesta por colágena elástica, densa y entrelazada, organizada en regiones papilares y reticulares (Holbrook, 1982). La capa papilar es el área dérmica que se proyecta entre las crestas epidérmicas y consiste en componentes de fibras finas, terminaciones sensoriales y abundantes vasos capilares. La capa subcapilar subyace a la epidermis y tiene los mismos componentes de la capa papilar. La capa reticular está presente en casi toda la dermis y tiene un tejido conectivo denso que consiste en fibras de colágena tipo I y III, con pequeñas cantidades de fibras elásticas, y reticulares; los tipos celulares de la dermis son fibroblastos, macrófagos, mastocitos, células plasmáticas y células nerviosas (Shimizu, 2017). Los fibroblastos son un tipo celular derivado del mesénquima que migra a través de los tejidos y es responsable de la síntesis y degradación de las proteínas de la matriz del tejido conjuntivo fibroso y no fibroso (Fitzpatrick, 2009). Los macrófagos son los componentes fundamentales de un sistema de células fagocíticas que derivan de los monocitos y su papel principal es el de protección (Welsch, 2008). Los mastocitos son células que tienen su origen de una célula madre pluripotente de la médula ósea y circulan en la sangre periférica en forma de células granulares de aspecto monocíticos (Ross, 2007). Las células plasmáticas son células que se desarrollan a partir de linfocitos B (Tizard, 2009). La dermis se deriva de tres fuentes mesenquimales diferentes (cresta neural, mesodermo de la placa lateral y mesodermo paraxial) y alberga folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, vasos sanguíneos y nervios receptores sensoriales (Arda, 2014).

### **1.2 Quemaduras.**

“Una quemadura es una lesión a la piel u otro tejido orgánico causada principalmente por el calor, la radiación, la radioactividad, la electricidad, la fricción o el contacto con productos químicos corrosivos” (OMS, 2017). Las quemaduras se pueden clasificar por la profundidad de la lesión en tres distintos tipos: primer grado, segundo grado y tercer grado. Las quemaduras de primer grado o epidérmicas, solo afectan la epidermis o capa externa de la piel; las

quemaduras de segundo grado o dérmicas afectan a la epidermis y a la dermis, en este tipo de quemaduras quedan conservados algunos elementos viables que permiten la regeneración de los epitelios; por último, las quemaduras de tercer grado o espesor total afectan todo el espesor de la piel (epidermis, dermis y estructuras profundas) (Tapia, 2007) Fig. 3

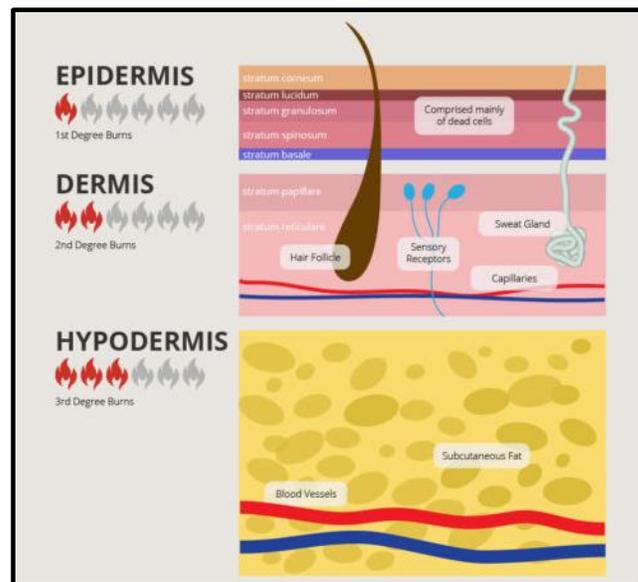


fig. 3 Se muestra la clasificación de una quemadura según la profundidad de la lesión. Las quemaduras de primer grado se caracterizan por lesionar las capas que conforman la epidermis, mientras que las de segundo grado lesiona la epidermis y la dermis. Por último, se encuentra la quemadura de tercer grado que se caracteriza por dañar la hipodermis (The Walker Morgan Law Firm, 2017).

Cuando ocurre una lesión en la piel, comienza un proceso de hemostasis y la hemorragia se controla mediante la agregación de plaquetas al sitio de la lesión. Posteriormente se forma un coágulo de fibrina que detiene el sangrado y proporciona un almacén de unión y proliferación celular. Al mismo tiempo que se activa la cascada de coagulación inicia la fase inflamatoria en la cual se da la liberación de citocinas que estimulan la quimiotaxis de neutrófilos seguida de macrófagos en la herida para el desbridamiento precoz de la herida. Posteriormente se presenta la reepitelización y la fase proliferativa, en la primera comienza un aumento en el grosor de la capa basal del epitelio en los márgenes de la herida, provocando que las células basales cuboideas marginales se elonguen y se liberen de las células epiteliales vecinas y de la membrana basal mediante la desaparición

de los desmosomas y hemidesmosomas que las unen al epitelio y a la dermis respectivamente, en esta fase se produce la retracción de los filamentos intermedios intracelulares y se desarrollan filamentos de actina que permiten la migración celular al sitio de la lesión (Arias, 1999); mientras que en la fase proliferativa los fibroblastos son atraídos dentro de la herida para sintetizar tejido de granulación (tejido compuesto de procolágena, elastina, proteoglicanos y ácido hialurónico), el cual permite el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que proporcionan nutrición y oxígeno al tejido en crecimiento, esto permite que los leucocitos entren en el sitio de la herida. Una vez que la herida se cierra, la cicatriz inmadura puede pasar a la fase de remodelación (Xue, 2015), en la cual hay una reorganización, remodelación y maduración de las fibras de colágena, ganando fuerza tensora (Hess, 2012).

Los factores de crecimiento que han mostrado tener un papel fundamental en la regeneración celular son los factores de crecimiento de la familia epidérmica, dentro de este grupo está el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), los tres factores están involucrados en la motilidad y proliferación celular. Otra familia de factores de crecimiento involucrada es la familia de factores de crecimiento de fibroblastos, en esta se encuentra el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb), el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (involucrados en la angiogénesis y proliferación de fibroblastos) y el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) (motilidad y proliferación de células epidérmicas). Por último, se encuentra la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF), en donde están comprendidos el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3; los factores de crecimiento  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2, están involucrados en la migración de células epidérmicas, en la síntesis y remodelación de matriz extracelular, así como también en la quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos. Existen otros factores de crecimiento que no se encuentran en las familias antes mencionadas, como lo son el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento vascular-endotelial, etc. (Singer, 1999)

### 1.3 Células troncales.

Una célula troncal es aquella que tiene la capacidad de auto-renovarse y dar lugar a un tipo celular especializado. Las células troncales se han clasificado en tres categorías, células troncales totipotentes, pluripotentes y multipotentes (Figura 4) Las células troncales multipotentes son las más especializadas de las anteriores y por lo tanto dan origen sólo a algunos tipos celulares determinados del cuerpo (Biehl, 2009). En este grupo de células se encuentran las células troncales mesenquimales, las cuales pueden ser aisladas de médula ósea, endometrio, pulpa dental, tejido adiposo, entre otras. En el tejido adiposo por medio de la técnica de lipoaspirado, se pueden obtener cantidades significativas de estas ( $2-6 \times 10^8$  células en 300cc), las cuales presentan en cultivo una cinética de crecimiento y proliferación estable (Zuk, 2001). La caracterización fenotípica de las células se realiza mediante la detección de marcadores de superficie celular. Las células troncales mesenquimales deben presentar los marcadores CD105, CD73 y CD90, y carecer de expresión de marcadores hematopoyéticos como: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19 y HLA-DR (Rojewski, 2008).

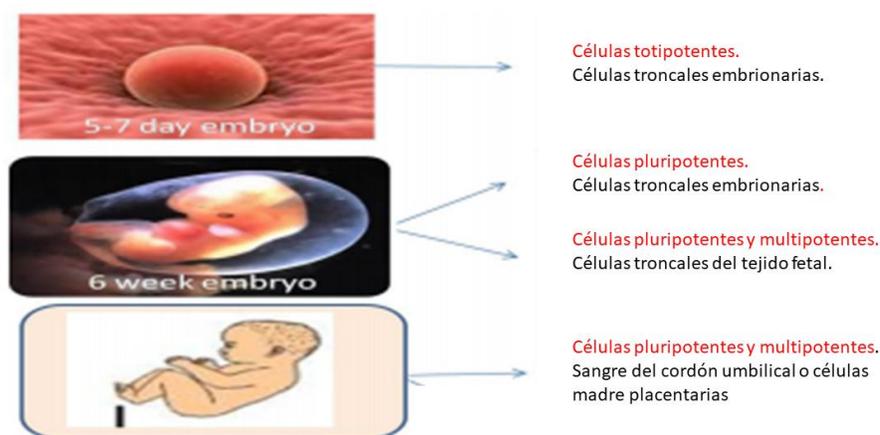


fig. 4 Se muestra el origen de los distintos tipos de células troncales, tomando en cuenta la potencialidad. De esta manera se muestra que las células troncales totipotentes solo se presentan en el cigoto formado posteriormente a la fertilización del huevo y las primeras células generadas tras la división del cigoto, estas células tienen la capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares, mientras que las células pluripotentes tienen la capacidad de dar lugar a las tres capas germinales,

las células troncales multipotentes solo se pueden diferenciar en una familia de células estrechamente relacionadas (Kalra, 2014).

Se ha observado que en distintos compartimentos epidérmicos existe la presencia de células troncales (foliculo piloso, istmo, infundíbulo y epidermis interfolicular) las cuales están implicadas en la reparación de la epidermis cutánea, esta reparación implica un aumento en la tasa de proliferación de una pequeña población de células troncales que da origen a progenitores por división asimétrica. Se sabe que hay dos zonas epidérmicas distintas involucradas en la reparación de la epidermis; un núcleo proliferativo compuesto de la epidermis interfolicular y del foliculo piloso derivado de células troncales con su progenie y un borde delantero migrante compuesto de células no proliferativas. Se creó que el borde delantero migrante no proliferativo de la herida actúa como un andamio que permite un proceso de cicatrización armonioso, mediante la creación de una plataforma de secreción de alto nivel de enzimas que remodelan la matriz extracelular circundante y el coágulo de fibrina, permitiendo a la regeneración del tejido avanzar hacia el centro de la herida y de esta manera proteger a las células troncales y a su progenie (Aragona, 2017). En otro estudio se ha observado que la migración de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo, está relacionada estrechamente con la presencia de factores de crecimiento y quimiocinas, principalmente se ha observado que los factores de crecimiento involucrados son el PDGF-AB, el TGF- $\beta$ 1 y el TNF- $\alpha$ , mientras que las quimiocinas involucradas son quimioquina CC (CCR1, CCR7) y CXC (CXCR4, CXCR5, CXCR6) (Baek, 2011). La migración de ADMSC cobra importancia debido a que pueden contribuir a reparar una lesión mediante la diferenciación directa a fibroblastos y queratinocitos, además de formar tejido vascular que nutra al nuevo tejido que se va a desarrollar.

#### **1.4 Apósito de piel porcina radio esterilizada.**

Un apósito es cualquier producto sanitario empleado para cubrir y proteger una herida, un apósito debe proporcionar un microambiente adecuado, de tal manera que la cicatrización se dé en las mejores condiciones posibles, menor tiempo y reduciendo posibilidades de infección (Enrich, 2000). La piel de cerdo tiene varias similitudes histológicas e inmunohistoquímicas con la piel de humano (Debeer, 2013), debido a lo anterior en 1978 el Doctor Sándor Pellet utilizó la piel porcina radio esterilizada (PPR) y liofilizada en pacientes quemados, para brindar tratamiento Fig. 5. La piel porcina radioestérilizada y liofilizada es sometida al proceso de liofilización lo que le permite conservar mejor sus propiedades, ya que es un proceso de deshidratación en el que se mantienen las características químicas, una vez que la piel es liofilizada la piel porcina es sometida al proceso de irradiación Gamma, con el fin de esterilizar el tejido (Lourdes, 2001). Se ha observado que el uso de un constructo biológico conformado por piel de cerdo radio esterilizada en conjunto con células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hADMSC) promueve la migración celular, la liberación de citoquinas y la proliferación a las hADMSC (Sánchez, 2015). Sin embargo, se desconoce si las hADMSC cultivadas sobre PPR son capaces de desprenderse y migrar al sitio de la herida. Entender este fenómeno tiene la finalidad de utilizar la PPR como un apósito celularizado para el tratamiento de lesiones cutáneas como las quemaduras.



fig. 5 Piel porcina radio esterilizada y liofilizada realizada por el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. La piel porcina radio esterilizada presenta similitudes histológicas e inmunohistoquímicas con la piel de humano lo que ha promovido su uso en pacientes quemados (Lourdes, 2001).

## ***2. Planteamiento del problema.***

Recientemente se ha observado que la piel porcina radio esterilizada (PPR), es un material biomimético que permite la proliferación de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo de humano (hADMSC), además de permitir la liberación de citoquinas, las cuales podrían tener implicaciones importantes en el proceso de reparación de la piel. Sin embargo, aún se desconoce si las hADMSC cultivadas sobre PPR son capaces de desprenderse y migrar al sitio de la herida.

## **3. Objetivo general.**

Analizar la migración de células troncales mesenquimales a partir de un andamio de piel porcina radioesterilizada hacia quemaduras de piel.

#### **4. Objetivos particulares.**

- Aislar células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
- Determinar si la piel porcina radio esterilizada le permite a células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo migrar hacia una placa de cultivo tratada con gelatina que es un derivado de la colágena, principal componente de la matriz extracelular.
- Analizar si la piel porcina radio esterilizada le permite a células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo migrar hacia el lecho de una quemadura de piel.

#### **5. Justificación.**

Las quemaduras de piel ocasionan aproximadamente 180,000 muertes al año (OMS, 2017), por lo que es importante generar herramientas biotecnológicas que permitan dar un mejor tratamiento a estos problemas. Sánchez y colaboradores generaron un apósito celularizado cultivando ADMSC sobre PPR, mostrando alta viabilidad, migración sobre el biomaterial y proliferación, sin embargo, es necesario comprender si la PPR permitirá migrar a las ADMSC al lecho de la herida. Debido a lo anterior en este trabajo se pretende determinar si es posible que se dé el proceso de migración celular a partir de un constructo biológico en el lecho de una quemadura de piel.

#### **6. Hipótesis.**

Si existe interacción entre las ADMSC contenidas en la piel porcina radio esterilizada con la matriz extracelular de una lesión de piel, éstas podrían ser capaces de migrar e integrarse al sitio de la lesión.

## 7. Método.

### Obtención de células troncales mesénquimales derivadas de tejido adiposo.

#### *Obtención de la muestra.*

Las muestras se obtuvieron a partir de abdominoplastias, previa firma de consentimiento informado por parte del paciente (Fig. 6). Una vez obtenida la muestra fue necesario remover cualquier tipo de tejido diferente al tejido adiposo. Las muestras se transportaron en un frasco estéril con medio DMEM/F12 (Gibco® Ref. 11320-033) suplementado al 10% de antibiótico/antimicótico (100X) (Gibco® Ref.15240-062) y mantenido en refrigeración temporal (4°C).



fig. 6. Se presenta una muestra de tejido adiposo, obtenida mediante abdominoplastia, en la cual se logra observar la piel principalmente la epidermis que representa la cara externa y unido a la dermis una gran capa de tejido adiposo de color amarillo con rojo, esto debido a la sangre presente en el tejido. La muestra fue transportada en medio DMEM F12 con 10% de antibiótico/antimicótico. Previamente se obtuvo la firma de consentimiento informado por parte del paciente.

### *Procesamiento.*

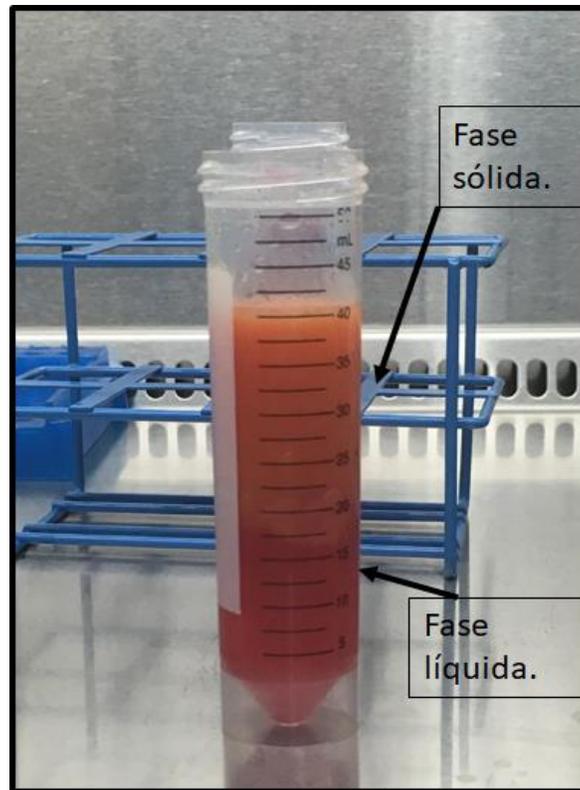
Se colocó la muestra en una caja Petri estéril con el fin de tener un mejor manejo del tejido lo cual permitió obtener fragmentos de tejido adiposo de aproximadamente 30 gramos. Posteriormente se prepararon 3 tubos Falcón de 50 mL con 20 mL de PBS 1X (Gibco® Ref. 10010-023), 10% de antibiótico/antimicótico (100X) (Gibco® Ref. 15240-062) y se colocó la muestra de 30 g en cada uno de los tubos por cinco minutos en agitación constante con el fin de realizar lavados. Posteriormente se realizó la disgregación mecánica, colocando la muestra ya lavada en una caja Petri para disgregar el tejido con tijeras, obteniendo de esta manera pedazos de tejido adiposo menores a 1 cm<sup>2</sup> (Fig. 7). Después de realizar la disgregación mecánica, se realizó la disgregación enzimática colocando la muestra de tejido adiposo en un tubo cónico Falcón de 50 mL con colagenasa tipo II (Worthington Biochemical Corporation, Ref.S5B15572) al 0.3% preparada con medio DMEM/F12 (Gibco® Ref. 11320-033) (Fig. 8), una vez colocada la muestra en el tubo Falcón de 50mL se incubo a 37°C en agitación constante por 60 min. Posteriormente se realizó la inactivación enzimática agregando 10 mL de medio de cultivo DMEM/F12 con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco® Ref. 16000-044). Después de la digestión enzimática e inactivación de la misma se observan dos fases, una líquida en el fondo y otra con los restos del tejido (Fig. 9), por lo que se procedió con ayuda de una pipeta a tomar la parte líquida y se hizo pasar por un filtro Falcón de nailon de 70 µm en un tubo de 50 ml. Una vez que se filtró la fase líquida se centrifugo a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se procedió a retirar el sobrenadante y se trabajó con el pellet celular que se precipito en el fondo del tubo (Fig. 10), en el cual se encuentran las células de interés (ADMSC) y eritrocitos, posteriormente se le agrego 1ml de medio para realizar conteo celular con la ayuda de una cámara de Neubauer y se sembró a 15000 células/cm<sup>2</sup> en una caja T25. Una vez sembradas las células se incubaron a 37°C por un día permitiendo que las ADMSC se adhirieran a la caja, al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS 1X (Gibco® Ref. 10010-023) +1% antibiótico/antimicótico (100X) (Gibco® Ref. 15240-062) con el fin de eliminar los eritrocitos y adipocitos presentes. Finalmente se incubaron a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.



fig. 7 Disgregación mecánica de tejido adiposo. La degradación mecánica se realiza utilizando pinzas de relojero y tijeras, tratando de obtener trozos pequeños de la muestra, con el fin de facilitar posteriormente la disgregación enzimática.



*fig. 8. Disgregación enzimática. En este paso se utiliza colagenasa tipo II con el fin de digerir la matriz extracelular que en su mayoría está compuesta de colágena tipo II, esto nos permitirá que las células se separen.*



*fig. 9. Se muestran las dos fases que se forman posteriormente a la inactivación de la colagenasa tipo II. En este paso se tiene que tener cuidado al tomar la parte líquida del tubo, ya que en esa sección se encuentra el tipo celular de interés (hADMSC).*

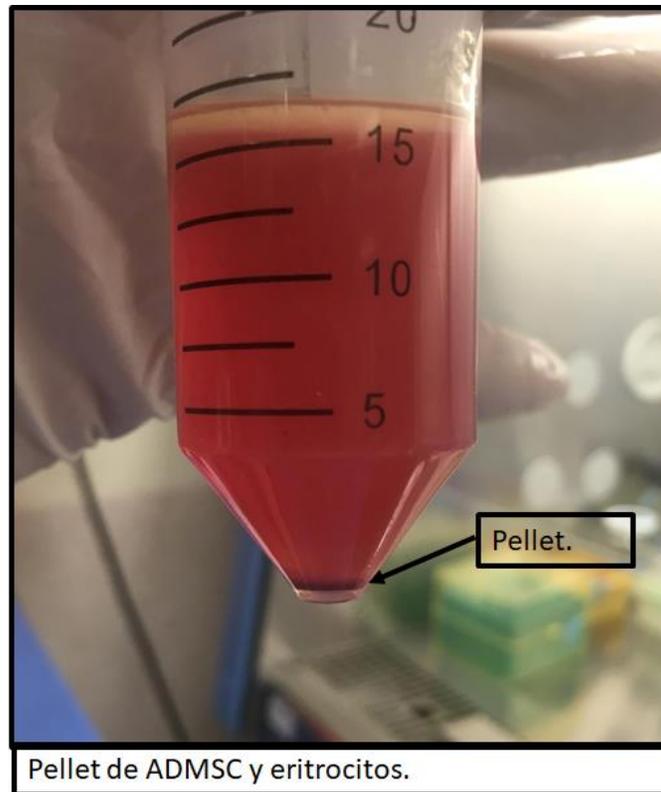


fig. 10. Se muestra el pellet de hADMSC y eritrocitos posteriormente a realizar la centrifugación de la fase líquida filtrada. Posteriormente a la obtención del pellet se realiza el sembrado celular a altas densidades celulares, ya que el pellet contiene otros tipos celulares como adipocitos, ADMSC y eritrocitos.

### **Migración celular *in vitro*.**

#### *Preparación de piel porcina radio esterilizada.*

Se utilizó piel porcina radio esterilizada (PPR), donada por el banco de tejidos radio esterilizados, del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). La PPR fue perforada con una perforadora de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, para crear los parches. Los apósitos de PPR fueron colocados en cajas de 24 pozos con la epidermis viendo hacia abajo (Fig. 11).



fig. 11. Caja de 24 pozos con PPR. La piel porcina radio esterilizada tiene un lado al cual se le logran observar poros y corresponde a la dermis mientras que la parte lisa corresponde a la epidermis, en este paso la PPR se coloca con la dermis viendo hacia arriba.

#### *Tripsinización y sembrado de las ADMSC.*

Se utilizaron cajas de cultivo T25 y T75 para realizar el sembrado de ADMSC sobre la PPR. A las cajas de células se les retiró el medio que contenían y posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X (Gibco® Ref. 10010-023), después se colocó tripsina EDTA (1X) al 0.05% (Gibco® Ref. 25200-056) y se incubaron a 37°C, con el fin de despegar las células. Una vez que las células fueron despegadas con tripsina-EDTA (Gibco®) se les colocó un volumen igual de medio DMEM F12 (Gibco®) con 10% de SFB (Gibco®) con el fin de inactivar la acción enzimática. Posteriormente se colocaron las células en un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm durante cinco minutos, después se retiró el sobrenadante dejando solo el pellet de células, para posteriormente colocarle 1 ml de DMEM F12 (Gibco®) y se realizó el conteo celular con una cámara de Neubauer. Nuevamente se centrifugaron las células y se desechó el sobrenadante, se realizaron los cálculos necesarios para obtener 60,000 células en 10  $\mu$ l y se le colocó el medio necesario. Se cultivaron las células en gotas de 10 $\mu$ l sobre el centro de la PPR (dermis). Por último, se colocó medio en la orilla de los pozos en forma de cámara húmeda (Fig.12), con el fin de evitar que las células sembradas en la PPR perdieran

humedad, la placa se dejó en estas condiciones por una hora y después se le agregó más medio dejándolo durante 24 horas.

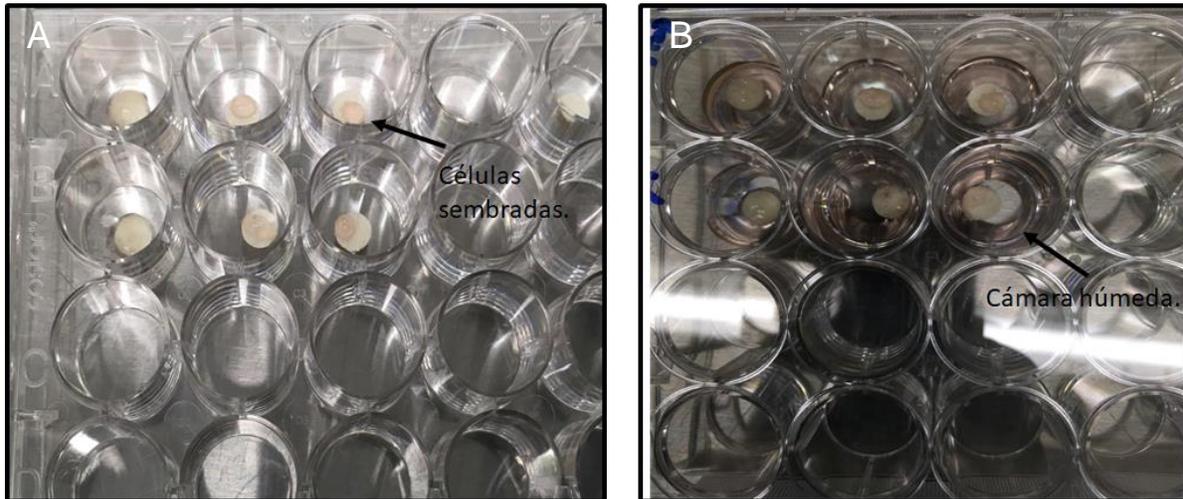


fig. 12. (A) Se muestran las células sembradas en el centro de la dermis en la piel porcina radio esterilizada y (B) se muestra el medio colocado en la orilla de los pozos (la cámara húmeda). Se sembraron las hADMSC a una densidad de 120,000 células/cm<sup>2</sup>, esto con el fin de tener el mayor número de células adheridas sobre la PPR y previniendo que muchas células se pierden durante el proceso de adhesión a la misma.

#### *Preparación de cajas.*

En una caja de 96 pozos se colocó por triplicado gelatina 0.15% medio DMEM F12 (Gibco®), a que se cubra la superficie del pozo (aproximadamente 300  $\mu$ L), después de 30 minutos se retiró el gel y se dejó secar por 30 minutos. Este tratamiento corresponde al procedimiento experimental. Por su parte en el control positivo se colocó solo medio DMEM-F12 (Gibco®), de igual manera se realizó por triplicado. Al día siguiente de haber preparado la PPR con hADMSC se voltearon los apósitos de PPR de tal manera que la dermis quedará viendo hacia abajo sobre las placas preparadas con gelatina + medio DMEM-F12 y se dejaron incuban por 24 horas a 37°C.

#### *Pruebas de viabilidad.*

Después de 24 horas de cultivo los apósitos fueron retirados y los pozos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C con medio DMEM F12 con calceína (Invitrogen) y homodímero de etidio (Invitrogen) al 0.03%. Esta prueba permite realizar ensayos de viabilidad celular de fluorescencia y se basa en la determinación

simultanea de células vivas y muertas, ya que la calceína y el homodímero de etidio miden parámetros reconocidos de viabilidad celular (la actividad de la esterasa y la integridad de la membrana, respectivamente). Por último, se tomaron micrografías con un microscopio óptico de fluorescencia, analizando las células vivas con una longitud de onda de 500-550nm (longitud de onda de la luz verde) y las células muertas con una longitud de onda de 645-700nm (longitud de onda de la luz roja) lo cual permitió realizar el conteo de células vivas y muertas y determinar el porcentaje de viabilidad celular, el porcentaje de viabilidad celular se determinó realizando el conteo total de células vivas y muertas presentes en los pozos y tomando como referencia el total de células que fueron sembradas en un principio en la piel porcina radioesterilizada.

### **Ensayo de Inmunohistoquímica para determinar la migración celular en una quemadura de piel.**

En ensayos realizados anteriormente por nuestro grupo de trabajo, en los cuales a ratones machos atímicos se les genera una quemadura de tercer grado, colocando una placa de cobre caliente durante 10 segundos a 105 °C. Posteriormente se les colocaron los tratamientos de PPR con hADMSC y PPR solo. Los tratamientos se dejaron por siete días. A partir de los cortes histológicos obtenidos de ese experimento se buscó determinar la integración de ADMSC al sitio de la herida, por lo que en este trabajo se realizó el siguiente diseño experimental:

Se utilizaron cortes histológicos de piel de ratón en diferentes condiciones para obtener un control negativo y el experimental, el control positivo se realizó con la fijación de hADMSC a una densidad de 12,000 células/cm<sup>2</sup>. Las condiciones de los cortes histológicos y las células en los pozos fueron las siguientes:

Control negativo = PPR + hADMSC, sin anticuerpo primario y con anticuerpo secundario.

Control negativo= PPR sin células y con anticuerpos primario y secundario.

Experimental= PPR+ hADMSC con anticuerpos primario y secundario.

Control positivo= ADMSC colocando anticuerpos primario y secundario.

Las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo fueron fijadas retirando el medio DMEM F12 de las placas y colocando PFA al 4% por cinco minutos, posteriormente se realizaron tres lavados rápidos con PBS 1X.

*Desparafinación, rehidratación de los cortes histológicos y recuperación del antígeno.*

Las laminillas de cortes histológicos se colocaron en una parrilla a 60°C por 15 minutos, con el fin de desparafinar los cortes. Posteriormente se realizó la rehidratación del tejido de la siguiente manera:

Xilol 1----- 5 minutos.

Xilol 2----- 1 minuto.

Etanol absoluto----- 1 minuto.

Etanol absoluto 2----- 1 minuto.

Etanol al 96% 1----- 1 minuto.

Etanol al 96% 2----- 1 minuto.

Etanol al 80%----- 1 minuto.

Etanol al 70%----- 1 minuto.

Etanol al 60%----- 1 minuto.

Etanol al 50%----- 1 minuto.

Agua----- 1 minuto.

Agua----- 1 minuto.

Tween-20 al 0.1%----- 5 minutos.

Posteriormente las laminillas se sumergieron en citrato de sodio 10 mM pH 6, frío por trece minutos en una olla exprés, con el fin de exponer al antígeno.

### *Permeabilización.*

A partir de aquí los controles positivos y negativos junto con el procedimiento experimental fueron sometidos a los mismos factores.

Se realizaron tres lavados con PSB 1X de cinco minutos cada uno, posteriormente se colocó Triton x-100 al 0.5% en PBS 1X por 10 minutos a temperatura ambiente.

### *Bloqueo.*

Se realizaron tres lavados con PBS1X de cinco minutos cada uno y posteriormente se colocó PBS 1X+ SFB al 1% y Tween-20 al 0.1% durante 90 minutos.

### *Anticuerpo primario.*

Se realizó la incubación con el anticuerpo primario Anti-Mitocondria humana [113-1] ab92824 (abcam®) en proporción 1:250 con solución de bloqueo a 4°C por 24 horas. La utilización de este anticuerpo se debe a que es un anticuerpo específico de una proteína de la membrana interna de la mitocondria de humano, esta proteína es la encargada de formar cristales mitocondriales. Este paso no se le colocó al control negativo de ADMSC + PPR.

### *Anticuerpo secundario.*

Se realizaron tres lavados con PBS1X por 10 minutos y se colocó el anticuerpo secundario Goat Anti Mouse IgG (H+L) (FITC) (Thermo-Fisher, Ref. F-2761) en proporciones 1:200 con PBS 1X y se dejó a temperatura ambiente por 120 minutos.

### *Tinción de núcleos.*

Se realizaron tres lavados con PBS1X por 15 minutos y se utilizó DAPI (Santa Cruz®) en proporción 1:1000 por 20 minutos. Después se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 10 minutos cada uno. Una vez que se concluyó la tinción de núcleos se observó por microscopia de fluorescencia los cortes y las células fijadas, el anticuerpo secundario (Goat Anti Mouse IgG (H+L) (FITC) (Thermo-Fisher)) fue observado con

una longitud de onda de 500 a 550nm (longitud de onda verde) y los núcleos se observaron con una longitud de onda de 470nm (longitud de onda azul).

## 8. Resultados.

Ensayo de migración *In vitro*.

Con el propósito de determinar si las células sembradas sobre la piel de cerdo tenían la capacidad de migrar al sitio de la lesión, los constructos fueron puestos con las células cara a los pozos de cultivo, esto se realizó para los pozos sin tratamiento y con tratamiento de gelatina para emular la matriz extracelular en una herida y cuantificar las células que llegaban a los pozos. Al realizar las pruebas de viabilidad y realizando el conteo celular utilizando calceína y Homodímero de etidio, se obtuvo un mayor promedio en el número de células vivas y muertas presentes en los pozos que fueron tratados previamente con medio DMEM-F12 + gelatina al 0.15%, que en los pozos que solo tenían medio DMEM-F12. Obteniendo de esta manera en el tratamiento de DMEM/F12 un promedio de células vivas de 231 células con una desviación estándar de 7.3 y un promedio de células muertas de 162 con una desviación estándar de 6.5. Por otra parte, en el tratamiento de DMEM-F12 + gelatina al 0.15%, se obtuvo un promedio de células vivas de 1178 células con una desviación estándar de 4.6 y un promedio de células muertas de 371 células con una desviación estándar de 1.1 (Tabla 1 y gráfica 1). Con base en lo anterior se aplicó una prueba de t para datos pareados y así determinar si existían diferencias significativas entre los resultados de viabilidad de ambos tratamientos, obteniendo como resultado que si existen diferencias significativas en los resultados de viabilidad de ambos tratamientos, ya que el valor de P obtenido es de 0.0173, es decir menor  $P < 0.05$ .

A partir de los datos anteriores se obtuvo el porcentaje de células vivas y muertas con respecto del total encontradas en los pozos, obteniendo que el porcentaje de células vivas y muertas en el medio DMEM-F12 corresponde a 58.77% y 41.22% respectivamente, por su parte el tratamiento de DMEM-F12 + 0.15% de gelatina obtuvo un porcentaje de células vivas y muertas de 78.05% y 23.95% respectivamente (Tabla 2) (gráfica 2). También se obtuvo el porcentaje de células vivas y muertas con respecto del inicial sembradas, es decir que porcentaje de células se encontraron en los pozos con respecto de las 60,000 células sembradas

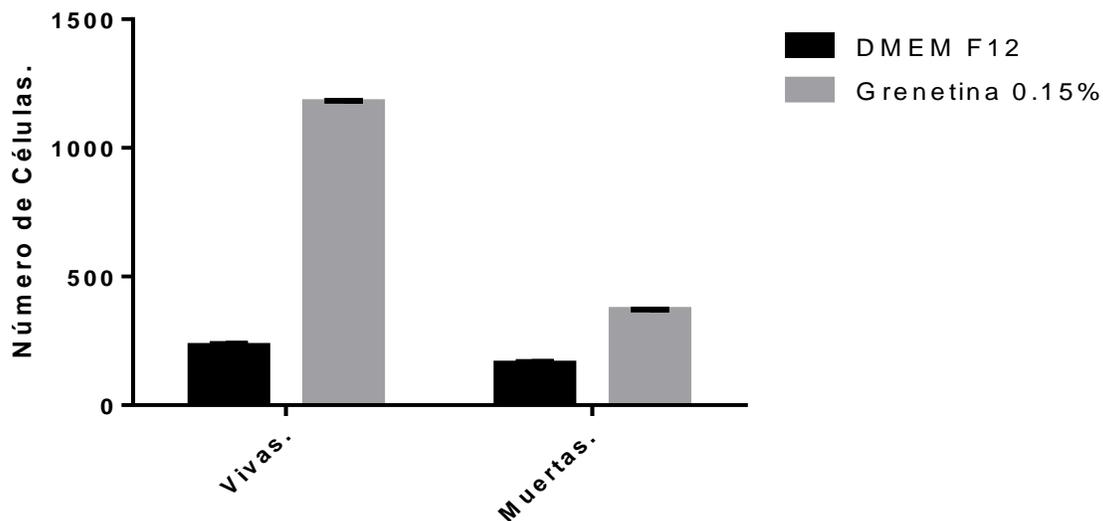
inicialmente, obteniendo que solo el 0.38% de las células sembradas inicialmente lograron adherirse a la PPR y migrar en el tratamiento DMEM-F12 y un 0.27% de células lograron adherirse a la PPR, pero se encontraron muertas al finalizar el experimento, lo que quiere decir que el 99.35% de células no se adhirieron al parche y se quedaron en el pozo inicial o que se quedaron adheridas a los parches, no llevando a cabo el proceso de migración y por lo tanto no fue posible realizar el conteo, mientras que en el tratamiento de DMEM-F12 + 0.15% de gnetina, se obtuvo que el 1.96% del total sembradas se encontraron vivas al finalizar el experimento y el 0.62% con respecto del total sembradas inicialmente fueron encontradas muertas, es decir que esa células lograron adherirse y migrar, pero no sobrevivir y adherirse al nuevo medio (Tabla 2 y gráfica 2). Con respecto a lo anterior podemos determinar que el 97.42% de las células que fueron sembradas inicialmente se quedaron adheridas en el parche o se desprendieron en los primeros pozos.

En las imágenes obtenidas por medio de microscopia de fluorescencia se logra observar un número mayor de células vivas en el tratamiento que tenía gelatina al 0.15%. En ninguno de los dos tratamientos las células exhiben una morfología fibroblastoide, propia de las hADMSC (fig. 13). Mientras que en las imágenes obtenidas por medio de microscopia de fluorescencia realizadas en la PPR se logran observar células adheridas y con morfología fibroblastoide, de esta manera se prueba que existe una porción de células troncales que se quedan adheridas a la PPR (fig. 14).

	<b>DMEM-F12</b>	<b>DMEM-F12 + 0.15% gnetina</b>
<b>Células Vivas.</b>	230.6 ± 7.3	1178 ± 4.6
<b>Células Muertas.</b>	162 ± 6.5	371 ± 1.1

Tabla 1. Se presenta el promedio de células vivas y muertas de los dos tratamientos probados y sus respectivas desviaciones estándar. El promedio fue obtenido promediando las medias de cada repetición (3 repeticiones), de igual manera la desviación estándar mostrada se calculó a partir de las medias de cada repetición.

### Número de células presentes en los pozos.

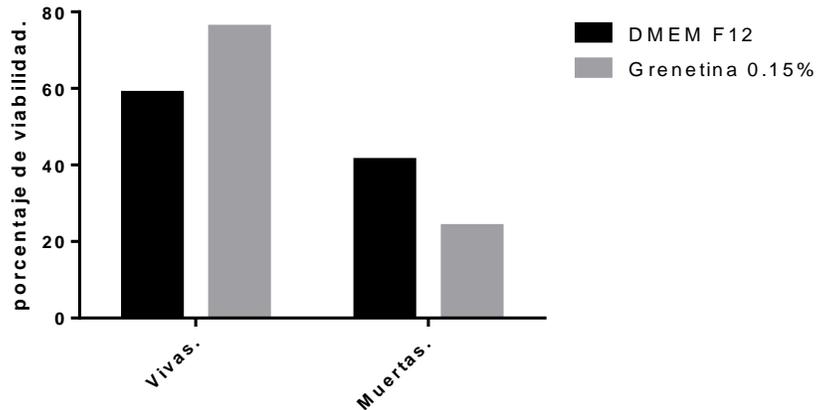


Gráfica 1. Se muestra el número promedio de células vivas y muertas de los dos tratamientos utilizados. Obteniendo en el tratamiento DMEM-F12 un promedio de células vivas y muertas de 230 con una desviación estándar de 7.3 y 162 con una desviación estándar de 6.5 respectivamente. Mientras que en el tratamiento de DMEM-F12 con 0.15% de grenetina se obtuvo un promedio de células vivas y muertas de 1178, con una desviación estándar de 4.6 y 371, con una desviación estándar de 1.1 respectivamente.

	DMEM F-12	DMEM-F12+0.15% gelatina
<b>Porcentaje de células vivas con respecto del total encontradas en los pozos.</b>	58.77%	76.05%
<b>Porcentaje de células muertas con respecto del total encontradas en los pozos.</b>	41.22%	23.95%

Tabla 2. Se muestra el porcentaje de células vivas y muertas con respecto del total encontradas en los pozos. Los porcentajes fueron obtenidos tomando en cuenta el promedio de células vivas y muertas en cada tratamiento y el total fue la suma de ambos promedios.

**Porcentaje de viabilidad respecto del total de células encontradas en los pozos**

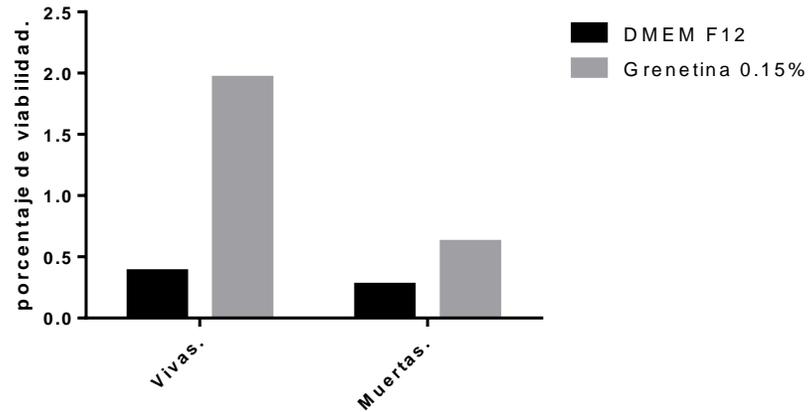


Gráfica 2. Se muestra el porcentaje de viabilidad respecto del total de células encontradas en los pozos para cada tratamiento. El porcentaje se obtuvo tomando en cuenta el promedio de células vivas y muertas, y el total se obtuvo al sumar el promedio de células vivas y muertas de cada tratamiento.

	<b>DMEM-F12.</b>	<b>DMEM-F12 + 0.15% grenetina.</b>
<b>Porcentaje de células vivas con respecto del total sembradas inicialmente.</b>	0.38%	1.96%
<b>Porcentaje de células muertas con respecto del total sembradas inicialmente.</b>	0.27%	0.62%
<b>Porcentaje de células no encontradas en los pozos.</b>	99.35	97.42

Tabla 3. Se muestra el porcentaje de células vivas y muertas presentes con respecto del total de células sembradas inicialmente en el tratamiento DMEM-F12 y en el tratamiento DMEM-F12+ 0.15% grenetina. También se muestra el porcentaje de células que se quedaron adheridas en la PPR o se perdieron durante el procedimiento. Los porcentajes fueron obtenidos tomando en cuenta el promedio de células vivas y muertas de cada tratamiento y como total las 60,000 células sembradas inicialmente en la PPR.

**Porcentaje de células vivas y muertas con respecto del total sembradas (60000).**



Gráfica 3. Se muestra el porcentaje de células vivas y muertas con respecto del total sembradas inicialmente. Para obtener este porcentaje se utilizó el promedio de células vivas y muertas de cada tratamiento y como total las 60,000 células sembradas inicialmente sobre la PPR.

## Pruebas de viabilidad.

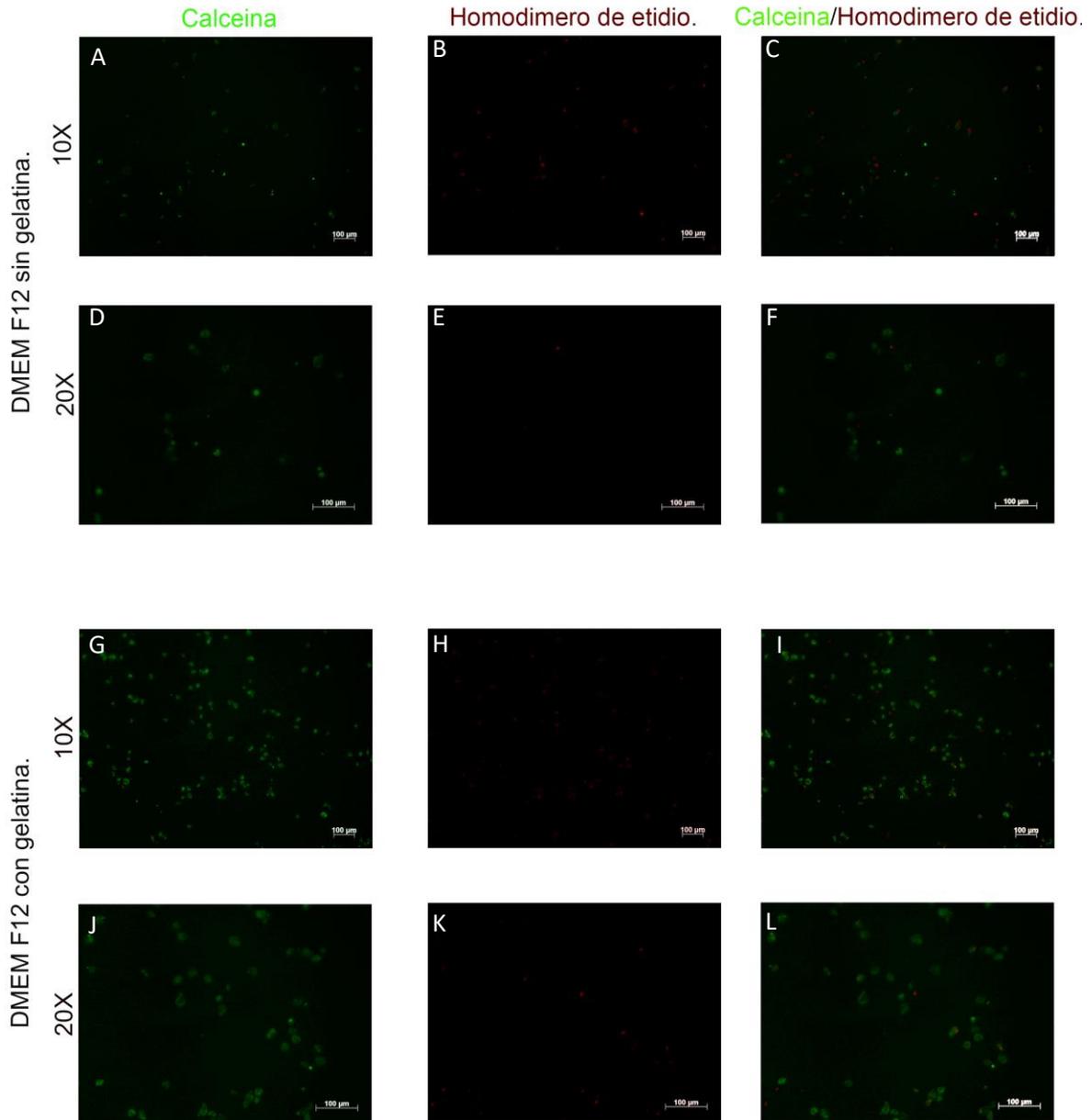


fig. 13. Se muestran las pruebas de viabilidad de las células troncales derivadas de tejido adiposo. Las imágenes correspondientes a la letra A, B, C, D, E y F son imágenes tomadas en los aumentos 10X y 20X y corresponden a la condición: DMEM F12+ SFB y Antibiotico/antimicótico. Mientras que las imágenes correspondientes a la letra G, H, I, J, K y L, son imágenes tomadas en los aumentos 10X y 20X respectivamente y corresponden a la condición DMEM F12+SFB+ antibiotico/antimicótico+0.15% grenetina. Las imágenes que corresponden a las letras A, D, G y J muestran solo las células vivas, mientras que las imágenes B, E, H y K muestran las células muertas. Por último, las imágenes correspondientes a las letras C, F, I y L muestran las células vivas y muertas.

## Prueba de viabilidad. Piel Porcina Radioesterilizada.

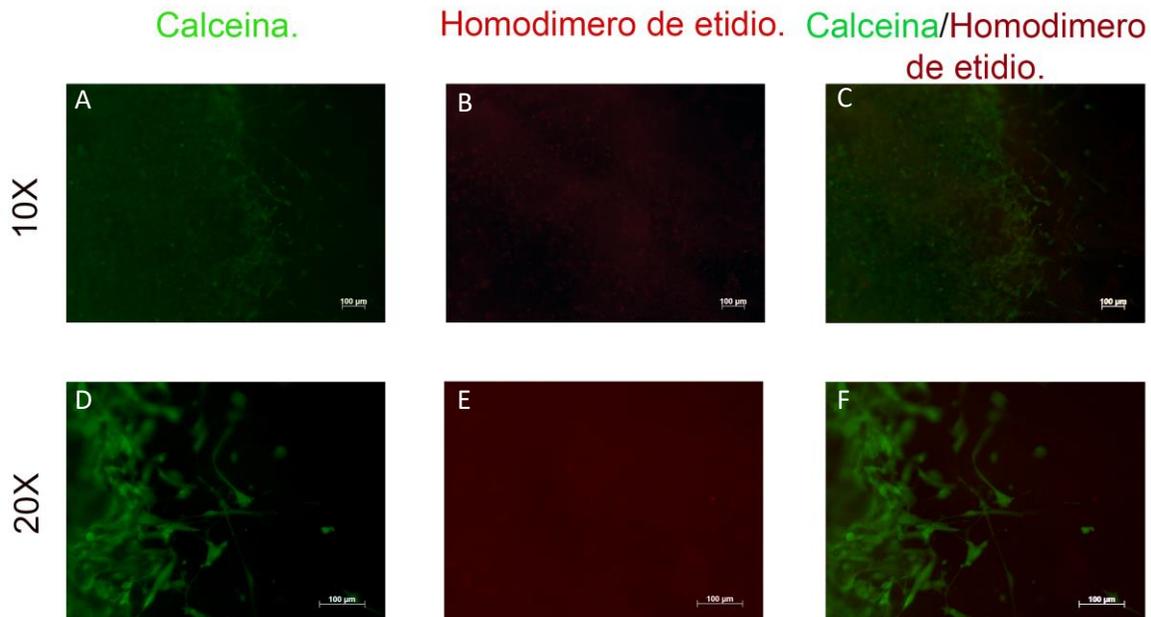


fig. 14. Se muestran pruebas de viabilidad con calceína y homodímero de etidio realizadas a los apósitos de PPR+ADMSC. Mostrando que existen células que se quedan adheridas en la PPR, es decir células que no migran. En la imagen A y D se muestran las células vivas utilizando calceína, mientras que en las imágenes B y E se muestra las imágenes correspondientes a homodímero de etidio y por último en la imagen C y F se muestran las células vivas teñidas de verde (Calceína) y las muertas de rojo (homodímero de etidio).

### **Inmunohistoquímicas.**

Con el fin de poder determinar si las células troncales derivadas de tejido adiposo tienen la capacidad de migrar de la piel porcina radio esterilizada, al sitio de una lesión de piel, se utilizó un anticuerpo primario específico para células de humano (anti-mitochondria [113-1]) y de esta manera poder determinar si en un modelo *in vivo* las hADMSC son capaces de migrar a los 7 días posteriores de haberse realizado la quemadura y colocarse el tratamiento. En el diseño experimental se colocó un control positivo el cuál era un cultivo celular de hADMSC, en el cual se esperaba ver expresado el anticuerpo primario, ya que el anticuerpo anti-mitochondria [113-1] es un anticuerpo específico de una proteína de la membrana interna de la mitocondria de humano, está proteína es la encargada de formar cristales mitocondriales, por lo tanto, se esperaba observar la expresión del

anticuerpo perfectamente. Un control negativo el cuál correspondía a un corte histológico de quemadura de ratón a los 7 días en el cual solo se colocó la PPR y por último el experimental, en el cual se colocó como tratamiento la piel porcina radio esterilizada y las hADMSC.

En el control positivo se logró observar una notable expresión del anticuerpo primario, es posible observar la forma de la proteína mitocondrial, la cual es descrita con forma de cristales, así como también fue posible realizar la tinción de los núcleos (Fig. 15). Por su parte en el control negativo se obtuvo el resultado esperado, ya que solo es posible observar la tinción de los núcleos y en la imagen correspondiente a la tinción del anticuerpo primario no se logra observar nada (Fig. 16). En el corte experimental, se logra ver como en una sección de la epidermis se presenta la expresión del anticuerpo primario, justo en donde se presenta la tinción de los núcleos con DAPI, sin embargo, no se logra observar una gran cantidad de señal correspondiente a la expresión del anticuerpo primario, ni tampoco se observa la proteína como en el control positivo (Fig. 17).

## Cultivo celular de ADMSC.

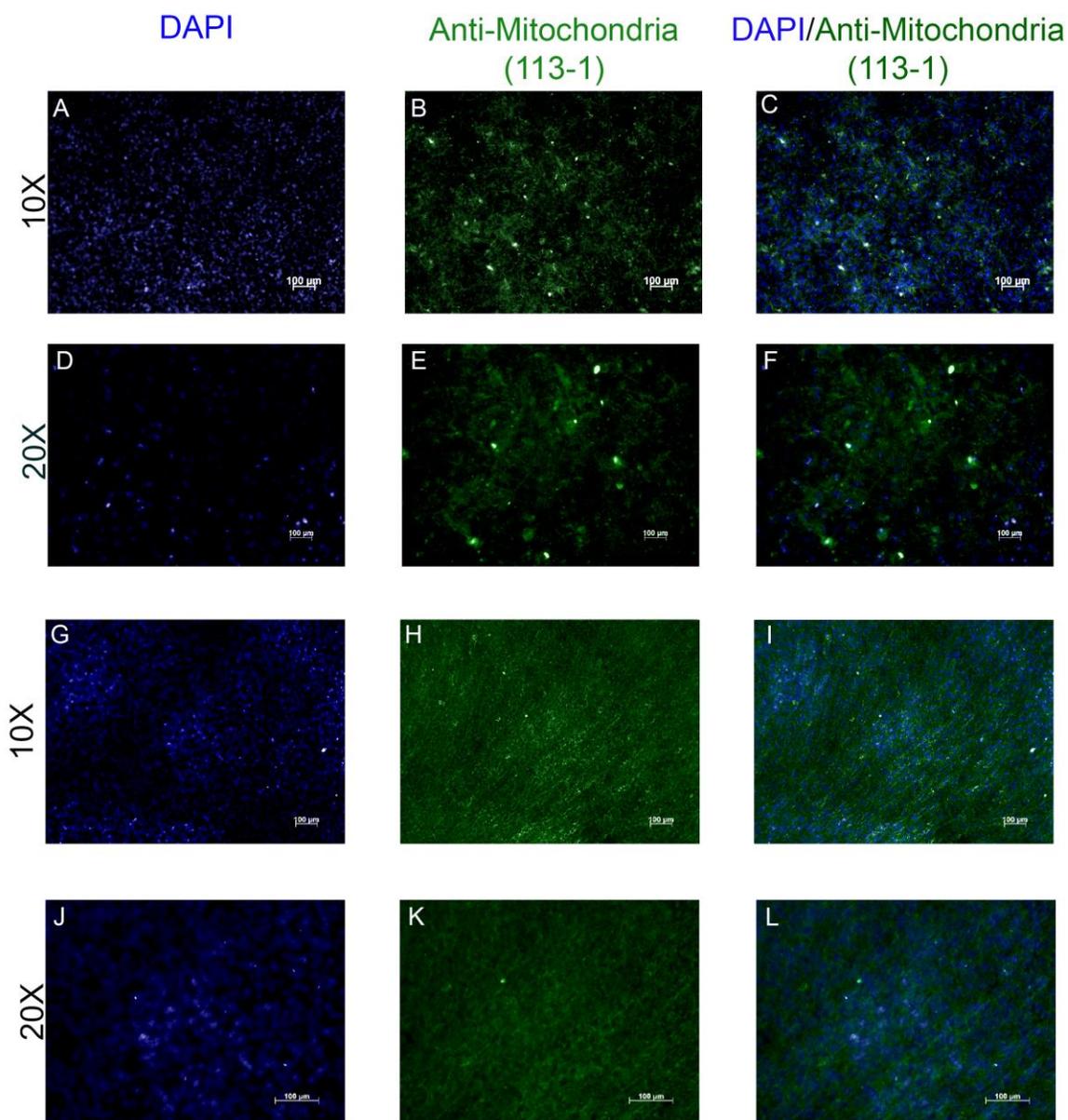


fig. 15. Se muestra un cultivo celular realizado con células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo fijadas con PFA al 4%. En la imagen A y D se muestra la tinción realizada con DAPI en un aumento de 10X y 20X respectivamente, en la imagen B y E se muestra la fluorescencia del anticuerpo Anti.Mitochondria [113-1] en un aumento de 10X y 20X respectivamente y por último en la imagen C y F se observa la tinción de núcleos más la presencia del Anticuerpo Anti Mitochondria [113-1].

## Piel de ratón.

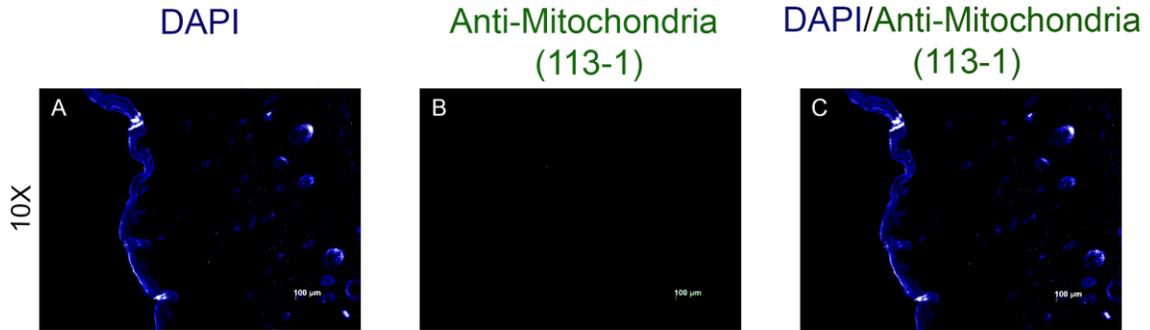


fig. 16. Muestra cortes histológicos de piel de ratón, el cual corresponde a la piel porcina radioesterilizada sin la presencia de células troncales mesénquimales derivadas de tejido adiposo. En la imagen A se observa la tinción de núcleos con DAPI, en la figura B se muestra la tinción con Anti-Mitochondria [113-1] y en la figura C se muestra la tinción con DAPI y con el anticuerpo Anti.Mitochondria [113-1].

## Evaluación de la migración *in vivo*.

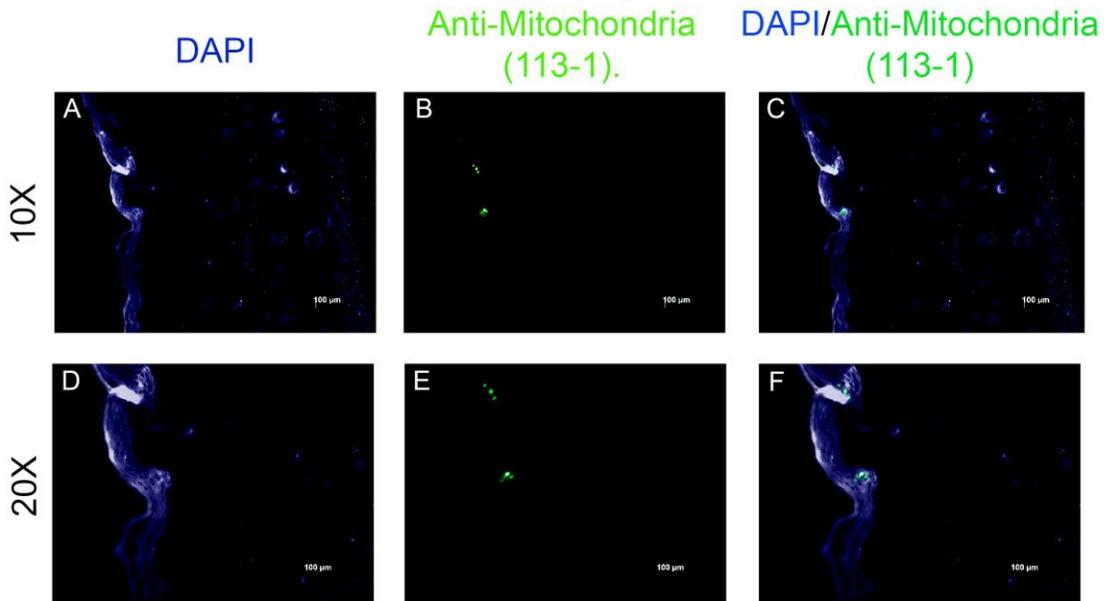


fig. 17. Evaluación de la migración *in vivo*. representan dos cortes de la muestra experimental, en la cual las condiciones eran PPR+ hADMSC. En la imagen A y D se observa la tinción con DAPI a un aumento de 10X y 20X respectivamente. En la imagen B y E se observa la tinción con el anticuerpo Anti Mitochondria [113-1]. y por último en la imagen C y F se muestra la tinción con DAPI+ Anti Mitochondria [113-1].

## 9. Discusión.

Actualmente existen pocos productos para dar terapia celular, por lo tanto, es un campo poco explorado, debido a esto es necesario buscar el desarrollo de alternativas y así poder dar mejores soluciones en el ámbito médico. En este trabajo se evaluó la capacidad de la piel porcina radio esterilizada de ser el medio por el cual las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo de humano migren a partir de la misma y lleguen al sitio de una quemadura en la piel. De esta manera determinar si existe la posibilidad de que en un futuro se pueda utilizar como un producto para dar terapia celular.

Los resultados obtenidos a partir del ensayo *in vitro* prueban que la piel porcina radio esterilizada es un material biomimético que permite que las hADMSC se adhieran, además de contar con dicha capacidad, la PPR permite que un mínimo porcentaje de células migren a sitios que expresan ciertas señales, tal podría ser el caso de los grupos funcionales de la colágena contenida en la gelatina. Hace falta realizar más pruebas para poder demostrar que la migración de dichas células haya sido impulsada por los grupos funcionales presentes en la colágena, ya que pudo deberse a un desprendimiento durante el proceso y no por la interacción entre las hADMSC y la gelatina. Sin embargo, en otros estudios similares con otros tipos celulares, las matrices de colágena proporcionan una estructura mecánica y señales bioquímicas que benefician la señalización celular y la migración (Rhee, 2009), lo que podría estar beneficiando a que las ADMSC encontradas en los pozos se deban a dichas señales. Además, específicamente se ha observado que la gelatina (la cual es un derivado de colágena) permite la adhesión y crecimiento de las células troncales mesenquimales (MSC) (Zhou, 2016). Debido a lo anterior se puede suponer que en un medio que sea capaz de generar señales celulares, es más probable que el proceso de migración se lleve a cabo, tal sería el caso de una herida. En este experimento se logró observar que en la piel porcina radio esterilizada se quedaban adheridas hADMSC, esto podría ser bueno, ya que algunos autores han mencionado que una característica a considerar en un andamio celular, es que permita servir como vehículo de entrega o depósito para señales exógenas de estimulación de crecimiento celular (Chan, 2008), en este sentido las células aún

adheridas a la PPR, pueden ser capaces de liberar factores de crecimiento e influir en la generación de matriz extracelular. Otros autores han mencionado que un buen andamio debe permitir la adhesión celular, permitir la migración a otras superficies a través del andamio y finalmente permitir la proliferación (O'brien, 2011), y la PPR cumple con estas características por lo que podría decir que es un buen andamio. Además de lo mencionado anteriormente, también se logró identificar mediante las pruebas inmunohistoquímicas la migración de las hADMSC en un experimento *in vivo*, ya que al utilizar el anticuerpo anti-mitochondria (113-1) el cual es un anticuerpo primario específico de humano se obtuvieron resultados similares en la muestra experimental (quemadura de piel tratada con piel porcina radio esterilizada con hADMSC) y en el control positivo (hADMSC provenientes de humano), de esta manera comprobamos que las células de humano estaban presentes en ambos casos. Estos resultados son favorables ya que refuerzan la idea de que las señales bioquímicas generadas durante una herida pueden estar generando que se dé la migración celular a través de la PPR. Las presencias de estas células en la piel de nuestros modelos *in vivo* podrían llegar a acelerar el proceso de reparación de la piel tal como se ha visto en otros experimentos donde solo utilizan ADMSC en heridas (Brooke, 2007). Estas células posiblemente se diferenciarán tal como lo hacen algunas células multipotentes de origen mesenquimal presentes en la dermis, cuando dan origen a queratinocitos y así ayudar en la reepitelización de la piel (Lau, 2009). Además de estar involucradas en la señalización paracrina la cual regula las respuestas celulares en el sitio de la herida, lo que conduce a la reducción de la inflamación, la estimulación del angiogénesis y la inducción de la migración y proliferación celular (Sanjari, 2015). En estas mismas pruebas también se incluyó un control negativo, el cual estaba conformado por una quemadura de piel a la cual solo se le puso como tratamiento la piel porcina radio esterilizada, en este control no se logró observar la presencia del anticuerpo por medio de fluorescencia, lo cual nos indica que no hay pegado inespecífico que pudiera estar creando ruido en nuestros resultados del modelo experimental. Los resultados obtenidos mediante estas pruebas corresponden a lo mencionado en la hoja técnica del producto ya que, en el control positivo, se logra observar la presencia de las crestas

mitocondriales, en las cuales se encuentra la proteína a la cual se pega el anticuerpo primario.

## **10. Conclusión.**

La piel porcina radio esterilizada es una excelente matriz para el cultivo de hADMSC que permite la migración de un pequeño porcentaje de las células hacia el lecho de una herida.

La migración de las hADMSC a partir de la PPR hacia el lecho de la herida en un modelo *in vivo* es relativamente baja, sin embargo, es necesario evaluar si existe una diferencia en la reparación de las heridas en comparación con otros métodos utilizados para la reparación de la misma. También sería necesario realizar un seguimiento a mayor tiempo para poder determinar si las ADMSC que migran son capaces de integrarse y diferenciarse a algún tipo celular propio de la epidermis.

Es necesario tener en cuenta que el 2% de migración celular con respecto del total sembradas es un porcentaje muy bajo, sin embargo, se debe analizar si las células adheridas a la PPR logran ayudar en la síntesis de matriz extracelular o en la generación de factores de crecimiento, ya que si cumple con estos requerimientos podría ser una buena alternativa para el tratamiento de las quemaduras.

Este apósito biológico podría convertirse en un futuro en una herramienta biotecnológica para el tratamiento de quemaduras, ya que, en las pruebas tanto *in vivo*, como *in vitro* se logró observar la migración y la viabilidad de las células, demostrando así que es un buen andamio.

## 11. Referencias.

- AITEX . (2017). Obtenido de aitex textile research institute:  
<http://www.aitex.es/nanofibras-de-polimeros-biocompatibles-para-aplicaciones-medicas-en-la-regeneracion-dermica-parte-1-3/>
- Aragona, M., Dekoninck, S., Rulands, S., Lenglez, S., Mascré, G., Simons, B. D., & Blanpain, C. (2017). Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. *Nature Communications*, 8, 14684.
- Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*, 32(1), 3-13.
- Arias, J. (1999). *Fisiopatología quirúrgica*. Editorial Tebar.pág.107
- Alitalo, K., Kuismanen, E., Myllylä, R., Kiistala, U., Asko-Seljavaara, S., & Vaheri, A. (1982). Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells. *The Journal of cell biology*, 94(3), 497-505.
- Baek, S. J., Kang, S. K., & Ra, J. C. (2011). In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Experimental & molecular medicine*, 43(10), 596.
- Biehl, J. K., & Russell, B. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of cardiovascular nursing*, 24(2), 98.
- Brooke, G., Cook, M., Blair, C., Han, R., Heazlewood, C., Jones, B., ... & Rice, A. (2007, December). Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 18, No. 6, pp. 846-858). Academic Press.
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal*, 17(4), 467-479.
- Debeer, S., Le Ludec, J. B., Kaiserlian, D., Laurent, P., Nicolas, J. F., Dubois, B., & Kanitakis, J. (2013). Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *European Journal of Dermatology*, 23(4), 456-466.
- Eizaguirre, B. G. (1999). *Manual Básico para gerocultores y auxiliares geriátricos* (Vol. 5). Cáritas Española.pág.453.
- Enrich, A. M. L. (2000). *Catálogo de apósitos estériles modernos 2000*. Edicions Universitat Barcelona.pág.19.
- Fainboim, L., & Geffner, J. (2005). *Introducción a la inmunología humana*. Ed. Médica Panamericana.pp. 11-12
- Fitzpatrick, T. B. (2009). *Dermatología en medicina general* (Vol. 1). Ed. Médica Panamericana.
- Gilbert, S. F. (2005). *Biología del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana. pág. 445.
- Green, M. R., & Couchman, J. R. (1984). Distribution of epidermal growth factor receptors in rat tissues during embryonic skin development, hair formation, and the adult hair growth cycle. *Journal of investigative dermatology*, 83(2), 118-123.

- Hess, C. T. (2012). *Clinical guide to skin and wound care*. Lippincott Williams & Wilkins.pág.12
- Holbrook, K. A., Byers, P. H., & Pinnell, S. R. (1982). The structure and function of dermal connective tissue in normal individuals and patients with inherited connective tissue disorders. *Scanning electron microscopy*, (Pt 4), 1731-1744.
- Igarashi, T., Nishino, K., & Nayar, S. K. (2007). *The appearance of human skin: A survey*. *Foundations and Trends® in Computer Graphics and Vision*, 3(1), 1-95.
- Kalra, K., & Tomar, P. (2014). Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 27, 919-930.
- Krause, W. J. (2005). *Krause's essential human histology for medical students*. Universal-Publishers. pág. 149.
- Kühnel, W. (2005). *Atlas color de citología e histología*. Ed. Médica Panamericana. pág. 597.
- Kumar, N., Desagani, D., Chandran, G., Ghosh, N. N., Karthikeyan, G., Waigaonkar, S., & Ganguly, A. (2017). Biocompatible agarose-chitosan coated silver nanoparticle composite for soft tissue engineering applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1-13.
- Laredo-Naranjo, M. A., Carrillo-Gonzalez, R., De La Garza-Ramos, M. A., Garza-Navarro, M. A., Torre-Martinez, H. H., Del Angel-Mosqueda, C., ... & Carrillo-Fuentevilla, R. (2016). Antimicrobial properties and dental pulp stem cell cytotoxicity using carboxymethyl cellulose-silver nanoparticles deposited on titanium plates. *Acta Biomaterialia Odontologica Scandinavica*, 2(1), 60-67.
- Lourdes, R. F. M., Candelaria, G. V., Miguel, F. A., Javier, P. R., Daniel, R. B., & Dolores, R. U. M.(2001). Apósitos de Piel de Cerdo Deshidratados por Liofilización.
- Lau, K., Paus, R., Tiede, S., Day, P., & Bayat, A. (2009). Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental dermatology*, 18(11), 921-933.
- Montagna, W. (2012). *The structure and function of skin*. Elsevier.
- Morales, J., Morán, J., Quintana, M., & Estrada, W. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(2), 177-184.
- Navarrete Franco, G. (2009). Histología de la piel. *Revista de la Facultad de Medicina*, 46(004).
- O'brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 14(3), 88-95.
- OMS. (Agosto de 2017). Organización Mundial de la Salud.
- Rhee, S. (2009). Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Experimental & molecular medicine*, 41(12), 858.
- Rojewski, M. T., Weber, B. M., & Schrezenmeier, H. (2008). Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(3), 168-184.

- Ross, F. P., & Christiano, A. M. (2006). Nothing but skin and bone. *The Journal of clinical investigation*, 116(5), 1140-1149.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.pág.485
- Sadler, T. W., & Langman, J. (2007). *Embriología médica: con orientación clínica*. Ed. Médica Panamericana. pág. 347.
- Salem, C., Pérez, J. A., & HENNING, E. (2000). Heridas: conceptos generales. *Cuad. cir.(Valdivia)*, 14(1), 90-99.
- Sánchez-Sánchez, R., Brena-Molina, A., Martínez-López, V., Melgarejo-Ramírez, Y., de Dios, L. T., Gómez-García, R., ... & Ibarra, C. (2015). Generation of two biological wound dressings as a potential delivery system of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Asaio Journal*, 61(6), 718
- Sanjari, T., Hajjar, T., & Momeni-Moghaddam, M. (2015). The Role of Mesenchymal Stem Cells in Skin Wound Healing. *Journal of Cell and Molecular Research*, 7(2), 70-75.
- Shimizu, H. (2017). Disorders of skin color. *Shimizu's Dermatology*, pág 14.
- Sifontes, Á. B., Melo, L., Maza, C., Mendes, J. J., Mediavilla, M., Brito, J. L., ... & Albornoz, A. (2010). Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polímeros estabilizantes. *Quim. Nova*, 33(6), 1266-1269.
- Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10), 738-746.
- Tapia, F. L. (2007). *TCAE en la unidad de quemados*. Editorial Vértice.pp. 43-47.
- The Walker Morgan Law firm. (2017). *Walker Morgan LLC / Nationally Recognized Burn Injury Lawyers*.
- Tizard, I. R. (2009). Introducción a la inmunología veterinaria, Ian R. Tizard.
- Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. *Advances in wound care*, 4(3), 119-136
- Welsch, U., & Sobotta, J. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.pp.556-557, 550
- Zhou, N., Liu, C., Lv, S., Sun, D., Qiao, Q., Zhang, R., ... & Sun, G. (2016). Degradation prediction model and stem cell growth of gelatin-PEG composite hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(12), 3149-3156.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211–226