



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Título: Análisis de la viabilidad celular y de la liberación del factor de crecimiento fibroblástico de fibroblastos cultivados sobre piel porcina radioesterilizada e impregnada con nanopartículas de plata.

Tesis presentada para obtener el grado de: Licenciatura en Medicina

Presenta: Carlos Martin Torre Morales

Director experto: D.C.
Roberto Sánchez Sánchez

Directora metodológica: Dra.
Silvia Elena Enríquez Cruz

Ciudad de México 03 de octubre 2023

Índice

Contenido

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Piel.....	7
Histología de la Piel.....	7
Epidermis.....	8
Dermis	10
Quemaduras	12
Clasificación de las heridas por quemadura	13
Reparación de las heridas	14
Cicatrización en quemaduras.....	15
Factores de crecimiento en la reparación de la herida.....	16
Factor de crecimiento fibroblástico (FGF).....	18
FGF en la reparación de tejidos.....	20
Tratamiento de heridas por quemadura	23
Primeros auxilios y tratamiento inmediato.....	23
Tratamiento en centro de quemados.....	25
Estándar de oro	26
Las coberturas de piel.....	27
Clasificación de las coberturas de piel	29
El cerdo como xenotransplante.....	33
Similitudes histológicas entre el cerdo y el ser humano.....	34
Coberturas de piel de cerdo para el cuidado de las heridas por quemaduras	38
Antecedentes.....	42
Cultivo celular sobre piel porcina radioesterilizada (PPR)	42
Las nanopartículas de plata (AgNPs)	45
Mecanismo de acción	46
Cultivo celular sobre piel porcina radioesterilizada e impregnada con nanopartículas de plata (nanocompuesto).....	48
Planteamiento del problema	50

Objetivos.....	52
Objetivo general	52
Objetivos específicos.....	52
Material y métodos.	52
Recursos Materiales.....	52
Métodos	54
Resultados.....	60
Discusión.	65
Conclusiones.....	66
Bibliografía.....	67
Anexos	75

Resumen.

Antecedentes: La piel de porcina radioesterilizada (PPR) se utiliza como apósito para quemaduras, su similitud con la piel humana la hace ideal para su uso como andamio para ingeniería de tejidos, previamente se generaron constructos en ella cultivando células troncales mesenquimales (MSC) evidenciando alta viabilidad, su aplicación en un modelo de animal de quemaduras mostró un mejor cierre de la herida y mayor deposición de colágeno tipo I. Ante las infecciones en las heridas, el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) es una alternativa al uso de antibióticos y una solución contra bacterias multidrogaresistentes. La PPR impregnada con AgNPs es un nanomaterial (Nm) capaz de prevenir infecciones. Los fibroblastos son las células encargadas de reparar la dermis, por lo que es importante elucidar si estas células pueden cultivarse sobre PPR y esta a su vez inducir la secreción del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el cual promueve la reparación de la piel. Los constructos en conjunto con los Nm podrían generar un tratamiento integral para las quemaduras.

Objetivo: Analizar si la PPR impregnada con AgNPs permite la viabilidad de fibroblastos y si promueve la liberación de FGF.

Material y Métodos: La PPR se impregnó con AgNPs a una concentración de 125 ppm. Se cultivaron fibroblastos hasta alcanzar una densidad celular adecuada, de modo que se sembraron 40,000 células en 10 μ l de medio de cultivo DMEM F-12 suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 1 % de antibiótico en cada repetición de las condiciones experimentales. Se llevaron a cabo dos tipos de ensayos para evaluar la viabilidad celular: un ensayo de Calceina/Ethd-1 con evaluación visual mediante microscopio fluorescente y un ensayo MTT con medición de la absorbancia a 570 nm sin corrección de longitud de onda. La concentración de FGF se determinó mediante ensayo ELISA. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism 8.

Resultados: Los análisis de Calceina/Ethd-1 y MTT revelaron que los fibroblastos se adhieren al andamio impregnado y, al mismo tiempo, mantienen una viabilidad celular adecuada. Por otro lado, el análisis ELISA demostró que el andamio impregnado no altera la concentración de FGF en los sobrenadantes.

Conclusión: En resumen, los resultados indican que la PPR impregnada es un sustrato viable que permite el cultivo de fibroblastos, aunque se observaron algunas modificaciones en la morfología celular. Además, se constató que la impregnación de la PPR no afecta la concentración de FGF en el sobrenadante.

Introducción.

Las quemaduras constituyen un problema de salud significativo a nivel mundial, con millones de pacientes afectados anualmente, tal como lo destaca la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1). En países como México, las cifras de casos reportados son alarmantes, evidenciando la magnitud del impacto de esta afección en la población (2).

El tratamiento de pacientes quemados conlleva costos elevados, especialmente en casos graves que requieren intervenciones complejas (2). Aunque el autoinjerto ha sido el Estándar de Oro en el tratamiento de quemaduras a partir del Grado II B (3), existen limitaciones cuando la superficie corporal quemada es extensa o las condiciones del paciente no permiten este procedimiento quirúrgico. En este contexto, la búsqueda de opciones terapéuticas efectivas y accesibles se vuelve crucial.

La utilización de piel de cerdo como cobertura para heridas quemadas ha ganado interés debido a sus similitudes histológicas y citológicas con la piel humana (4). La presencia de fibras de colágeno, reticulares y elásticas similares a las de la piel humana hace que la piel de cerdo sea una alternativa prometedora para la cobertura de heridas en pacientes quemados. En el proceso de reparación de heridas, los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) desempeñan un papel crucial, promoviendo la activación, migración, proliferación y diferenciación de las células que participan en este proceso (5). Su secreción está directamente relacionada con la eficacia de la reparación de la herida. En el contexto de las quemaduras, las infecciones representan una preocupación importante (6), ya que pueden retrasar la cicatrización y aumentar la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Es aquí donde las nanopartículas de plata, con sus propiedades antimicrobianas bien documentadas, presentan una ventaja significativa (7).

El presente trabajo de investigación se enfoca en evaluar el potencial terapéutico de la piel de cerdo radioesterilizada (PPR) como un andamio para el cultivo de fibroblastos, así como su capacidad para estimular la liberación de FGFb. Además, se examinará el impacto de la impregnación de la PPR con nanopartículas de plata (PPR+AgNPs) en la secreción de FGFb y la viabilidad celular.

Los objetivos específicos incluyen procesar la PPR y la PPR+AgNPs, cultivar fibroblastos sobre ambas superficies, obtener los sobrenadantes de los cultivos, evaluar la viabilidad celular y analizar la concentración de FGF mediante ensayos de ELISA. Los resultados se someterán a un análisis estadístico y se compararán con la hipótesis planteada. Con este estudio, se espera proporcionar información relevante sobre la viabilidad y el potencial terapéutico de la PPR y la PPR+AgNPs como opciones prometedoras para la cobertura de heridas en pacientes quemados. Los resultados obtenidos podrían abrir nuevas perspectivas en el tratamiento de quemaduras, mejorando la calidad de vida de los pacientes y reduciendo los costos asociados a esta afección.

La piel es un órgano esencial con funciones protectoras y regenerativas. Las quemaduras, lesiones graves que pueden afectar múltiples capas de la piel, requieren una reparación efectiva para mantener la viabilidad y función tisular. El factor de crecimiento fibroblástico (FGF) desempeña un papel clave en la reparación celular y la regeneración. En este contexto, las coberturas y tratamientos innovadores se han explorado para mejorar la recuperación de quemaduras, y las nanopartículas de plata han destacado por sus propiedades antimicrobianas. La piel porcina, dada su homología con la piel humana, se ha considerado como una alternativa para la reparación cutánea. El cultivo celular sobre piel porcina radioesterilizada (PPR) y su impregnación con nanopartículas de plata presentan perspectivas prometedoras, facilitando la reparación y previniendo infecciones en heridas por quemaduras.

Piel

La piel es el órgano más grande, constituye cerca de un 15 – 20% de la masa corporal total. (8). Es la principal interfase entre el medio externo e interno, actúa como barrera que protege al cuerpo ante agentes mecánicos, químicos y biológicos; contribuye a mantener la homeostasis del cuerpo (9 - 13)

Histología de la Piel

A la piel la conforman 3 cubiertas y sus derivados. Las cubiertas son la epidermis, la capa más superficial de la piel, la dermis, capa intermedia constituida por tejido conjuntivo laxo y; la hipodermis, constituida por tejido adiposo. (8, 9, 12, 14.). Estudios proteómicos de la piel microdisecionada han encontrado un rango de 155 – 175 proteínas diferentes en la piel, con los principales constituyentes las colágenas (tipos I, II, III, IV, XII, y XIV). Proteínas de la matriz extracelular (elastina, lumicano, mimecano, prolargina, periotina, decorina), queratinas (citoesqueleto tipo I: 9, 10, 13, 14, 15, 16) y (citoesqueleto tipo II: 1, 2, 5, 75),

proteínas celulares (vimentina, desmoplaquina, actina, miosina, tubulina, laminina, histonas, anexinas, proteína 14-3-3) (15).

Epidermis

Es la cubierta más superficial de la piel y biológicamente activa (15). Tomando de referencia el grosor respecto a la epidermis, se clasifica en piel gruesa y piel delgada. La piel gruesa se encuentra en palmas de las manos y plantas de los pies, cuenta con 5 estratos. La piel delgada cuenta con 4 estratos (ver figura 1) (8). Los queratinocitos son la principal célula que conforman estos estratos y se encuentran densamente empaquetados, llegando a presentar un grosor promedio de 75 – 150 μm y que puede llegar hasta 600 μm en la piel gruesa (9, 10, 14, 15). Los queratinocitos que maduran durante su recorrido desde el estrato más profundo al estrato superficial. En este recorrido, la morfología, el citoplasma, el núcleo y el citoesqueleto van cambiando por un proceso de apoptosis especial. Este proceso es acompañado por una acidificación, y formación de barreras mecánicas y químicas que contribuyen con las propiedades de la piel. Los estratos que conforman a la epidermis son (8):

1. Estrato Basal: Por epitelio cúbico-cilíndrico simple, lo conforman únicamente una capa de células que se sedimentan sobre una membrana basal. Es el estrato más profundo, formado por célula germinales que se diferenciarán a queratinocitos maduros a medida que proliferan y superficialmente por los estratos. Las células se encuentran unidas entre sí lateral y apicalmente por desmosomas. Basalmente se unen a la matriz extracelular (MEC) por hemidesmosomas (8 - 10, 14).
2. Estrato Espinoso: Por epitelio cúbico estratificado, varias capas lo conforman. Lo constituyen principalmente queratinocitos que, a la visualización microscópica del corte histológico, los desmosomas dan la apariencia de imagen de “espinas”, también llamados nódulos de Bizzozero (8).
3. Estrato Granuloso: Por epitelio cúbico-plano estratificado, conformado por 1-3 capas, Constituido por queratinocitos cuyo citoplasma contiene gran cantidad de gránulos de queratohialina y cuerpos laminares
4. Estrato Lúcido: Por epitelio plano estratificado queratinizado: Se encuentra en la piel Gruesa. En este estrato, los queratinocitos en lugar de contener la proteína queratina en su citoesqueleto, se encuentra la proteína eleidina, lo que le confiere a este estrato su apariencia transparente (9).
5. Estrato Córneo: Por epitelio plano estratificado queratinizado. Última capa de la epidermis (8 - 10, 14) .

Los queratinocitos representan aproximadamente el 85% de las células que conforman la epidermis (8). Aparte de los queratinocitos, se encuentran los melanocitos: son el 5% de las células de la epidermis. Se encuentran en el estrato basal sin unirse a los queratinocitos circundantes. Producen el pigmento de melanina a partir del aminoácido tirosina. Forman la unidad Melanoepidérmica, de un melanocito proveedor de pigmento a 4 o hasta más de 40 queratinocitos. Células de Langerhans: Se encuentran en el estrato espinoso. No presentan uniones con las células circundantes. Son células presentadoras de antígeno (CPA). Células

de Merckel: Se encuentran en el estrato basal. No presentan uniones con las células circundantes, se unen a proyecciones amielínicas para formar el corpúsculo de Merckel (8, 9, 11, 13, 14).

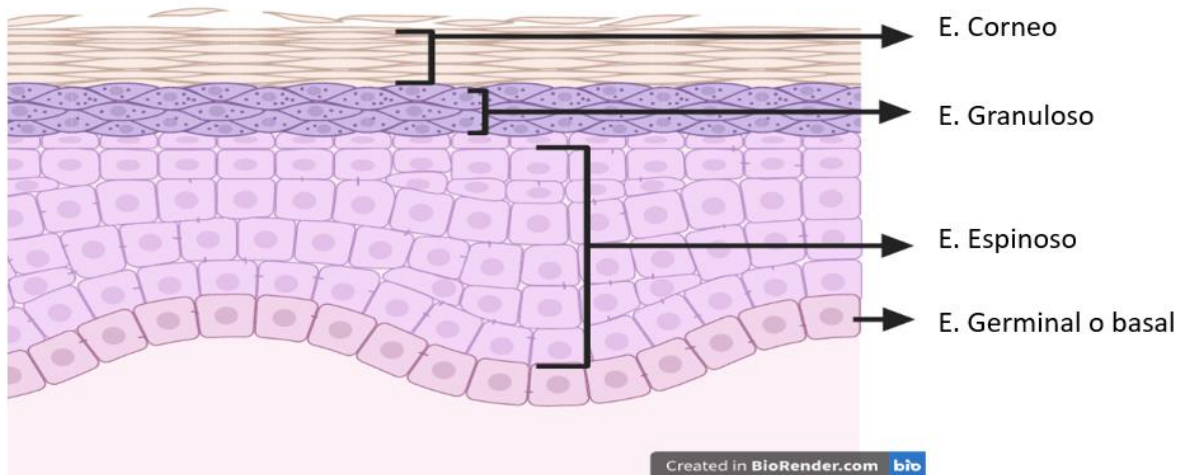


Figura 1: Representación animada del estrato epidérmico. Las flechas señalan los estratos que componen la epidermis. E, Estrato. Imagen creada en biorender.com.

En la unión dermoepidérmica los queratinocitos germinales, presentes en la capa basal, están unidos a la membrana basal por medio de hemidesmosomas y uniones focales. La membrana basal es un complejo ensamblado de Colágeno IV, laminina, nidogeno, perlecana, heparán sulfato proteoglucano, proteínas de adhesión (15), integrina α -6 (10). El microscopio electrónico de transmisión permite diferenciar dos capas en la membrana basal: Lámina lúcida, la capa superficial compuesta por filamentos de anclaje, que conectan las hemidesmosomas con la capa profunda, la Lámina densa, que conecta a la dermis por fibras colágenas (14). La epidermis recibe digitaciones de la dermis, las papilas dérmicas, y entre estas papilas están las evaginaciones de la epidermis (ver figura 2) que penetran en la dermis, las crestas interpapilares (8).

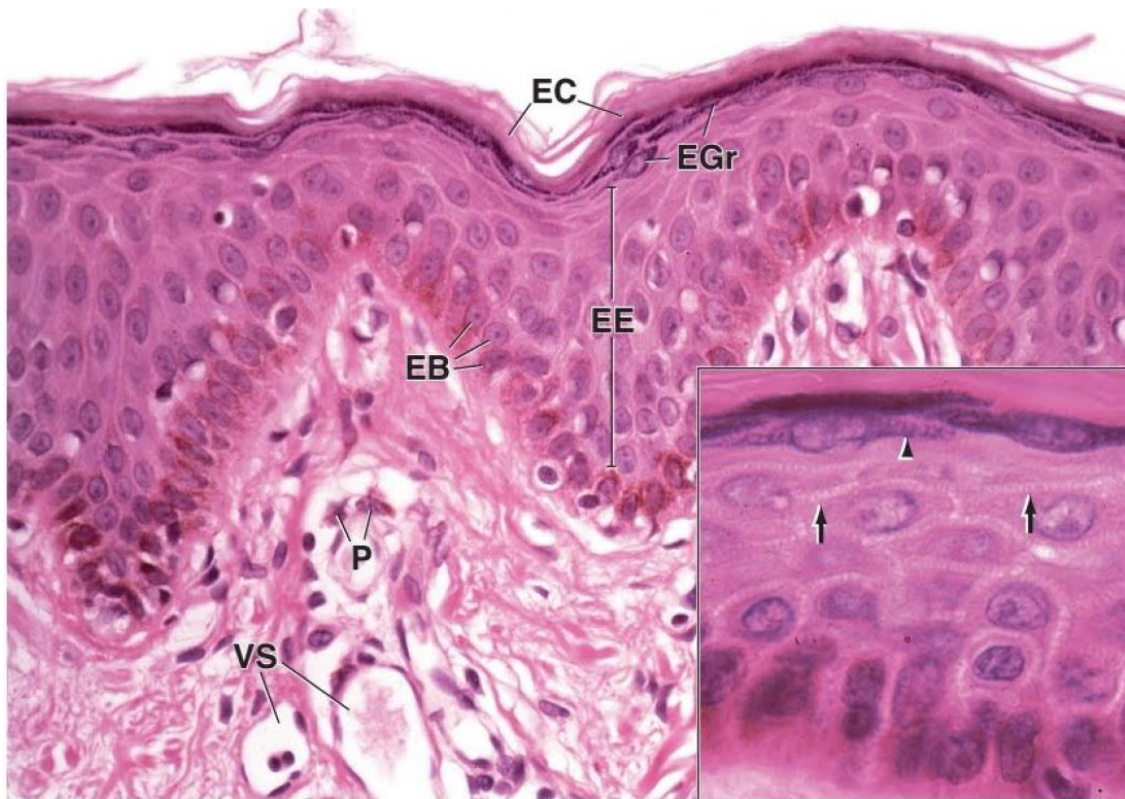


Figura 2: Fotografía del estrato epidérmico y dermis. Tinción con hematoxilina y Eosina. En el recuadro mayor a un aumento de 320x, se observan los 4 estratos, del más profundo al superficial el Estrato Basal (EB), Estrato Espinoso (EE), Estrato Espinoso (EE), Estrato Granulo (EGr), Estrato Corneo (EC). Inmediatamente debajo de la epidermis, se encuentra la dermis, específicamente la dermis papilar, a notar la gran cantidad de células en esta región que pueden llegar a contener pigmentos (P) de melanina, los vasos sanguíneos (VS). En el recuadro menor a un aumento de 640x, se observa parte del estrato espinoso y el estrato granulo, las flechas señalan los desmosomas que dan apariencia de espinas y las puntas de flecha señalan los gránulos teñidos del estrato granuloso. Imagen obtenida y modificada de Paulina W et al 2019 (8).

Dermis

La dermis es la capa que se encuentra inmediatamente debajo de la epidermis. Esta compuesta por tejido conjuntivo laxo cuya presencia de las fibras proteínicas le confiere propiedades de resistencia mecánicas y de tensión. Es usualmente menor 2 mm de grueso, pero puede llegar a 4 mm (en la espalda del adulto) (15). La dermis tiene dos estratos:

1. Estrato Papilar: Se encuentra inmediatamente debajo de la epidermis. Tejido conjuntivo laxo que aporta los vasos sanguíneos y linfáticos, terminaciones nerviosas, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, músculo piloerector; además cuenta con

la presencia de mayor densidad celular. Las fibras de colágena en la dermis papilar tienen diámetros promedio de 38,000nm, intercalados estrechamente con fibras elásticas (15) La presencia de fibras proteínas, como la colágena tipo I y III, fibras reticulares en red irregular (8).

2. Estrato Reticular: Tejido conjuntivo laxo, con menos cantidad de células que la dermis papilar. Las fibras en la dermis reticular tienden a presentar mayor grosor, debido a la presencia de fibras de colágenas de mayor densidad (9, 14), con diámetros promedio de 80,000 nm, que a su vez están menos intercaladas y organizadas en haces que son rodeados por una superestructura de fibras elásticas de fibras elásticas. Estas fibras consisten en oxytalan (finas ramas con microfibrillas ricas en elastinas), elaunin (microfibrillas arciformes con centros de elastina), y la presencia de fibras reticulares (15).

En ambas capas de la dermis se encuentran fibroblastos y células del sistema inmune. Estudios de rastreo de linaje han mostrado que la dermis reticular y papilar están formados por fibroblastos de linajes diferentes, lo que podría explicar la estructura fibrilar diferente en estas dos capas (15).

Los colágenos predominantes son tipo I (80 – 90 %), y tipo III (10 – 20 %). Además, colágeno tipo IV y otros son también identificados (9, 15). Los fibroblastos son las células que sintetizan estas proteínas fibrilares, los proteoglicanos y proteínas adhesivas (11).

La dermis presenta un contenido celular diverso, células que integran propiamente la dermis y se les conoce como células residentes y, otro tipo de célula que llegan en momento de necesidad cuando el sitio local es agredido. Las células que integran la dermis son: a) Fibroblastos, los cuales: producen todos los componentes de la MEC, tales como las fibras (colágena, reticulares y elásticas), y los componentes de la sustancia fundamental (glucosaminoglicanos, proteoglicanos, proteínas adhesivas). b) Miofibroblastos, presentan propiedades de fibroblastos y de músculo liso. c) Macrófagos o Histiocitos quienes derivan de monocitos circulantes, son células inmunológicas con gran actividad fagocítica. d) Mastocitos, son células inmunitarias estacionarias con gránulos de heparina y contribuyen a los procesos inflamatorios y las respuestas hipersensibles. e) Basófilos, son células inmunitarias circulantes, parecidos funcionalmente a los mastocitos. f) Adipocitos, células con la capacidad de almacenar ácidos grasos. g) Células troncales adultas, pueden provenir de las Células Progenitoras Adultas Multipotentes (MAPC, Multipotent Adult Progenitor Cell) que circulan por vasos sanguíneos, y pericitos, células troncales ubicadas en las paredes de los vasos sanguíneos (8, 9, 11, 13, 14).

Más profundo se encuentra la hipodermis o tejido subcutáneo. Se encuentra inmediatamente debajo de la dermis y tiene relación con planos profundos lo que podría ser fascia muscular o periostio (según la localización de la piel). Consiste principalmente en tejido conectivo, con adipocitos que pueden ser capas delgadas o grandes de almacenamiento de tejido adiposo que aísla y protege la piel, ya que la grasa es mala conductora de calor (15). El tejido es rico en proteoglucanos y glucosaminoglicanos, que se hidratan y dan sus propiedades al tejido.

En esta capa se encuentran también fibroblastos, adipocitos y células inmunitarias (9, 11, 14)

Quemaduras

La herida causada por una quemadura es una lesión directa que afecta al tejido epitelial superficial, es decir, la epidermis, y en algunos casos puede llegar a afectar también la dermis y los tejidos subyacentes (16). La prevalencia de las quemaduras es alta, especialmente en los estratos socioeconómicos bajos y medios, alcanzando aproximadamente el 90%. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que cada año hay alrededor de 11 millones de pacientes afectados por quemaduras, de los cuales 180,000 fallecen. Según un informe de la Asociación Americana de Quemados (AAQ) en 2019, las lesiones por quemaduras de origen térmico representan el 41% en Estados Unidos, seguidas por las de fricción (31%), las químicas (3.5%) y las eléctricas (3.6%). Es importante destacar que las poblaciones vulnerables, como los pacientes con epilepsia, tienen un mayor riesgo de sufrir quemaduras (17).

La lesión se produce como resultado de la exposición a diferentes formas de energía y sus manifestaciones, ya sea en forma de cambios agudos o prolongados en la temperatura (calor y frío), exposición a electricidad, sustancias químicas, radiación o fricción. La lesión en sí es el resultado directo de la transferencia de energía y, en parte, de las respuestas fisiopatológicas que se desencadenan (18).

Después de la lesión, las respuestas fisiológicas e inmunológicas son desatadas de manera inmediata y unas perduran hasta por años. La respuesta endocrinológica mantiene una actividad autónoma simpática activa, consecuentemente un estado hipermetabólico que se puede prolongar más allá del periodo agudo. La gravedad de las respuestas endocrinológica, inflamatoria e inmunitaria dependen de un gran número de factores como del porcentaje de la superficie corporal lesionada, la profundidad de la lesión, exposición a toxinas y/o agentes patológicos, inhalación de agentes lesivos y daño a vías aéreas, edad, comorbilidades, traumatismos simultáneos, drogas y/o alcohol, y el tiempo que tardó en presentarse la ayuda médica (17).

Dos respuestas vasculares son desencadenadas independientemente del tipo de energía que haya sido la causante de la lesión: Aumento de la permeabilidad vascular y vasodilatación:

Permeabilidad: El calor aumenta la permeabilidad de los capilares y vénulas, permitiendo la salida de plasma (con proteínas y electrólitos) al espacio intersticial, consecuentemente edema, activación endotelial, cascadas de complemento y coagulación. Disminuyendo el volumen sanguíneo y comprometiendo de manera inmediata el aparato cardiovascular

Vasodilatación: La microcirculación se ve incrementada, aumentando el flujo sanguíneo al sitio de la lesión y acrecentando la presión hidrostática, que aunado a la permeabilidad, aumenta el edema y la pérdida de volumen circulante (17, 18).

Inmediatamente tras la herida por quemadura, la lesión puede ser dividida en tres zonas:

- 1) La zona de coagulación: Con el mayor daño en el centro
- 2) La zona de estasis o zona de isquemia: Caracterizada por una perfusión disminuida
- 3) La zona Hiperémica: La zona más lejana y periférica de la lesión, caracterizada por un incremento en la vasodilatación e inflamación.

La respuesta celular al estrés varía según la cercanía al sitio de la lesión. Un espectro inmediato con células necróticas, en autofagia dentro de las primeras 24 horas tras la lesión, comienzo de apoptosis en el rango de 24-48 horas, y niveles reversibles de estrés oxidativo.

La inflamación es la respuesta inmunológica inicial: Neutrófilos llegan con el objetivo de fagocitar y eliminar agentes contaminantes, detritos celulares, células apoptóticas y promueven la liberación de citocinas inflamatorias de fase aguda IL-1, IL-6, TNF-A, en 24 horas los monocitos llegan al sitio de la lesión y maduran hacia macrófagos y estos se activan por la vía clásica para promover la inflamación. Considerando la extensión de la quemadura, la profundidad y los estímulos constantes. Este periodo se caracteriza por niveles séricos elevados de citocinas proinflamatorias y proteínas inflamatorias de fase aguda que pueden complicar el estado del paciente y llevar a un shock distributivo (17 - 19).

Clasificación de las heridas por quemadura

Según la profundidad de la lesión y los tejidos que llega a afectar, se clasifica en:

- Primer Grado: Afecta la capa epidérmica. La profundidad de la lesión no atraviesa la membrana basal y se queda limitada a la epidermis. La piel se torna eritematosa, hipersensible, dolorosa. El dolor experimentado es corto en duración
- Segundo Grado: Afecta a la epidermis y a la dermis. La profundidad atraviesa la membrana basal y según el estrato de la dermis afectada, se clasifica en dos subtipos:
 - 2A: Afecta la epidermis y dermis papilar. Tienen una base eritematosa, herida exudativa (húmeda), se generan vesículas, piel local hipersensibles, dolorosa. Requieren de cubierta y cuidado de la herida. Pueden dejar cicatriz y, no requieren de cirugía.
 - 2B: Afecta la epidermis y los 2 estratos de la dermis, dermis papilar y reticular. La herida presenta una base eritematosa de menor intensidad y menos exudativa debido a que la mayor densidad de vasos sanguíneos locales estaba en la dermis papilar y por la destrucción parcial de los receptores del dolor locales disminuye la sensación de dolor. Requieren cirugía y dejan cicatriz.
- Tercer grado: Afecta el órgano completo, la epidermis y dermis. La herida presenta una base blanca eritematosa, no exudativa. No es típicamente dolorosa debido a la destrucción de las terminaciones nerviosas. Insensible al tacto fino. Dejan cicatriz que suelen terminar en tipo queloide y requieren cirugía
- Cuarto Grado: Afecta la piel y tejido subdérmico. Según la profundidad, puede involucrar tejido adiposo, músculo, hueso (17 - 20).

Reparación de las heridas

De la respuesta fisiológica e inmunitaria ante un agente agresor, comienzan las señales celulares para reparar la herida. El proceso de inflamación aguda tiene el objetivo de neutralizar los agentes lesivos y restaura el tejido hasta su óptima función (21).

Cuando el agente lesivo y las posibles bacterias que hayan entrado por la ruptura de la barrera de la piel han sido neutralizadas, fagocitadas y eliminadas, el tejido comienza su reparación. Las células residuales del tejido dañado y la llegada de células inmunitarias por la inflamación y quimiotaxis de otras variedades de linajes celulares, generan mecanismos sinérgicos con el objetivo de reparar la herida: se presentan interacciones intercelulares, secreción de factores de crecimiento, citocinas que activan y modulan la inflamación y el grado de reparación y contribución por las células locales. El comportamiento de las células que están participando se puede describir en una de las siguientes fases: proliferación, migración, síntesis de matriz extracelular, contracción, remodelado, secreción de factores de crecimiento; todos estos comportamientos actúan en las fases descritas del proceso de cicatrización, y aún el grado de desarrollo de las respuestas celulares participantes sigue en estudio (22 - 24).

Dos resultados surgen dependiendo del grado en el que el tejido dañado es reparado (21, 22, 25):

Regeneración: Consiste en la restitución completa del parénquima, el tejido funcional especializado del órgano y tejido (21, 26). Está dado por la capacidad de las células troncales, dentro del órgano dañado, de proliferar y reemplazar a las células funcionales que fueron dañadas y eliminadas (21, 22, 25, 27). Cuando la regeneración restituye de manera completa la arquitectura y función normal del tejido, se denomina resolución (21). La resolución ocurre cuando el tejido de sostén, el estroma (28) está intacto y el tejido involucrado tiene la capacidad de reemplazar cualquier célula especializada requerida (21). La regeneración de la epidermis está determinada por la profundidad y la integridad de la membrana basal, de esta manera, mientras la lesión se limite a la epidermis, las células de la capa germinal proliferan y se diferenciarán hacia queratinocitos que repararán la herida (22, 29).

Cicatrización: También llamada reparación por fibrosis. Ocurre cuando hay un daño sustancial en el tejido estromal y/o el tejido especializado (parénquima) carece de la habilidad para reemplazar las células especializadas. En estos casos, el tejido muerto y la inflamación aguda son removidas primero del área por los macrófagos. Más adelante, el área antes dañada, empieza a llenarse del crecimiento de un tejido vascular, con contiene gran variedad de células que migraron y proliferaron, una de ellas, los fibroblastos(21). Estos fibroblastos aumentan el depósito de fibras para reparar la lesión. Esta cicatriz suele evidenciarse superficialmente por una morfología diferente a la piel, y también por diferencias histológicas estructurales y funcionales diferentes al tejido sano (29).

Regeneración y cicatrización no son términos homólogos si nos referimos a la especificidad de reparación. En la reparación de las heridas, la regeneración y cicatrización participan en

distintas medidas. Y ocasionalmente, es un proceso de “competencia” por quién cierra antes la herida. (29)

Cicatrización en quemaduras

Inmediatamente tras la lesión, se suceden mecanismos simultáneos y que se sobreponen para evitar la pérdida de sangre, llevar células inmunológicas para evitar infección, fagocitar células muertas, agentes lesivos endógenos y exógenos; promover la proliferación y posteriormente remodelar y brindar andamios, factores de crecimiento y otros estímulos para la regeneración de la dermis y la epidermis (22, 29, 30)

Los mecanismos que suceden son generalmente parecidos independientemente del tipo de herida (ver figura 3) y son:

- Hemostasia: La vasoconstricción disminuye el flujo sanguíneo, la formación del tapón plaquetario y la cascada de la coagulación terminan evitando la pérdida de sangre.
- Inflamación: Los daños al tejido promueven la expresión de Patrones Moleculares Asociados a Daño/Peligro (DAMP), la contaminación por agentes con sus Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP), y aunada la pérdida de la barrera mecánica de la piel que facilita la entrada y exposición ante agentes lesivos y el daño que generan, se sucede la respuesta inmunitaria, el desencadenamiento de la cascada de complemento con sus productos quimiotácticos, y la activación endotelial se suman para estimular la inflamación. La permeabilidad local de capilares y vénulas facilitan la extravasación de proteínas y el paso de células inmunitarias hacia el sitio de lesión. Esta respuesta, con el objetivo de llevar la respuesta inmunitaria humoral y celular, y estas puedan limitar la contaminación, la infección, fagocitar los residuos y posteriormente promover la sanación y recuperación del tejido (18, 29, 30)
- Proliferación: Una vez resuelto el estímulo lesivo y haber sido limpiado localmente por la actividad fagocítica de las células inmunitarias, las células residuales posterior a la inflamación, sobre todo macrófagos, secretan factores de crecimiento que a su vez estimulan la secreción de estas, promoviendo la proliferación de fibroblastos, células vasculares (endoteliales, satélites, músculo liso) para la angiogénesis, y de células epiteliales para cerrar la herida. En este punto, la migración y proliferación temprana de fibroblastos y los productos que sintetizan forman el tejido de granulación. Donde sucesos de angiogénesis suceden simultáneamente (29, 30)
- Remodelado: Los cambios de fibroblastos hacia miofibroblastos permite la contracción de la herida y cicatriz. Los cambios constantes de fibras de la matriz extracelular, la resorción y nueva organización de las fibras permite que la dermis tome de nueva vez tono y volumen adecuado, resistencia, y accione como andamio, funciones que habilitan la regeneración, brindando un sustrato sobre el cual se volverá a formar una membrana basal, una migración de células germinales epiteliales y finalmente tejido epidérmico (29, 30).

Factores de crecimiento en la reparación de la herida

Los factores de crecimiento son una gran variedad de moléculas que pueden ser polipéptidos, proteínas o glucoproteínas que tienen la función biológica de interactuar con los receptores de las células diana y tener efectos metabólicos anabólicos, activar el ciclo celular, direccionar a la célula hacia una línea celular en particular, promover la migración y proliferación, etc (31).

Estos factores son secretados por muchos tipos celulares, y su secreción puede ser un estado constitutivo basal y también ser estimulado positivamente a incrementarse tras una lesión o una necesidad. Pueden actuar de manera parácrina, autócrina y endócrina como una hormona.

Según el tipo celular, el periodo del ciclo celular, el medio que rodee a la célula, el receptor y los segundos mensajeros que lo traduzcan, y la susceptibilidad de la célula hacia el ligando; provocará una respuesta diferente. Por ejemplo, una célula sana que no tiene los nutrientes intracelulares o el aporte adecuado, que perdieron el contacto con las células circundantes o con la matriz extracelular o la membrana basal; no provocará proliferación (31, 32).

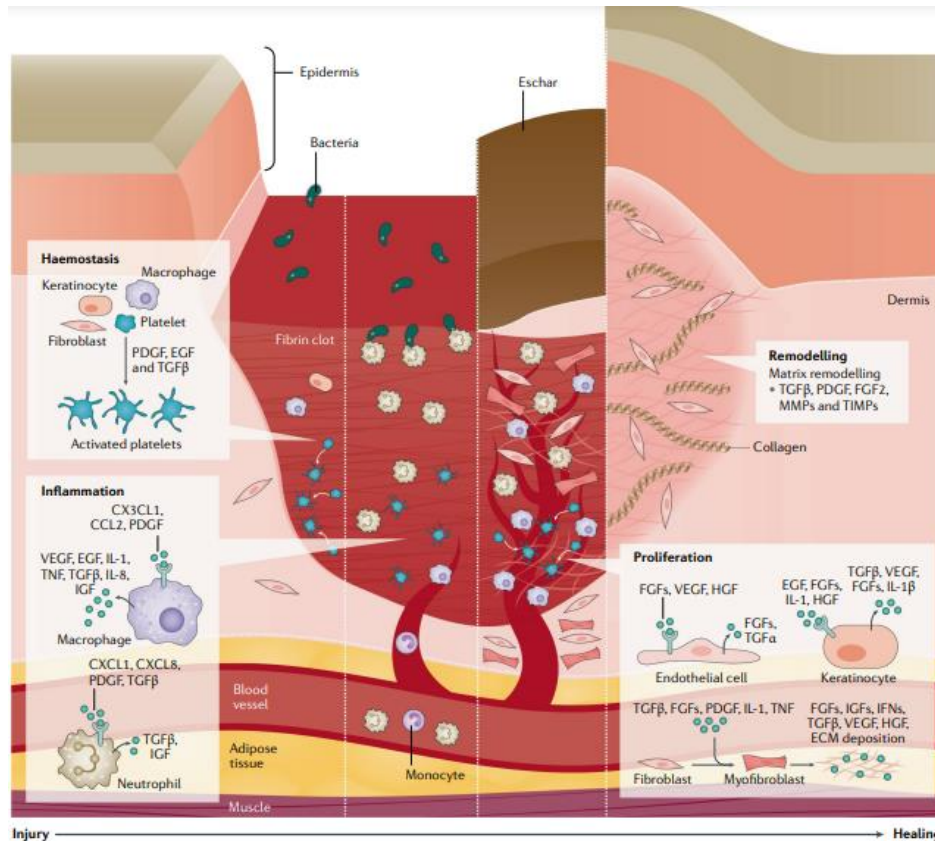


Figura 3: Reparación de la herida. Es un proceso en el que se distinguen teóricamente 4 etapas que se superponen en el suceso real. La hemostasia ocurre inmediatamente después de la lesión e involucra la vasoconstricción, la activación plaquetaria, la formación del coágulo y la liberación de factores de crecimiento, como Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), Factor de Crecimiento Transformante-β (TGF-β), por plaquetas, queratinocitos, macrófagos y fibroblastos. Como resultado una respuesta inicial del tejido a formar el coágulo, se comienza a sintetizar proteínas de matriz extracelular para las siguientes etapas y la migración de células de la inflamación y de fibroblastos. En la Inflamación, las células inmunitarias reclutadas se encargan de fagocitar y limpiar localmente de células dañadas y la contaminación microbiana. Estas mismas células se encargan de estimular el tejido circundante a reparar, continuando la secreción de factores de crecimiento previamente señalados y se suman Factor de Crecimiento similar a la insulina (IGF), Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF). En la Proliferación, los fibroblastos reclutados aumentan su proliferación y depósito de fibras, y el FGF se mantiene durante este periodo e incluso por periodos mayores a la lesión aguda y crónica. La formación de vasos sanguíneos junto la proliferación celular y el depósito de fibras proteicas conforman el tejido de granulación. Los queratinocitos se ven favorecidos a migrar, al encontrar un andamio temporal donde estos depositan nueva membrana basal, se diferencian, proliferan y sucede la Reepitelización. En el Remodelado, los factores de crecimiento inducen a los fibroblastos a madurar la matriz, por proceso de acomodamiento de las fibras, acortando la distancia entre la herida y fortaleciendo la fibra. Imagen obtenida y modificada de : Jeschke MG, et al 2020 (17)

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

El factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y un amplio número de isómeros conforman la gran familia de FGF. Desempeñan un papel crucial en la inducción de la proliferación, migración y diferenciación de las células (33, 34). Además, los FGF llegan a modular la respuesta inmunitaria al direccionar la clase de macrófagos en cuanto a la regulación y modificación de la matriz extracelular (MEC) (35). Estos factores son capaces de desencadenar una amplia gama de respuestas celulares, que varían según el tipo de célula y la respuesta metabólica a la que se haya dirigido la célula en cuestión. Por ejemplo, cuando los fibroblastos han sido activados debido a procesos de lesión tisular, exposición a agentes o citocinas inflamatorias, la respuesta al FGF provoca migración, proliferación y síntesis de proteínas (33, 36).

La familia de FGF está compuesta por proteínas señalizadoras que desempeñan una amplia variedad de funciones biológicas, entre las cuales se incluye la regulación positiva de la reparación y regeneración de tejidos y órganos (37).

La familia de los FGFs en los seres humanos consta de 22 miembros (ver figura 4). Estas proteínas son pequeñas, con un peso molecular aproximado de 20 kDa, y comparten un núcleo estructural conformado por láminas beta. A continuación, se presenta la clasificación de estos miembros (33):

Factores de crecimiento fibroblásticos canónicos: Estos FGFs conforman la forma clásica de actividad de los factores de crecimiento, interactuando con receptores específicos. Son secretados y se unen a fibras y proteínas de adhesión en la matriz extracelular (MEC). Pueden actuar de manera parácrina (afectando a células cercanas) y autócrinas (afectando a la misma célula que los produce (33, 34)

Factores de crecimiento fibroblásticos intracelulares: Estos factores consisten en 4 proteínas y no son secretados al exterior de la célula. Están relacionados con la regulación de canales iónicos y el mantenimiento de la síntesis constitutiva de proteínas dentro de la célula (33, 34).

Factores de crecimiento fibroblástico tipo Hormonas: Como su nombre lo indica, son secretados y pasan a circulación. A diferencia de los factores de crecimiento canónicos, no tienen afinidad por las proteínas de la matriz extracelular. Pueden actuar a distancia, afectando a tejidos y órganos alejados del lugar de producción (33, 34).

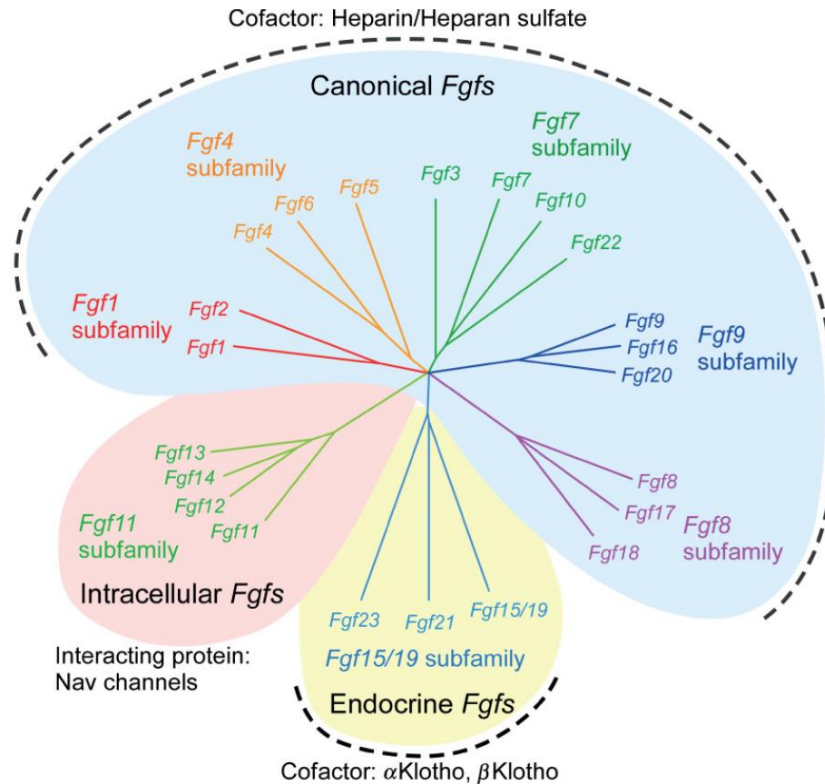


Figura 4: Clasificación de los Factores de Crecimiento Fibroblástico (FGF). Los fFGFs pueden ser clasificados en 3 grandes grupos: Canónicos, Endócrinos e Intracelulares. Estudios filogénicos sugieren que los 22 genes de FGF pueden ser divididos en 7 subfamilias: Fgf1, Fgf4, Fgf7, Fgf8 y Fgf9 (Canónicos) que se unen a receptores de FGF y la heparina actúa como un cofactor. Fgf15/19 que son factores tipo endócrino y la familia de proteínas Klotho es un cofactor. Fgf intracelulares, que actúan en canales iónicos intracelulares. Imagen obtenida y modificada de Omizt DM y colaboradores 2015 (38)

Los FGF canónicos exhiben una alta afinidad por los proteoglicanos ricos en heparán sulfato (HSPG), lo que genera una interacción entre estos componentes de la MEC y los FGF. Esta interacción protege a los factores de crecimiento de las proteasas presentes en la MEC, prolongando así su vida media. Por otro lado, los FGFs tipo hormona presentan una afinidad limitada por los componentes de la MEC, lo que facilita su circulación a través del organismo (33).

Los FGF activan los receptores de FGF (FGFR), que son receptores con actividad tirosina cinasa. Estos receptores son proteínas transmembrana que constan de 3 dominios proteicos, el extracelular, transmembrana y el intracelular. El dominio intracelular posee actividad tirosina cinasa. Hay 4 tipos de FGFR distribuidos en casi todas las células, al igual que la

secreción de los FGF que es llevada a cabo por casi todas las células. De este modo, los FGF canónicos son secretados y se concentran localmente en la MEC, proporcionando estímulos cuando las células requieren de ellos. Esta capacidad de expresión de los receptores y factores de crecimiento FGF los convierte en la primera respuesta en la reparación de heridas (33, 34).

Los FGFR también presentan afinidad por los HSPG, lo que da lugar a la formación de un complejo ternario (FGF-HSPG-FGFR) necesario para iniciar la transducción de señales del FGF. Una vez formado el complejo ternario, el HSPG-FGF se acerca a la superficie celular, lo que permite que los receptores homólogos presentes en la membrana interactúen con el complejo y con otros FGFs unidos al HSPG. Esta interacción entre los receptores y los ligandos desencadena cascadas de segundos mensajeros y provoca cambios conformacionales en los receptores. Estos cambios, a su vez, exponen dominios que permiten la interacción con otros receptores de la misma familia, generando homodímeros o formando polimerizaciones mayores. Estas interacciones fosforilan los dominios intracelulares tirosina cinasas y comienzan cascadas de segundos mensajeros que reconocen estos dominios y participan en el proceso como sustratos o reactivos (ver figura 5). En la membrana, tras la interacción Ligando-Receptor, la Fosfolipasa C gamma (PLC) escinde fosfatidil inositol 4,6-difosfato (PIP2) y libera inositol 1,4,5-trifosfato (I3P), que tiene la opción de unirse a la calmodulina lo que la hace activa y desencadena otras cascadas citosólicas y, la otra opción es regular la conductancia de canales de iones presentes en el retículo endoplásmico. En los dominios tirosina cinasas se encuentran vías relacionadas a proteínas cinasas activadas por agentes mitógenos (MAPK), proteínas transductoras y activadoras de la transcripción (STAT), Janus cinasas (JAK), proteínas fosfatasas reguladoras de grupos fosfatos (GAP). En general, las vías antes descritas terminan generando factores de transcripción que aperturan y transcriben genes que terminan promoviendo la migración, proliferación, diferenciación, síntesis de proteínas; con el fin de reparar la herida (33). Los FGF comparten similitudes estructurales, que les permite una interacción y unión selectiva al mismo receptor, y con esto evocan respuestas fisiológicas homólogas (31)

Los receptores intracelulares necesitan de co-receptores para transducir la señal del ligando FGF, este co-receptor suele ser Klotho (33)

FGF en la reparación de tejidos

El humano repara eficientemente el tejido después de lesiones mecánicas, térmicas o químicas; y esta respuesta es estimulada por la secreción de factores de crecimiento y citocinas. Si bien, la reparación es un resultado de la participación de un amplio espectro de linajes celulares, de componentes extracelulares que brindan dirección y soporte, y de factores de crecimiento con otros sobrenadantes; el FGF recae como uno de los factores que más impactan en la regeneración (31, 32, 37).

El FGF se considera uno de los factores que se secretan y almacenan de manera constitutiva para el mantenimiento del tejido. Así, los FGF canónicos son aquellos componentes que se

encuentran en la matriz extracelular adheridos y potencialmente capaces de estimular las células diana. Además, se ha observado que es uno de los primeros factores liberados en respuesta a una lesión tisular u orgánica. La mayoría de las células circundantes, ya sean del parénquima o del estroma, presentarán receptores para el FGF, lo que les induce a adaptar su metabolismo para contribuir a la reparación de la herida. El alcance de su acción depende del linaje celular que recibe el estímulo, la etapa del proceso de reparación en la que se produce y responde al factor de crecimiento, así como de la concentración y el tiempo de interacción entre el ligando y el receptor (37, 39).

En el proceso de cicatrización, el FGF es aportado en todas las etapas, desde la hemostasia, las células endoteliales, epiteliales, e inmunitarias secretan este factor. Se añaden sobrenadantes que las células participantes empiezan a secretar y, estos sobrenadantes son permisivos e inductores de este FGF (40). La activación y liberación plaquetaria de los gránulos densos, que de la misma manera contienen FGF, también estimulan la secreción de FGF por parte de los fibroblastos (41). La exposición de colágenas en la herida, el ADP y la trombina activan las plaquetas. Ensayos han ampliamente documentado que citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF) incrementan ARNm y la secreción de la misma familia de FGF, esto en el proceso de la inflamación. Continuando con las etapas del proceso de cicatrización, se presenta una retroalimentación, donde la formación del tejido de granulación con la angiogénesis y la interacción con células epiteliales e inmunitarias, el FGF actúa como ligando permisivo y sinérgico con otros factores de crecimiento, como EGF, que actúan en conjunto estimulando a los fibroblastos para aumentar el depósito de fibras y formar una MEC, lo que brinda un andamio donde los queratinocitos migrarán, secretarán una fibras para complementar la membrana basal, y proliferarán, lo que facilita la reepitelización (35, 39 - 41)

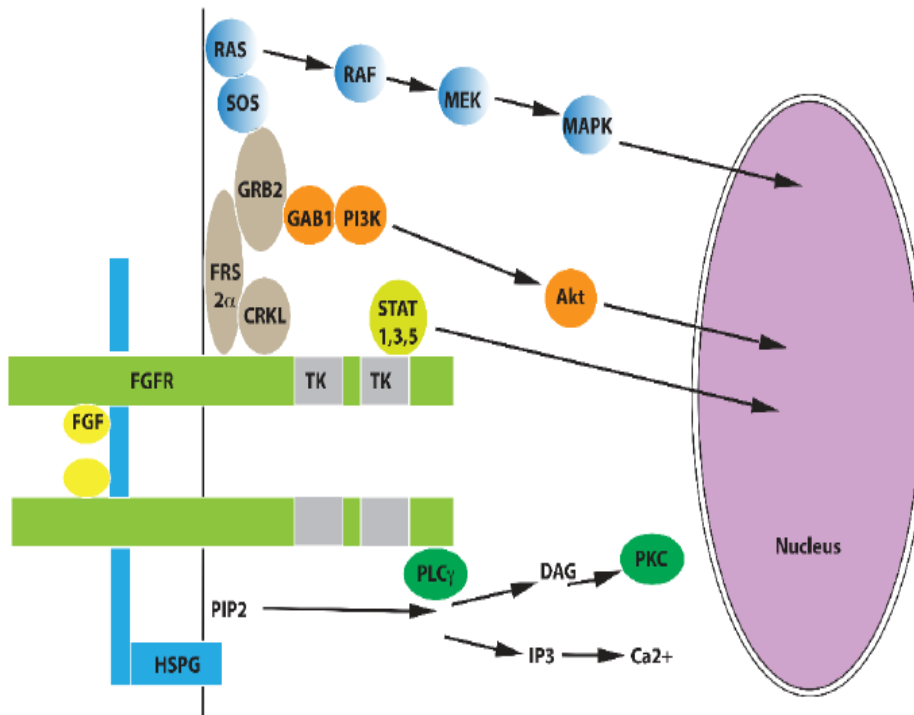


Figura 5: Interacción ligando receptor y vías de transducción de señal. El complejo ternario lo conforman el factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-proteoglicano rico en heparán sulfatos-receptor de FGF (FGFR); cuando este complejo se forma, el cambio conformacional del receptor y la afinidad del complejo por receptores homólogos circundantes genera la polimerización. La traducción de ligando comienza en la membrana y en los receptores. En la membrana actúa la fosfolipasa C (PLC) que libera inositol trifosfato (I3P) que termina activando la calmodulina y canales de iones intracelulares; el diacil glicerol (DAG) restante en la membrana comienza cascadas a partir de proteínas cinasas C (PKC). Los dominios intracelulares de los receptores presentan dominios tirosina cinasa (TK) que se fosforilan y comienzan cascadas de segundos mensajeros que culminan en proteína traductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT) y complejos relacionados a proteínas cinasas asociadas a agentes mitógenos (MAPK, Akt). En general, las vías culminan transcribiendo genes necesarios para la reparación de la herida. Imagen obtenida y modificada de: Prudovsky I et al 2021 (33).

Tratamiento de heridas por quemadura

De acuerdo con los grados de quemadura, las clasificaciones Grado I y Grado II A, pueden ser delimitadas a la limpieza de la herida, protección de la lesión, profilácticos en medios de presentación locales y valoración continua por el profesional médico, a expectativa de resolución.

Para las heridas por quemaduras con una clasificación Grado II B y mayores, se considera un proceso de tratamiento inmediato o primeros auxilios, que posteriormente lo integran también una primera y segunda fase intrahospitalaria que habilita al personal médico un tratamiento integral con el objetivo de dirigir los resultados a las emergencias que pueda tener el paciente, a su estabilización, tratamiento directo de las heridas, finalmente emite una mayor calidad, pronóstico y rehabilitación para el paciente hasta llevarlo a su integración de sus labores humanas básicas, sociales y civiles (17, 18, 20)

Primeros auxilios y tratamiento inmediato

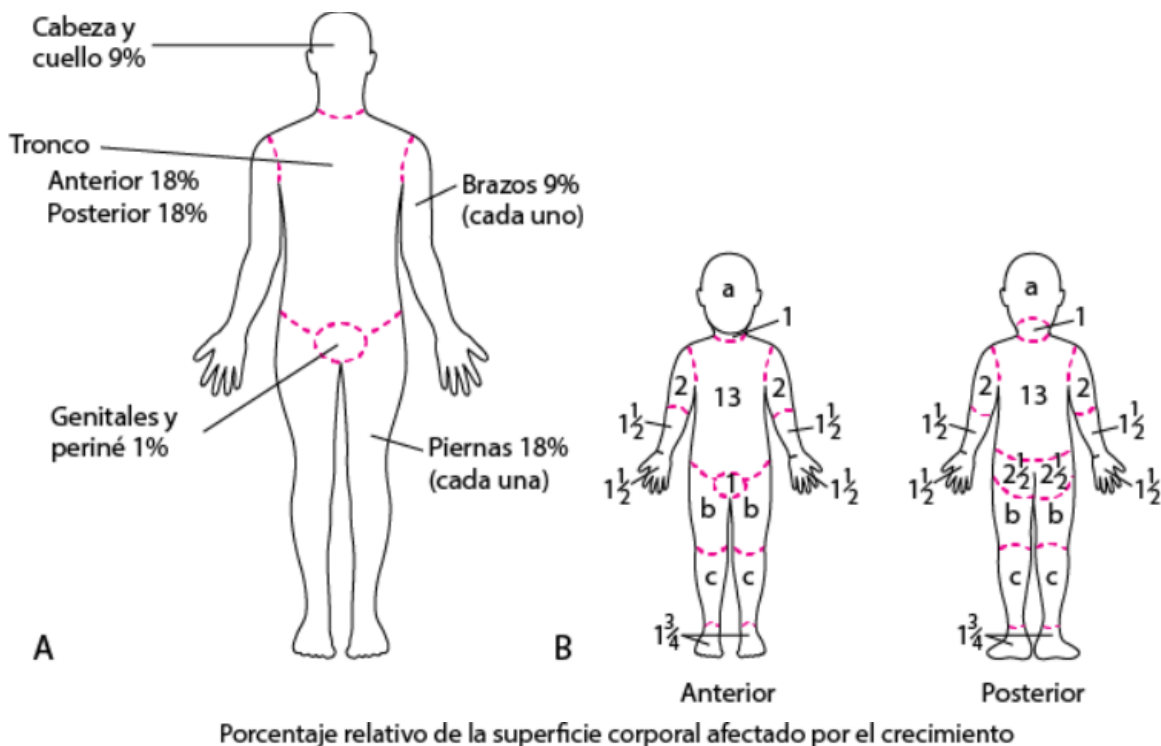
Se debe tomar en cuenta la naturaleza del agente agresor (térmico, químico, eléctrico, mecánico), el sitio de la lesión, la exposición a agentes que hayan podido lesionar la vía aérea y la habilidad del personal que se encuentre cerca del paciente. Proceden los siguientes pasos que evitan que empeore la herida y el riesgo de contaminación (17):

1. Detener la exposición del paciente ante el agente agresor y trasladarlo a un sitio más seguro. Tener cuidado de no someterse accidentalmente a una lesión por el agente agresor, sobre todo si fue por descargas eléctricas.
2. Humedecer con agua fresca el o los sitios de lesión, teniendo cuidado de no verter directamente sobre la piel lesionada, de manera que no lesione los tejidos infraepiteliales, de igual modo, tener en cuenta el riesgo de hipotermia
3. Retirar ropa que haya sido carbonizada o que pueda lesionar por fricción y adhesión a la piel del paciente. Retirar de la misma manera la joyería y accesorios que pudiera tener el paciente.
4. Envolver en sábanas limpias y secas al paciente para adecuarlo para el traslado.

Las fases siguientes es una secuencia ordenada que se realiza en el ámbito hospitalario y en el centro de quemados. Según la secuencia que establece el Apoyo Vital Avanzado en Trauma (ATLS), por el Curso de Manejo de Emergencia del Quemado Severo (EMSB), por la Asociación de Quemados Australiana y de Nueva Zelanda, y el Soporte Vital Avanzado para Quemaduras (ABLS) por la Asociación Americana de Quemados (ABA)(17):

- A. Primera Fase: Valoración ABCDE y las consideraciones de futuros manejos avanzados de vía aérea y de quirófano:
- a. ABCDE
 - i. A: Airway: Vía aérea: Lesiones en el macizo facial que puedan interrumpir el flujo aéreo, liberación de las vías de conducción del tracto respiratorio, valoración de la mucosa oral y faríngea que sugieran daño a las vías aéreas
 - ii. B: Breathing: Respiración y ventilación: Auscultación de campos pulmonares e identificación de ruidos o la ausencia de ellos que sugieran que los campos pulmonares se encuentran ocupados por volumen
 - iii. C: Circulation: Circulación y estado cardíaco: Presión arterial y presión arterial media. Pulsos distales y llenado capilar. Datos que sugieran una óptima hemodinamia, considerando el volumen perdido por la quemadura y el compromiso cardíaco.
 - iv. D: Disability: Alteración del estado de alerta y neurológico. Considerar tóxicos (alcohol y drogas)
 - v. E: Exposure: Exponer el cuerpo con el fin de considerar la extensión de las lesiones, las deformidades y estadificación de las heridas
 - b. Cuidar la hipotermia: El paciente ha perdido la barrera mecánica y física que permite guardar y regular temperatura. El manejo y abordaje debe hacerse cuidado este factor
 - c. Estimación de la superficie corporal de las quemaduras: Por regla de los 9 en adultos, y el diagrama de Lund-Browder en pediátricos (ver figura 6) (17, 41)
- B. Segunda Fase: En centros capacitados permite la dirección y tratamiento de las heridas, la búsqueda de datos químicos y de imagen que corroboren al diagnóstico, y el inicio del tratamiento
- a. Laboratorios: Biometría hemática, electrolitos séricos, tiempos de coagulación, gasometría arterial, búsqueda de tóxicos.
 - b. Imagen: A considerar traumas que hay provocado haber estado en el sitio de exposición (por ejemplo: Accidente automovilístico)
 - c. Profilaxis tetánica

d. Estadificación del grado de quemadura



Parte corporal	Edad				
	0 año	1 año	5 año	10 año	15 año
a = 1/2 de la cabeza	9 1/2	8 1/2	6 1/2	5 1/2	4 1/2
b = 1/2 del muslo	2 3/4	3 1/4	4	4 1/4	4 1/2
c = 1/2 de 1 pierna inferior	2 1/2	2 1/2	2 3/4	3	3 1/4

Figura 6: Superficie corporal quemada. Una forma fácil de identificar la superficie corporal quemada a partir de dos herramientas: A, Regla de los nueve en adultos: La identificación de la herida en la superficie y su relación a estos nueve. B, Diagrama de Lund – Browder, en pacientes pediátricos, al identificar la herida en la superficie del niño se compara según la edad y el porcentaje que concuerda con el desarrollo corporal general del grupo poblacional. Imagen obtenida y modificada: Manual MSD y colaboradores (42).

Tratamiento en centro de quemados

En la unidad hospitalaria o en un centro de quemados que cuentan con mayores herramientas para abordar con mayor precisión al paciente quemado, se describe una serie de etapas sistematizadas que incluye lo siguiente (17):

1. Resucitación: Con fluidos que abarca hasta las primeras 48 horas
2. Cubrimiento de heridas por quemadura: Con medicamentos tópicos y coberturas para prevenir contaminación e infecciones, como acciones terapéuticas puente hasta el abordaje quirúrgico, el desbridamiento y autoinjerto. Las coberturas temporales con sustitutos de piel. Cada acción según el grado de quemadura, con el fin que optimice la reparación de la herida
3. Soporte y cuidados críticos: Prevenir y tratar las complicaciones por infección. Soporte cardiorrespiratorio y soporte nutricional
4. Rehabilitación: Movilización y posicionamiento de miembros de forma adecuada para evitar contracturas, el movimiento activo y rangos de movimiento, soporte psicológico y reintegración a la vida laboral

Las quemaduras Grado II B y superiores son sometidas a procedimientos quirúrgicos donde el objetivo es desbridar el tejido necrótico, fuente de futuras contaminaciones y antígenos DAMP y PAMP, previniendo la inflamación y direccionando la respuesta a la reparación (17, 18, 20),

Estándar de oro

El tratamiento con mayor evidencia favorecedora en el resultado es la escisión temprana de la piel muerta y posteriormente proceder con el autoinjerto. La escisión temprana reduce el riesgo de infección, disminuye el dolor y permite el inicio del proceso de regeneración y cicatrización, favoreciendo la movilización futura (17).

Injerto Autólogo de Piel de Espesor Parcial (Autologous Split-Thickness Skin Grafts, STSGs): La piel sana es cosechada con un dermatomo y trasladada a la lesión de piel que requiere la cobertura. Cuando la Superficie quemada es mayor >30-40% de la superficie corporal total (SCT), la piel saludable puede llegar a ser insuficiente. En este caso la piel cosechada se somete a un proceso de expansión en malla, intercambiando el aspecto final estético por un cierre de herida rápido, y en ocasiones comprometiendo la funcionalidad de la región. La expansión por enmallado en rangos > 1:3 pueden provocar que el futuro injerto tenga una labilidad difícil de maniobrar por el cirujano, teniendo el riesgo de ruptura durante la manipulación. La técnica de Meek (ver figura 7) permite que el enmallado y expansión llegue hasta un radio de 1:9. Cuando la lesión de piel que recibirá el autoinjerto tiene sospecha de infección, de contaminación, o cuando es muy extensa y la piel restante que se puede donar es insuficiente; se recomiendan coberturas de piel temporales hasta que la infección resuelva o la piel saludable se regenere para una nueva cosecha y continuar con el autoinjerto (17).

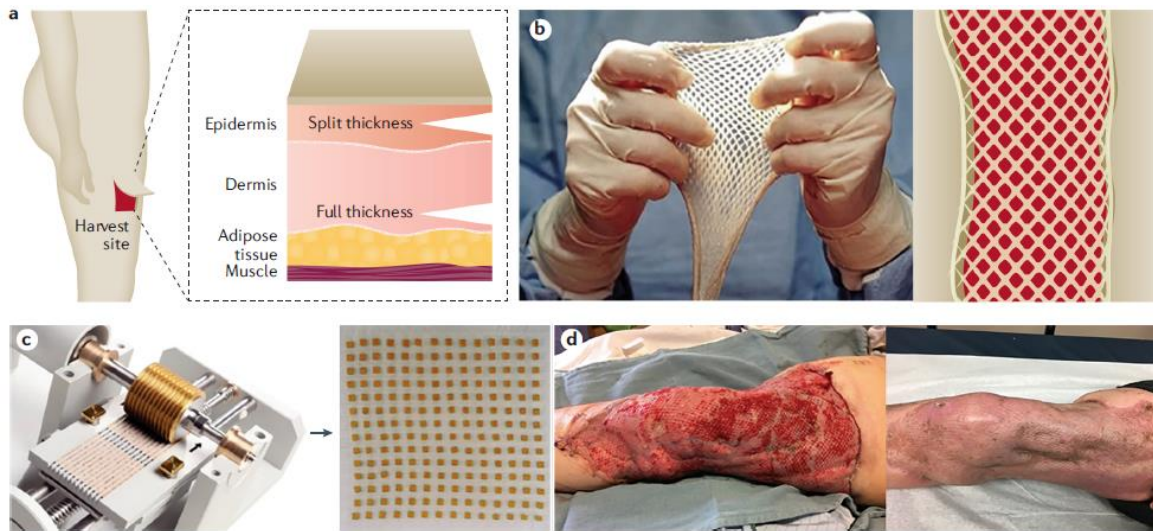


Figura 7: Tratamiento de heridas por quemaduras graves. Se estima la superficie corporal quemada para prever los materiales y probable piel necesaria a injertar en el sitio lesionado. a, Representación de la toma de piel con dermatomo. Esta piel será trasladada e injertada en el sitio de la lesión. b, Cuando el área a cubrir es demasiado extensa, se procede a enmallar, logrando ratios de utilidad 1:4-6. c, La técnica de Meek permite un enmallado que prolonga el rango de utilidad de la piel a 1:9. d, Fotografías del proceso de reparación de herida con el autoinjerto. A la izquierda, un reciente autoinjerto, a la derecha el periodo final de la reparación de la herida. Imagen obtenida y modificada de: Jeschke MG, et al 2020 (17).

Las coberturas de piel

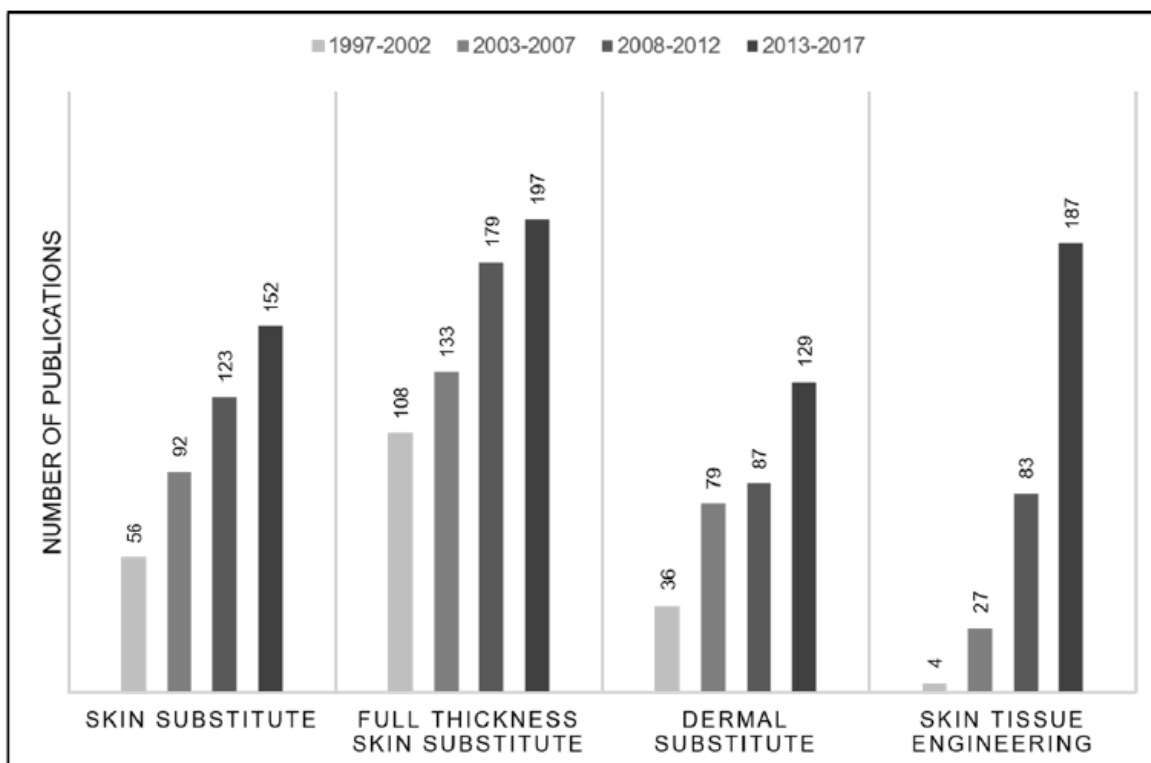
Se ha experimentado un notable avance en el campo de la bioingeniería y los biomateriales, lo que ha dado lugar a una amplia gama de opciones y recursos innovadores para abordar de manera efectiva la reparación enfocada hacia la regeneración del tejido. Estos avances han revolucionado el campo de la medicina regenerativa y han brindado esperanza a aquellos pacientes que enfrentan desafíos en la cicatrización de heridas (43).

Una de las áreas destacadas en este progreso ha sido el desarrollo de matrices dérmicas acelulares y celulares. Estos materiales proporcionan una estructura tridimensional que es fundamental para fomentar la migración y proliferación celular, permitiendo la formación de nuevo tejido en el área afectada. Esta matriz cada vez es más factible obtenerla prácticamente sin modificaciones en cuanto a la estructura del tejido (si proviene del cadáver donador) o se sintetiza con una homología a la que presenta la piel saludable (44). Las capas cuyo objetivo a sintetizar u homologar son la epidérmica, dérmica o dermo-epidérmica, siendo esta última una presentación en bicapa, cuyo resultado ha demostrado mayores beneficios por ofrecer

sitios de migración y adhesión para los fibroblastos en la dermis, estos sintetizan y liberan fibras para la matriz extracelular y factores de crecimiento que promoverán la respuesta de reparación por parte de los mismos fibroblastos y por los queratinocitos, que se valen de la membrana basal del andamio, facilitando su adhesión, migración y proliferación (45). Facilitando la reepitelización (44, 45)

Además de los andamios, se presenta la combinación de factores que en el proceso natural es un claro ejemplo de la compleja interacción celular-celular, célula-matriz extracelular, y célula-factores de crecimiento (43). Surge un modelo de andamio donde se le ofrezca a las células un entorno con la mayor homología posible en cuanto a una estructura sana en la dermis y en la unión dermoepidérmica, y que posea a su vez, factores de crecimiento que permiten los procesos de reparación y direccionen las respuestas hacia la regeneración y no a la cicatrización (44). Los factores de crecimiento han demostrado ser una herramienta esencial en la bioingeniería de tejidos. Estas proteínas bioactivas estimulan la proliferación y diferenciación celular, así como la formación de nuevos vasos sanguíneos. La aplicación de estos factores, y en el caso de las coberturas de origen biológico, que cuentan con factores de crecimiento en una matriz relativamente conservada, ofrece métodos efectivos y prometedores (43)

El paso del tiempo y la motivación sobre técnicas innovadoras en la obtención y presentación de estos biomateriales generó un gran número de opciones sobre las cuales se puede buscar resultados en la aplicación clínica y laboratorial. A continuación, se muestra la cantidad de recursos que han surgido en los últimos 20 años (ver gráfica 1) (46):



Gráfica 1: Número de publicaciones sobre investigación de alternativas de sustitutos de piel en los últimos 20 años. Obtenida y modificada de: Davison-Kotler E et al 2017 (46).

Clasificación de las coberturas de piel

Las coberturas como sustitutos de piel han sido utilizadas históricamente en diversos campos de la medicina, y los resultados clínicos obtenidos a partir de su aplicación son ampliamente conocidos. A pesar de la aparente simplicidad en la clasificación de estas coberturas, su estandarización química y fisiológica es un desafío importante (47). Cada sustituto de piel está compuesto por una combinación única de materiales y componentes biológicos, lo que puede influir en su eficacia y en la respuesta del organismo receptor. Además, factores como la compatibilidad inmunológica, la biodegradabilidad, la capacidad de promover la angiogénesis y la formación de tejido, entre otros, también deben tenerse en cuenta para una clasificación más completa y precisa.

Es importante destacar que, aunque se ha avanzado en la estandarización y clasificación de las coberturas como sustitutos de piel, sigue siendo un campo en evolución (46). La investigación continua y los estudios clínicos son fundamentales para comprender mejor la interacción entre los diferentes materiales y componentes, así como para mejorar la eficacia

y la seguridad de estas coberturas, pues así como promueven la proliferación celular y la migración, pueden ser un riesgo por estar relacionados con la formación de la neoplasia (44)

En 2001, Balasubramani y colaboradores iniciaron las primeras clasificaciones de estos sustitutos cutáneos. Estas clasificaciones proporcionan a los investigadores una forma organizada de resumir las características de los sustitutos según si contienen componentes epidérmicos, dérmicos o ambos. Estas categorías permiten una comprensión más clara y una mejor evaluación de los distintos tipos de sustitutos de piel (48):

- Clase I: Los sustitutos constituyen únicamente en derivados de cultivos epidérmicos.
- Clase II: Los sustitutos constituyen en componentes dérmicos de origen natural o sintético
- Clase III: Los sustitutos incluyen componentes epidérmicos y dérmicos

Posteriormente, en 2011, Ferreira desarrolló una clasificación adicional que se basa en el tiempo de permanencia del tejido y los materiales utilizados en los sustitutos cutáneos. Esta clasificación utiliza “letras” para distinguir las diferentes categorías, lo que podría resultar útil para los médicos en la elección y aplicación de los sustitutos de piel (ver tabla 1). Esta clasificación brinda información adicional sobre la durabilidad y la compatibilidad de los materiales utilizados, lo que permite una mejor personalización y selección de los tratamientos en el campo de la medicina regenerativa (46, 48):

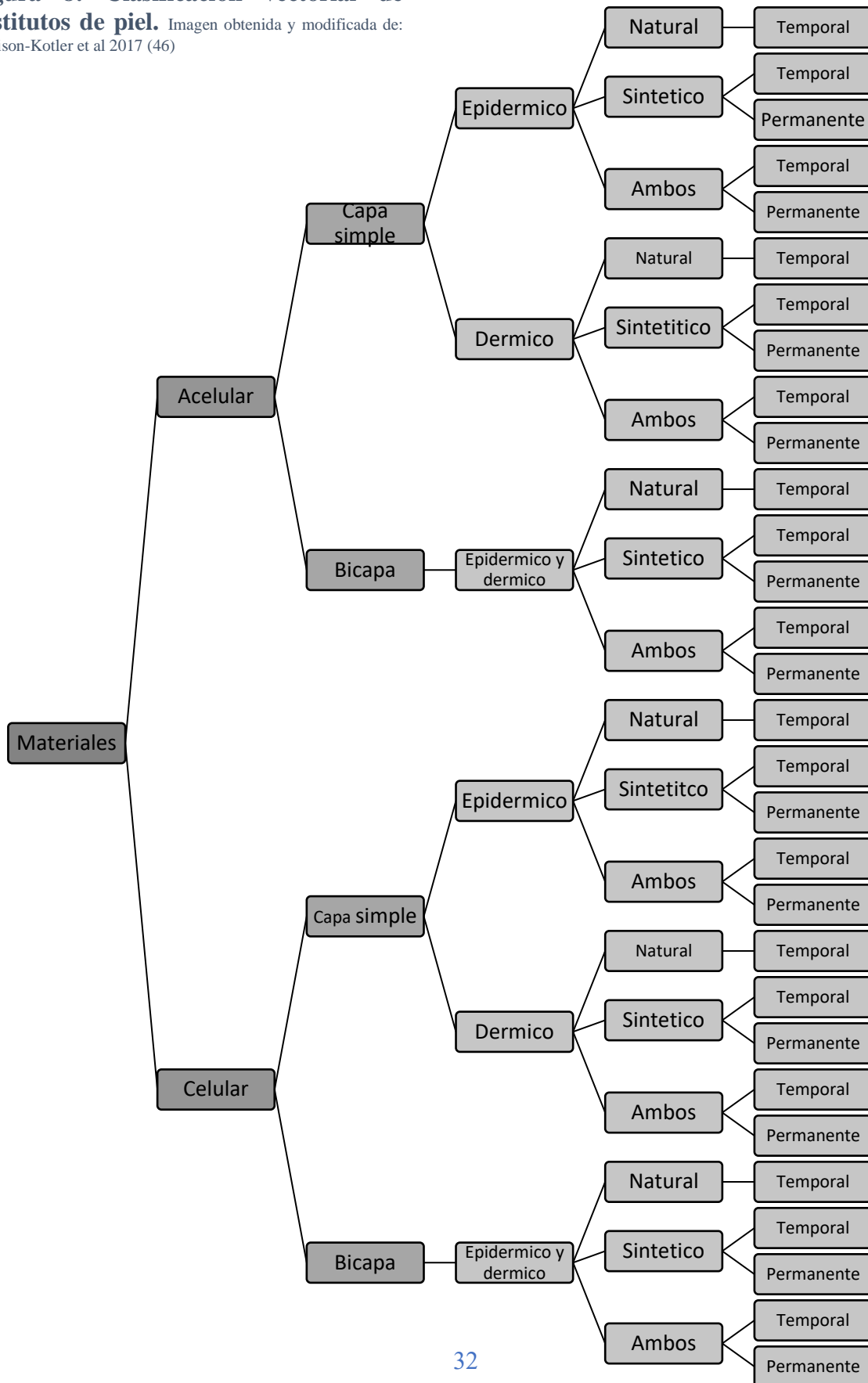
CRITERIOS	LETRAS	DESCRIPCIÓN
Tiempo sobre la herida	P	Permanente, hace referencia a la falta de degradación de los materiales usados como sustituto
	T	Temporal, hace referencia a la degradación de los materiales usados como sustituto a través del tiempo
Origen	B	Biológicos, hace referencia a que los materiales son autólogos, alogénicos, o xenogénicos.
	BS	Biosintéticos, hace referencia a que los materiales derivan de una fuente biológica y que contiene componentes sintéticos no degradables
Localización	C	Compuesto, bicapa. Indica que el sustituto de piel reemplaza ambas capas, la epidermis y dermis.
	D	Dérmico. Indica que el sustituto de piel reemplaza únicamente la dermis.
	E	Epidérmico. Indica que el sustituto reemplaza únicamente la epidermis.

Tabla 1: Nomenclatura de Ferreira para sustitutos de piel. Tabla obtenida y modificada de: Davison-Kotler E et al 2017 (46).

Más reciente, en 2017, Davison-Kotler y su equipo llevaron a cabo una clasificación vectorial (ver figura 8) innovadora que consideraba múltiples aspectos de los sustitutos de piel. Esta clasificación se basó en la celularización del tejido, el número de capas presentes en el sustituto, las regiones específicas de la piel que se reemplazarán, los materiales utilizados en su composición y la duración prevista de su permanencia en el sitio de la herida (46).

Al utilizar un enfoque vectorial (ver figura 9), esta clasificación permitió una representación más completa y detallada de las características de los sustitutos de piel, lo que facilita una selección más precisa y personalizada por parte de los médicos. Esta clasificación ofrece una mayor comprensión de la variabilidad y versatilidad de los sustitutos de cutáneos y brinda a los profesionales de la salud una herramienta valiosa para tomar decisiones informadas en el campo de la medicina regenerativa (46):

Figura 8: Clasificación vectorial de sustitutos de piel. Imagen obtenida y modificada de: Davison-Kotler et al 2017 (46)



El cerdo como xenotrasplante

El xenotrasplante es el proceso de trasplante de células, tejidos u órganos entre especies filogenéticamente diferentes. Según la organización mundial de la salud (OMS), actualmente se llevan a cabo más de 114,000 trasplantes al año, lo cual representa menos del 10% de las necesidades mundiales en este ámbito (50).

A lo largo de la historia, se han realizado xenotrasplantes con el objetivo de abordar enfermedades y ofrecer opciones terapéuticas cuando existe una necesidad histológica específica causada por una determinada afección en el cuerpo. Un ejemplo temprano de esto ocurrió en 1667, cuando Jean Baptiste Denis transfundió sangre de cordero a un joven. Desafortunadamente, una semana después, el joven falleció como resultado de esta intervención. Siglos más tarde, en 1929, Serge Voronoff realizó trasplantes de testículos de primates en seres humanos. Posteriormente, se llevaron a cabo otros trasplantes de órganos provenientes de primates no humanos, los cuales proporcionaron resultados prometedores y abrieron nuevas perspectivas debido a factores anatómicos, fisiológicos y de accesibilidad (50).

El xenotrasplante ofrece diversas ventajas al proporcionar el material orgánico necesario, una disponibilidad y accesibilidad factibles, así como un suministro potencialmente ilimitado de órganos o tejidos. Además, contrae perspectivas éticas en respecto a qué animal es adecuado. Se plantea que utilizar animales como fuentes de consumo en ámbitos alimentarios y, en nuestro caso, en el ámbito de laboratorio y clínico, el cerdo se considera una opción éticamente aceptable (50, 51).

Los estudios realizados en modelos de piel para el ser humano han investigado y analizado especies de géneros filogenéticamente diferentes con características específicas que los hacen factibles en términos de accesibilidad económica, reproducibilidad y conocimiento en el laboratorio. Estos estudios han incluido especies como roedores, cerdos y primates no humanos. Es importante destacar que los primates no humanos presentan una mayor cercanía genética con los humanos. Sin embargo, la evidencia respalda que el cerdo es el animal más adecuado para utilizar su piel como modelo de piel humana (50, 51)

El cerdo destaca en términos de accesibilidad como animal de investigación, ya que su crecimiento es previsible y puede ser controlado en un criadero. Además, su tiempo para alcanzar la madurez sexual y la producción de crías durante su período fértil son aspectos relevantes. Se han llevado a cabo numerosos estudios que han generado conocimientos sobre la genética y el fenotipo del cerdo, así como el control de enfermedades. Además, su tamaño de órganos y fisiología los convierten en una fuente de material orgánico adecuada (ver tabla 2) para el xenotrasplante (50).

	Cerdo	Babuino
Disponibilidad	Ilimitada	Limitada
Potencial de reproducción	Buena	Pobre
Madurez sexual	4-8 meses	3-5 años
Duración del embarazo (días)	114 ± 2	173-193
Numero de crías	5-12	1-2
Crecimiento	Rápido (tamaño de un humano adulto en 6 meses)	Lento (9 años en alcanzar el tamaño máximo)
Tamaño de órganos a adultos	Adecuado	Inadecuado
Costos de mantenimiento	Significativamente más bajo	Alto
Similitudes anatómicas con los humanos	Moderadamente cercanos	Cercanos
Similitudes fisiológicas con los humanos	Moderadamente cercanos	Cercanos
Relación del sistema inmune con los humanos	Lejano	Cercano
Conocimiento de la tipificación de tejidos	Considerable	Limitada
Necesidad de compatibilidad del tipo sanguíneo con los humanos	Probablemente innecesaria	Importante
Experiencia con ingeniería genética	Considerable	Ninguna
Riesgo de zoonosis	Bajo	Alto
Capacidad de producir animales libres de patógenos	Si	No
Opinión pública	Más a favor	Mixta

Tabla 2: Ventajas del cerdo frente otro primate no humano como modelo de xenotrasplantes. Tabla obtenida y modificada de: Aristizabal AM et al 2017 (50).

En relación a la prioridad de la presente tesis, la piel de cerdo cumple cualitativamente con las comparaciones visuales de la piel huma. En otros términos, presenta similitudes homologas a nivel visual y estructural con la piel humana, lo cual la convierte en un modelo apropiado para su estudio y análisis en este contexto.

Similitudes histológicas entre el cerdo y el ser humano

Las semejanzas histológicas entre la piel del cerdo y la piel humana son significativas, lo cual ha llevado a su utilización como modelo en estudios de laboratorio en áreas farmacológicas,

toxicológicas e inmunológicas. Estas similitudes abarcan varios niveles de organización, incluyendo la anatomía y la fisiología de la piel, aunque existen algunas pequeñas diferencias a nivel microscópico y molecular entre las dos especies, las semejanzas generales hacen la piel de cerdo sea un sustituto adecuado para el estudio y análisis en estos campos (52, 53)

La piel de cerdo presenta un arreglo histológico en dos capas principales: la epidermis y la dermis. La epidermis está compuesta por cuatro estratos distintos, mientras que debajo de ella se encuentra la dermis, que se divide en dos regiones identificadas como dermis papilar y reticular. Desde el punto de vista bioquímico, las fibras que conforman estas capas son las mismas: Colágeno, principalmente tipo I y III, así como fibras elásticas y reticulares. Estas últimas son especialmente relevantes debido a su importancia en términos de homología y su influencia en la respuesta celular en la reparación de heridas. La presencia de fibras reticulares y colágenas en la dermis del cerdo es crucial, ya que desempeñan un papel importante en la respuesta celular que promueve la cicatrización de heridas. Estas fibras proporcionan un entorno celular adecuado que permite la formación de una membrana basal, lo que facilita la migración celular, una adherencia óptima, la diferenciación de células germinales en queratinocitos y la proliferación necesaria para la reepitelización de la herida (52, 53)

Debeer y colaboradores realizaron cortes histológicos de piel de cerdo y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (52), lo cual permitió visualizar los diferentes estratos de la piel. Al compararla con la piel humana, se observaron ciertas diferencias. (ver figura 9). De la misma manera observaron que la piel del cerdo puede presentar un grosor dérmico diferente, ligeras variaciones morfológicas en la superficie del estrato epidérmico, la profundidad de los folículos pilosos y la unión dermoepidérmica (52, 53),

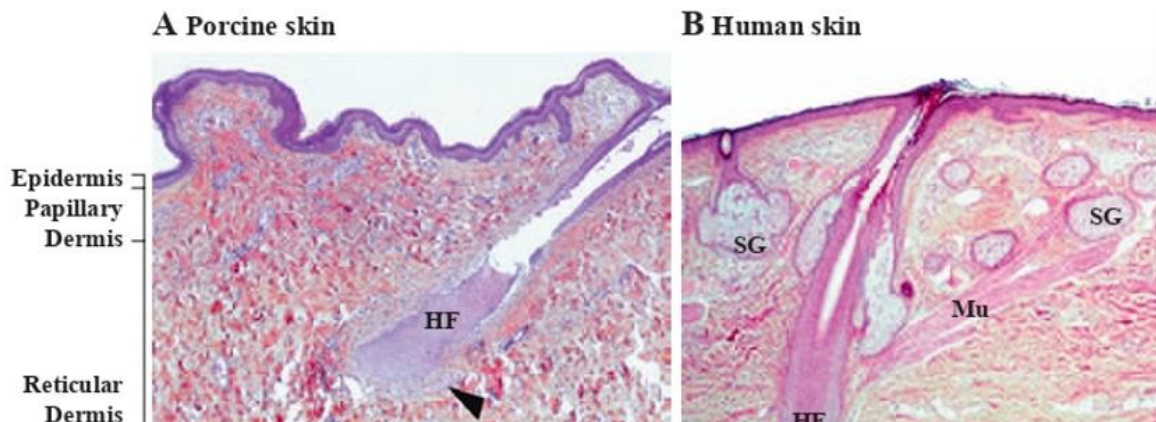


Figura 9: Fotografía de cortes histológicas: Piel de cerdo (Porcine Skin) y Piel humana (Human Skin). Tinción con H&E. A, Piel de cerdo, se diferencian los 3 estratos, la epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis presenta cierto trayecto tortuoso, donde es atravesado por el folículo piloso (HF) delimitado en la dermis. En la hipodermis (Hypodermis) se visualiza tejido adiposo (Ad), y glándulas sudoríparas (SwG) que se encuentran distribuidas en la mayor parte de su piel, a diferencia a la del humano (SG), limitado a la dermis. B, Piel humana con la diferencia que el anexo con el folículo piloso cuenta con su músculo pilo erector (Mu). Imagen obtenida y modificada de: Debeer S et al 2013 (52).

Como se puede observar en la imagen anterior, no se encontraron diferencias significativas en la estructura de la piel, guardando homología en el estrato epidérmico queratinizado, los anexos que la atraviesan (en este caso, un folículo piloso), la dermis cuyo espesor conserva las estructuras homólogas (tejido adiposo y glándulas sudoríparas). Desde el punto de vista citológico, se reportaron similitudes entre la piel de cerdo y la piel humana. Además, se realizaron estudios inmunohistoquímicos en la piel de cerdo para analizar su reactividad frente a antígenos presentes en las células humanas residentes en la piel y los resultados de estos estudios demostraron que las células de la piel del cerdo reaccionaron a la mayoría de estos antígenos, a excepción de aquellos antígenos que son portados por las células presentadoras de antígeno o antígenos que están relacionados con la histocompatibilidad. Es importante destacar el hallazgo de la presencia de colágeno tipo IV y VII en la piel de cerdo que se expresan también en la membrana basal del humano (52).

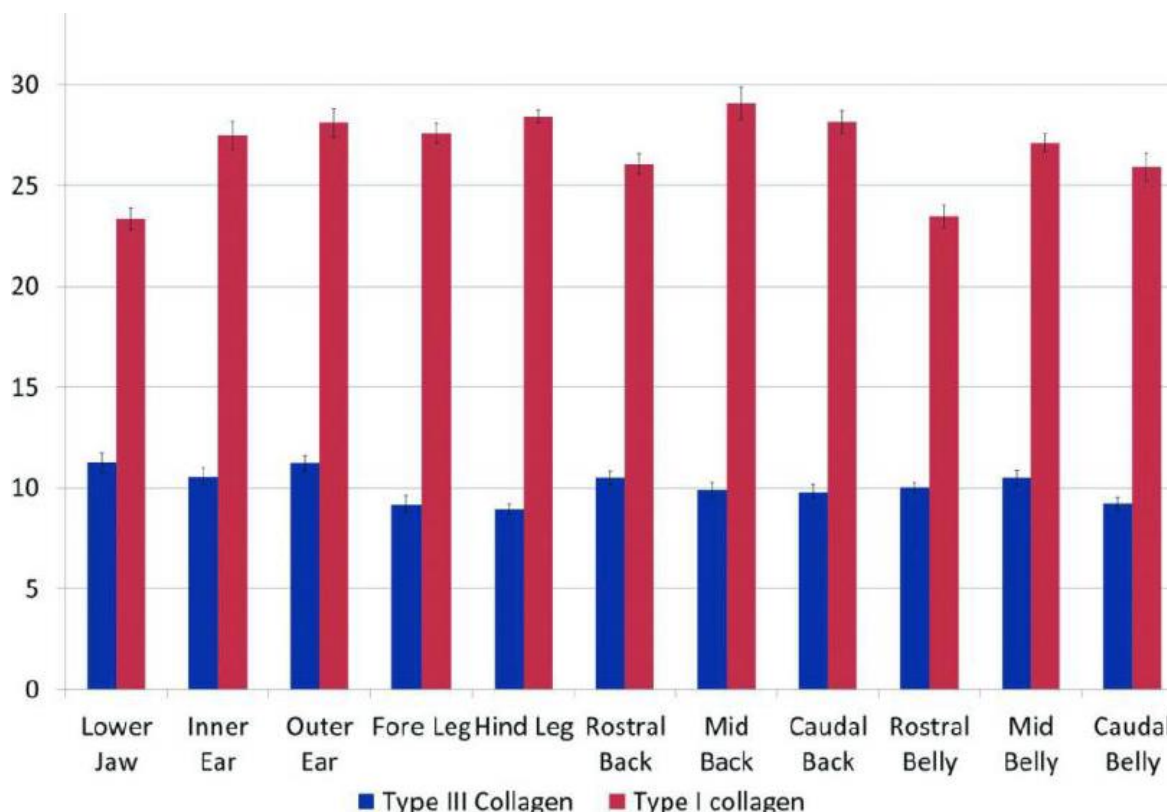
Si se consideran las diferentes áreas de la superficie corporal, se puede observar variaciones en el grosor y la composición de los componentes de la piel. Al analizar las localizaciones de la piel de cerdo, se pueden apreciar diferencias significativas en el grosor tanto de la epidermis como de la dermis, así como en el grosor específico de cada una de estas capas (53).

Es importante destacar que la capa dérmica juega un papel crucial en la reparación de heridas, debido a la presencia de fibras y otros componentes de la matriz extracelular. Estos elementos desempeñan un papel fundamental, ya que proporcionan soporte estructural que promueve la migración y proliferación de las células de la dermis que termina favoreciendo la cicatrización de la piel. Por lo tanto, el grosor dérmico adquiere una relevancia particular en la capacidad de la piel para sanar adecuadamente (53 - 55). Al analizar la presencia de colágeno tipo III (ver gráfica 2), se encontró que este componente tiene una composición promedio de aproximadamente $10.10\% \pm 0.78\%$. Estos resultados muestran que no existen diferencias significativas en cuanto a su presencia en diferentes ubicaciones de la piel de cerdo (53).

Por otro lado, en cuanto al colágeno tipo I, se ha reportado una variación más significativa en su composición promedio cuando se estudian localizaciones específicas de la piel del cerdo (ver gráfica 2). En términos generales, se puede afirmar que la composición de colágeno en la piel de cerdo es similar, independientemente del lugar donde se realice la medición. Sin embargo, se observa un patrón en la relación de composición entre el Colágeno tipo I y el Colágeno tipo III, siendo de aproximadamente 2.5:1 respectivamente (53).

Podemos concluir que la histología, la citología y los componentes macromoleculares presentes en la matriz son similares tanto en la piel de cerdo como en la piel humana. En cuanto al resto de las fibras, como las fibras elásticas, se ha constatado que están presentes en la piel de cerdo en un rango de aproximadamente 4% a 10%. Estos resultados son comparables con la composición de fibras elásticas en la piel humana. Por lo tanto, se puede establecer una homología entre la presencia y la proporción de estas fibras en ambos especímenes, resultados relevantes para comprender la estructura y composición en la piel

de cerdo, lo cual puede tener implicaciones en su aplicabilidad en diferentes industrias, y lo que acontece, a la cobertura de piel (52, 53).



Gráfica 2: Grado de composición de Colágenas en diversas localizaciones de piel de cerdo. Se analizaron 11 regiones con el objetivo de analizar las diferencias en grado de composición de las colágenas tipo I y III. Se encontró que la colágena tipo III está presente con una participación promedio del 10.10% +/- 0.78; mientras que la colágena tipo I se presenta con mayores diferencias en el grado de composición. Lower Jaw = Parte baja de la mandíbula, Inner Ear = Cara interna de la oreja, Outer Ear = Cara externa de la oreja, Fore Leg = Pata delantera, Hind Leg = Pata trasera, Rostral Back = Extremo superior de la espalda, Mid Back = Parte media de la espalda, Caudal Back = Extremo inferior de la espalda, Rostral Belly = Extremo superior del abdomen, Mid Belly = Parte media del abdomen, Caudal Belly = Extremo inferior del abdomen. Imagen obtenida y modificada de: Turner NJ et al 2015 (53).

Coberturas de piel de cerdo para el cuidado de las heridas por quemaduras

La piel de cerdo, al igual que muchas otras a lo largo de la historia, ha sido utilizada como cobertura para heridas en la piel. El xenoinjerto implica transferir piel de un animal a la herida de un humano. Se han realizado menciones de este procedimiento por Canaday y Lee, quienes utilizaron piel de lagarto y de oveja respectivamente, con el objetivo de lograr una cobertura permanente. Mas adelante, Davies y Silveti emplearon piel de embrión bovino, lo cual no solo arrojó resultados más favorables, sino que también permitió una compresión más clara de la cobertura temporal (54).

A partir de la década de 1960, la piel de cerdo ganó popularidad como xenoinjerto, como cobertura de la variedad terapéutica, y se convirtió en una parte integral del cuidado de las quemaduras. Desde entonces, ha sido el material más utilizado y estudiado en este campo (54).

Después de aplicar la cobertura con piel de cerdo, se ha observado que no se produce vascularización, es decir no hay crecimiento de capilares ni conexiones entre los vasos sanguíneos de la piel de cerdo y los del huésped. En su lugar, se forma un tejido de granulación entre la cobertura y la herida en proceso de reparación. La nutrición de este tejido se lleva a cabo de manera pasiva a través de la difusión, lo que significa que su viabilidad se mantiene solo durante un período de tiempo limitado (ver figura 10). Eventualmente, ya sea al completarse la reparación de la herida o al cambiar el apósito, la cobertura se desprende. Es importante destacar que, tanto en la finalización de la reparación de la herida como en los casos de cambio de apósito, no se ha observado una respuesta inmunológica ni la formación de anticuerpos anti-injerto. Además, se ha evidenciado la ausencia de rechazo en casos de segundo re-injerto a lo largo del tiempo (54, 55). Cuando se utiliza un apósito no viable, los resultados son similares sin presentar diferencias significativas. Por consiguiente, la piel de cerdo puede considerarse como una prótesis de colágeno y fibrina (54).

En la clínica, históricamente se ha seguido el siguiente protocolo para el procesamiento de la piel de cerdo (54):

2 Métodos: Piel fresca o Preservada, cada uno con beneficios particulares:

- Piel fresca: Potencialmente viable. Puede durar almacenada por refrigeración por criopreservación hasta por 3 semanas.
- Preservada: Se prolonga su almacenamiento y disminuye su viabilidad. No hay datos que muestren resultados diferentes en cuanto a la efectividad de las coberturas en la reparación de la herida. Los medios de preservación son variados:
 - o Liofilizada: Secado-Congelado
 - o Deshidratación química con glicerol: Disminuye antigenicidad, la carga viral y bacteriana

- Esterilización: con radiación gamma, óxido de etileno, plasma con peróxido de hidrógeno.

El proceso de preparación del xenoinjerto es el siguiente (54):

En primer lugar, se procede al sacrificio del animal en un recinto que cumple con las medidas bioéticas y de investigación necesarias. A continuación, se elimina el pelo del animal mediante el vertido de agua a una temperatura de 60° C.

Una vez realizada esta etapa, se procede a limpiar la piel con una solución de iodo-povidona al 10%. Posteriormente, la piel es sometida a una cosecha utilizando un demotomo, con un rango de espesor de 0.014 a 0.016 pulgadas (0.3556 a 0.4064 mm). Dependiendo de la zona, la piel puede constar de una o dos capas, siendo comúnmente dos.

Después de la cosecha, las capas de piel son sometidas a dos lavados en solución salina. A continuación, se colocan en una solución de medio Dulbecco Modified Eagle suplementado con glicerol (150 ml/L), penicilina/estreptomicina y bicarbonato de sodio.

Una vez preparadas, las capas de piel se guardan en bolsas de polietileno y se congelan gradualmente hasta alcanzar una temperatura de -90° C. También es posible conservar la piel utilizando nitrógeno líquido a una temperatura de -196° C, con una duración máxima de 12 meses.

Finalmente, la piel es esterilizada mediante radiación gamma utilizando Cobalto 60, aplicando una dosis de entre 18.8 y 23.8 Gy.

Para su uso, es descongelada en inmersión de agua salina por 10 minutos. Lavada en iodo povidona 10 % por 5 – 10 minutos. Vuelta a la lavar en solución salina por el mismo periodo de tiempo de 10 minutos y está lista para su uso. (54)

La aplicación de la cobertura en la terapéutica del paciente quemado se realiza a través de diferentes enfoques, los cuales se describen de la siguiente manera (54, 55):

La primera forma de aplicación es como una cobertura temporal hasta la curación espontánea, también conocida como reepitelización. Esta aplicación se lleva a cabo aproximadamente 48 horas después de la quemadura, cuando la exudación ha disminuido, lo que permite una mejor adherencia. En algunos casos, este período puede ser incluso menor a 24 horas. Dependiendo de las condiciones del paciente y del objetivo terapéutico, la cobertura puede ser cambiada en intervalos variables, que pueden ser de 1, 2, 3, 4, o hasta 15 días. Esta forma de cobertura se utiliza en quemaduras superficiales de grado I, quemaduras superficiales de pequeño espesor de grado II A, en sitios que han donado el injerto y en condiciones exfoliativas como el síndrome de Stevens-Johnson.

Otra forma de aplicación es como una cobertura temporal hasta la cobertura definitiva. Se utiliza cuando la quemadura no puede recibir un autoinjerto o cuando no hay suficiente piel disponible. Esta opción se aplica después de la escisión quirúrgica inmediata de la herida por quemadura, cuando el injerto del donador es insuficiente, o cuando hay sospecha o diagnóstico de infección en el sitio que se espera que reciba el autoinjerto en el futuro.

Además, existe la técnica de injerto sobrepuesto, también conocida como técnica de sándwich. Esta técnica se utiliza en heridas infectadas, donde la aplicación de la cobertura y los cambios posteriores reducen gradualmente la contaminación. El objetivo de esta técnica es separar los bordes necrotizados de la piel sana, lo cual es especialmente relevante en quemaduras causadas por productos químicos o úlceras. Este enfoque actúa como un desbridamiento biológico y acelera el proceso de reparación. En algunos casos, puede reducir el tiempo de cicatrización de la herida de 14 a 8 días, lo cual resulta beneficioso.

La cobertura de piel de cerdo en el paciente quemado produce varios resultados clínicos beneficiosos (ver figura 10) (54, 55):

En primer lugar, se observa una reducción considerable en la sensación de dolor experimentada por el paciente. Esto proporciona alivio y mejora su calidad de vida durante el proceso de cicatrización.

Además, esta cobertura facilita la movilización tanto del paciente en general como del área específica quemada. Esto contribuye a una mayor comodidad y una recuperación más rápida, ya que el movimiento y la actividad física adecuada son fundamentales en el proceso de rehabilitación.

La cobertura de piel de cerdo también desempeña un papel importante en la protección física de la lesión. Actúa como una barrera que ayuda a prevenir infecciones y evita la pérdida excesiva de calor, fluidos, proteínas y electrolitos del área quemada.

Otro beneficio es la reducción de la colonización e infección de la herida. La piel de cerdo posee propiedades antimicrobianas y ayuda a mantener la herida en condiciones óptimas para la cicatrización, minimizando el riesgo de complicaciones infecciosas. Finalmente, la cobertura de piel de cerdo se caracteriza por su capacidad de adherencia, independientemente de la viabilidad de la piel del cerdo utilizada. Esto significa que no es necesario utilizar material de sutura o equipos adicionales para asegurar su fijación a la herida.

Se ha utilizado la piel porcina por más de medio siglo. Herbert, L y colaboradores (56) demostraron que el uso de la piel porcina para el tratamiento de quemaduras es eficaz para el tratamiento y reparación de la herida, promoviendo la cicatrización, reduciendo la percepción del dolor, un transcurso de la terapéutica con menor riesgo de infección y unos resultados favorables en la rehabilitación del paciente

Angelo A y colaboradores (57) y más adelante, la investigadora Diana Kitale y et al (58) demostraron que la cobertura de piel porcina tiene efectos benéficos como opción terapéutica para heridas por quemaduras.



Figura 10: Fotografías de aplicación de la cobertura de piel de cerdo. a, Aplicación de la cobertura tras 24 horas del proceso quirúrgico, inicialmente es con apósito que brinda soporte mientras se adhiera el sustituto de piel a la herida. b, Después de 24 horas, el sustituto se encuentra adherido a la superficie de la herida, no hay espacio muerto entre estas superficies. c, El apósito adquiere cierto tono tras una buena adherencia que permite un intercambio adecuado de humedad y gases, lo que brinda un medio adecuado para la

Antecedentes

Cultivo celular sobre piel porcina radioesterilizada (PPR)

Cabello y colaboradores han evaluado el cultivo de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hADMSC) sobre PPR. Este biomaterial ha sido tomado como una cobertura para el tratamiento de heridas crónicas o por quemaduras. Tenían el objetivo de valorar este andamio y celularizarlo para trasplantar células troncales al sitio de lesión, de esta manera buscaron que las células multipotenciales (59); llegaran al sitio de lesión comenzaran a adherirse, proliferar, diferenciarse y secretar factores de crecimiento, citocinas y promover la deposición de componentes de la matriz extracelular para apoyar la reparación de la herida. Sembraron hADMSC a una densidad de 60,000 células en 2cm² del andamio, el cual se dejó incubar 1 hora e inmediatamente después se añadió medio de cultivo suplementado para permitir el cultivo de las células sobre el biomaterial, el cual se dejó incubar 24 horas. Transcurridas las 24 horas realizaron ensayos de viabilidad celular con el kit (LIVE/DEAD, viability/cytotoxicity for mammalian cells, Molecular Probes) (ver figura 11).

RPS+MSC

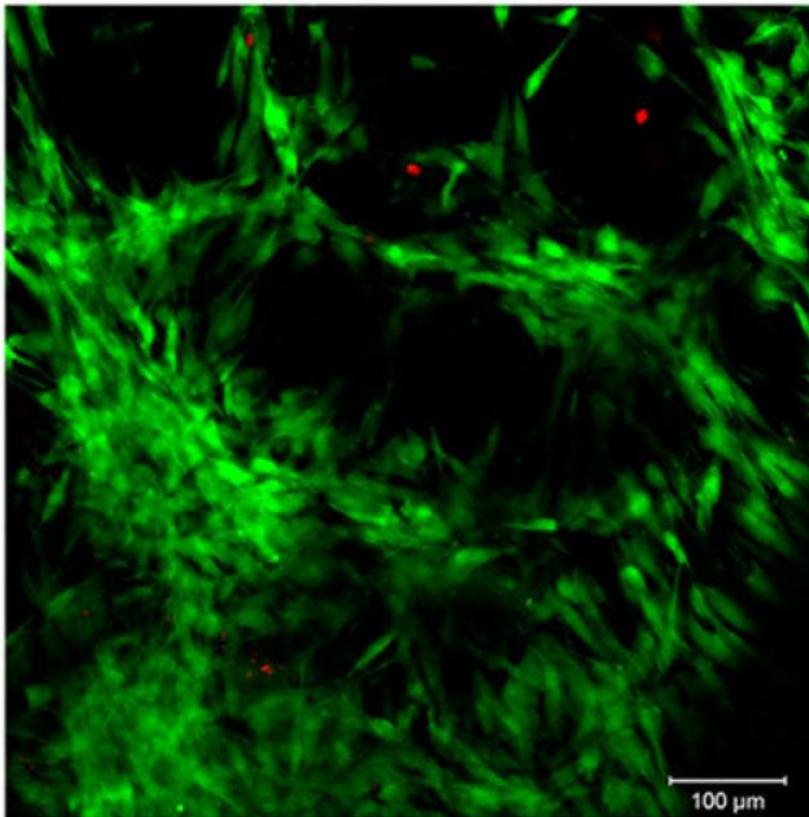


Figura 11: La piel porcina radioesterilizada permite la adhesión de células madre mesenquimales. Las células vivas se tiñen de calceína (verde) y las células muertas con homodímero-1 de etidio (rojo). La densidad celular teñida con calceína muestra el gran número de células viables, la mínima presencia de homodímero -1 de etidio sugiere que el andamio presenta buena viabilidad. Fotografía detectada con apoyo de AxioVision epifluorescence microscope (Carl Zeiss) a escala de 100 μm. Imagen obtenida y modificada de Cabello-Arista B y colaboradores 2022 (59).

Cabello y colaboradores encontraron que la PPR permite la adhesión y viabilidad de las hADMSC. También hallaron que este andamio promueve y aumenta el depósito de colágeno por parte las células cuando es utilizado como cubierta de piel en heridas por quemaduras en un estudio sobre murinos (59).

Sánchez y colaboradores probaron de la misma manera que el biomaterial en cuestión permite la adhesión, proliferación y viabilidad de las células hADMSC (ver figura 12). Además, observaron que la PPR tras el tratamiento con cloro e irradiación con Cobalto conserva restos celulares (ver figura 13) (60).

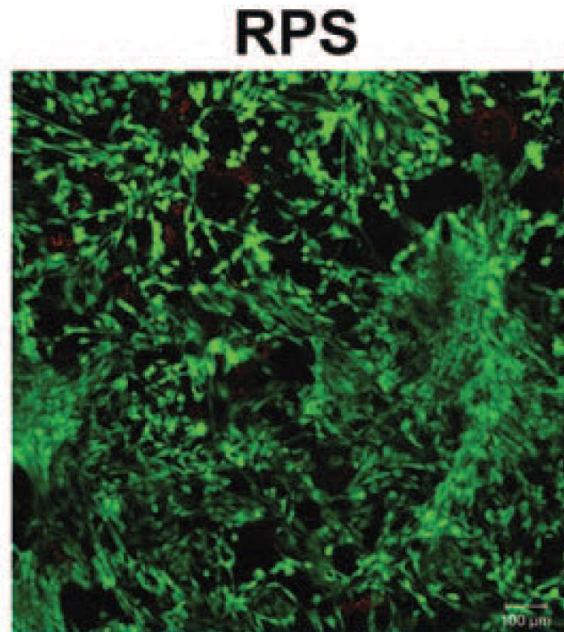


Figura 12: Adhesión y viabilidad de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano sobre piel porcina radioesterilizada. Las células viables se tiñeron con calceína Am (verde) y las células muertas con homodímero-1 de etidio (rojo). Se observa la intensa densidad de calceína, lo que sugiere una buena viabilidad, además que se aprecia que la morfología se preservó lo que indique que el andamio permite la adhesión y proliferación. Fotografía analizada con microscopio confocal LSM 780 y ZEN 2010 Carl Zeiss software a escala de 100 μm . RPS = Piel porcina radioesterilizada. Imagen obtenida y modificada de Sánchez-Sánchez R y colaboradores 2015 (60).

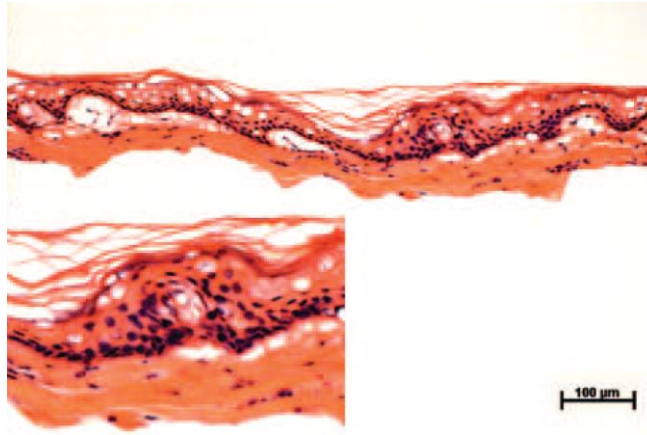


Figura 13: La piel porcina radioesterilizada conserva restos celulares. La PPR conserva ciertos restos celulares tras haber sido tratada con hipoclorito e irradiación con Cobalto. Imagen con escala de 100 μm . Imagen obtenida y modificada de Sánchez-Sánchez R y colaboradores 2015 (60).

Ortega-Sánchez C y colaboradores (61) cultivaron células autólogas, entre estas fibroblastos y queratinocitos en la PPR. Encontraron que los queratinocitos cultivados sobre este andamio presentan alta viabilidad y valoraron también si el andamio estimulaba a los queratinocitos a secretar mayores cantidades de FGF, y demostraron un incremento en sus valores de 0.5 μg a diferencia de los valores del grupo control.

Las nanopartículas de plata (AgNPs)

La naturaleza antimicrobiana de la plata está ampliamente documentada, demostrando su capacidad incluso para combatir cepas resistentes. Los informes históricos datan del año 4,000 a.C., y uno de los primeros historiadores reconocidos, Herodoto, ya mencionaba el uso de la plata en materiales y utensilios debido a sus reconocidas propiedades. Específicamente, se han reportado aplicaciones de plata en la recuperación de heridas, el tratamiento de úlceras y la profilaxis contra infecciones. Incluso antes del descubrimiento de los antibióticos, las formulaciones de plata se utilizaban como terapia antimicrobiana, tanto de forma tópica como oral. Desde el siglo XVI, se han empleado recubrimientos de plata para tratar heridas por quemaduras (62)

Las nanopartículas se definen como la disposición de átomos y moléculas de uno o varios elementos en el rango de tamaño de 1-100 nm (ver figura 14). Esta presentación en forma de nanopartículas confiere propiedades distintas a las que exhiben en su forma macroscópica. Prácticamente todos los metales pueden procesarse hasta convertirse en nanopartículas, como

el oro, el titanio, el magnesio y la plata. Las nanopartículas tienen la capacidad de eliminar o inhibir bacterias, hongos, levaduras e incluso virus (62 - 65).

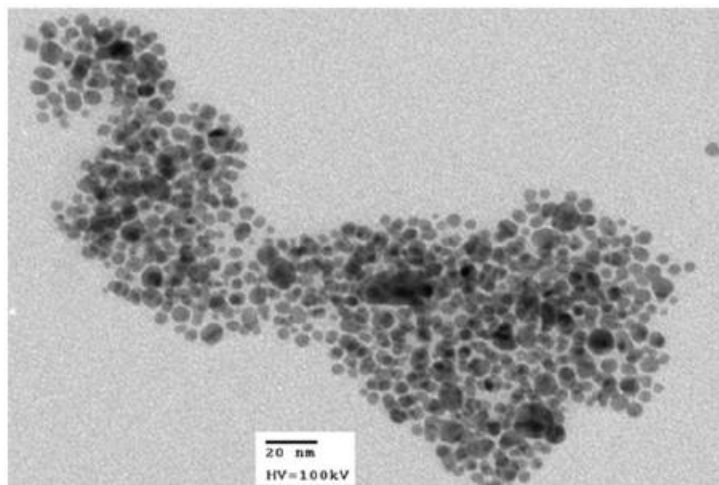


Figura 14: Microfotografía de nanopartículas de plata (AgNPs) con microscopio electrónico de barrido. Escala de 20 nm. Se observa el resultado del procesamiento “Top-Down” de plata a granel por procesamiento químico, con morfología esférica. Fotografía tomada con microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230 (Tokyo, Japan) con voltaje acelerado de 100 kV. Imagen obtenida y modificada de: Pérez-Díaz MA et al 2018 (64).

En la actualidad, las AgNPs son las más prevalentes en productos comerciales, encontrándose en hasta un 55% de ellos. Estas partículas han despertado un creciente interés en diversas áreas de investigación, como la medicina, la industria textil, la química, los biosensores, la electrónica y la óptica. Este resurgimiento y el interés en las diferentes propiedades de las AgNPs han brindado nuevas posibilidades a la tecnología. (62, 64)

La presencia en el mercado de diversas opciones de sustitutos de piel impregnados con plata en diferentes presentaciones evidencia las ventajas de la plata como medida profiláctica contra infecciones. En ensayos realizados en animales *in vivo*, se ha demostrado que los apósitos con plata reducen significativamente la inflamación, sin afectar el eritema ni la epitelización. Entre las diferentes opciones de coberturas de plata, los biomateriales impregnados con nanopartículas de plata (nanocompuesto) han demostrado una mayor eficacia en términos de profilaxis (63, 66).

Mecanismo de acción

Varias características de las nanopartículas, como su tamaño, morfología, carga eléctrica, cristalización, potencial zeta e ionización, entre otras, influyen en sus propiedades antimicrobianas. En particular, el tamaño de las nanopartículas muestra una relación inversa

con su actividad antimicrobiana (ver figura 15). Esto se debe a que las partículas más pequeñas pueden cubrir una mayor superficie de la membrana o pared bacteriana en comparación con partículas más grandes (62).

La acción antimicrobiana de las nanopartículas se debe a varios mecanismos, como el daño a la pared y/o membrana celular, la generación de especies reactivas de oxígeno, el estrés oxidativo intracelular y extracelular, así como la formación de radicales libres (62, 67).

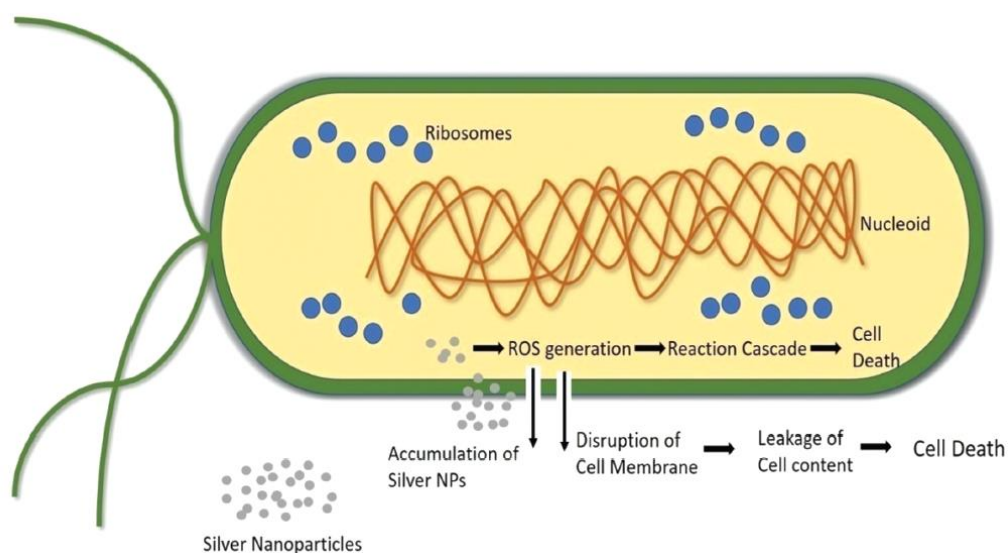


Figura 15: Mecanismo de acción de las nanopartículas de plata (AgNPs). El tamaño dentro del rango de nanopartículas facilita la aglomeración e interacción de las AgNPs con la pared y/o membrana de la bacteria. Esta interacción por cargas o por el mismo potencial zeta genera la penetración e introducción hacia el interior de la bacteria. La presencia del metal implica la ionización y consecuentes cascadas de oxidación por macromoléculas presentes en la membrana y proteínas citosólicas. Se piensa que el metal y su carga implica interacciones con otros metabolitos que dificulta su interacción en la vía celular o como sustrato de otras enzimas necesarias. Imagen obtenida y modificada de:Gharpure S et al 2020 (62).

Estudios recientes han revelado que el amplio espectro de acción de las AgNPs abarca bacterias Gram+, Gram-, y especialmente bacterias multidrogo resistentes. Este efecto se atribuye a la exposición al oxígeno en el entorno y el incremento proporcional de especies reactivas de oxígeno, la biodisponibilidad y el grado de difusión de las partículas, factores que aún están siendo investigados. Se ha observado que las AgNPs potencian la ionización, lo que promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, como resultado, su efecto bactericida (67). Estas partículas pueden actuar tanto individualmente como en sinergia con fármacos y/o compuestos orgánicos de los cuales se conoce la biodisponibilidad,

el sitio de acción y la dosis. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado resultados positivos (68, 69)

Estos diversos mecanismos mencionados actúan simultáneamente y, además, se puede agregar el fármaco, lo que genera un sinergismo que potencia su acción y respuesta, permitiendo reducir la dosis y, por lo tanto, los efectos secundarios asociados tanto a las nanopartículas como al fármaco (69).

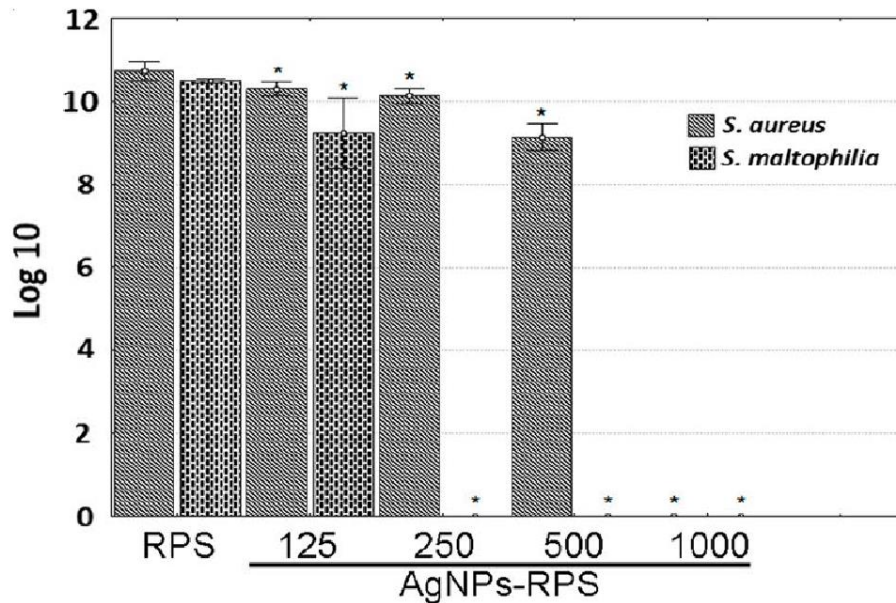
Cabe señalar que las bacterias no han demostrado un mecanismo de resistencia frente a las AgNPs, lo que hace que las AgNPs sean efectivas como agentes de amplio espectro (56). Esto las convierte en una opción adecuada para su aplicación en diversos aspectos médicos, incluyendo diagnóstico, tratamiento, terapéutica, instrumentación y profilaxis.(62, 63, 65 - 69)

De esta manera, las nanopartículas de plata se presentan como una opción prometedora tanto como agente profiláctico como antimicrobiano activo de amplio espectro. Su eficacia abarca no solo microorganismos bacterianos, sino también organismos de otras clases taxonómicas, lo que las convierte en una herramienta valiosa para prevenir la contaminación e infección de heridas.

Cultivo celular sobre piel porcina radioesterilizada e impregnada con nanopartículas de plata (nanocompuesto).

Las nanopartículas de plata (AgNPs) fueron obtenidas a través del método conocido como “top-down”, es decir, de una estructura grande se obtienen fragmentos cada vez más pequeños hasta el rango de nanopartículas (1 – 100 nm). El proceso de reducción de la plata a granel fue por reducción química como Pérez-Díaz y colaboradores demostraron (60), donde a partir de una dispersión coloidal suspendida en un medio acuoso es sometida a solventes orgánicos y consecuentemente serán reducidas (64). En resumen, 100 ml de 10 nM de solución AgNO₃ fue mezclada con 0.1g de ácido gálico y disuelto en 10ml de agua desionizada. Después, el pH fue inmediatamente ajustado a 11 y tras la reacción, la suspensión fue dializada para purificar las AgNPs (64).

Pérez-Díaz et al. Probaron concentraciones de inhibición mínima (MIC) de las nanopartículas de plata contra *Stenotrophomonas maltophilia* y *Staphylococcus aureus* (ver gráfica 3), donde los microorganismos tras haber sido cultivados por 24 horas se sometieron a diluciones seriadas de AgNPs (64).



Gráfica 3: Análisis cuantitativo de la inhibición de microorganismo por las nanopartículas de platas. Se analizó contra *S. aureus* y *S. maltophilia*. Se presenta en Log 10 del número de unidades formadoras de colonias (CFU), analizados desde una dilución de 8 vs la piel porcina radioesterilizada e impregnada (AgNPs-RPS) a 125 ppm; 250 ppm; 500 ppm; 1,000 ppm. * $p < 0.05$ ANOVA, Tukey pos hoc test. Gráfica obtenida y modificada de Pérez-Días y colaboradores 2018 (64).

Pérez-Días y colaboradores caracterizaron y describieron la concentración de AgNPs eficaz que al impregnar la piel porcina radioesterilizada (PPR) inhibe el crecimiento bacteriano y permite conservar las cualidades de la PPR al permitir la adhesión celular (ver figura 16). Sembraron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) a una densidad de 30,000 células en 1 cm² de varias PPR impregnadas a concentraciones seriadas (1,000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm), estos andamios impregnados celularizados los dejaron incubar una hora y añadieron medio de cultivo suplementado con 10% suero fetal bovino y antibiótico 1%, así mismo los dejaron incubar otras 24 horas. Evaluaron la viabilidad celular los andamios (ver figura 16) con el ensayo calceína-homodímero etidio analizado con microscopio confocal LSM 780 y ZEN 2010 Carl Zeiss y concluyeron que la PPR concentraciones bajas como 125 ppm de impregnación de AgNPs inhibe el crecimiento bacteriano y al mismo tiempo permite el cultivo celular de las ADMSC (64)

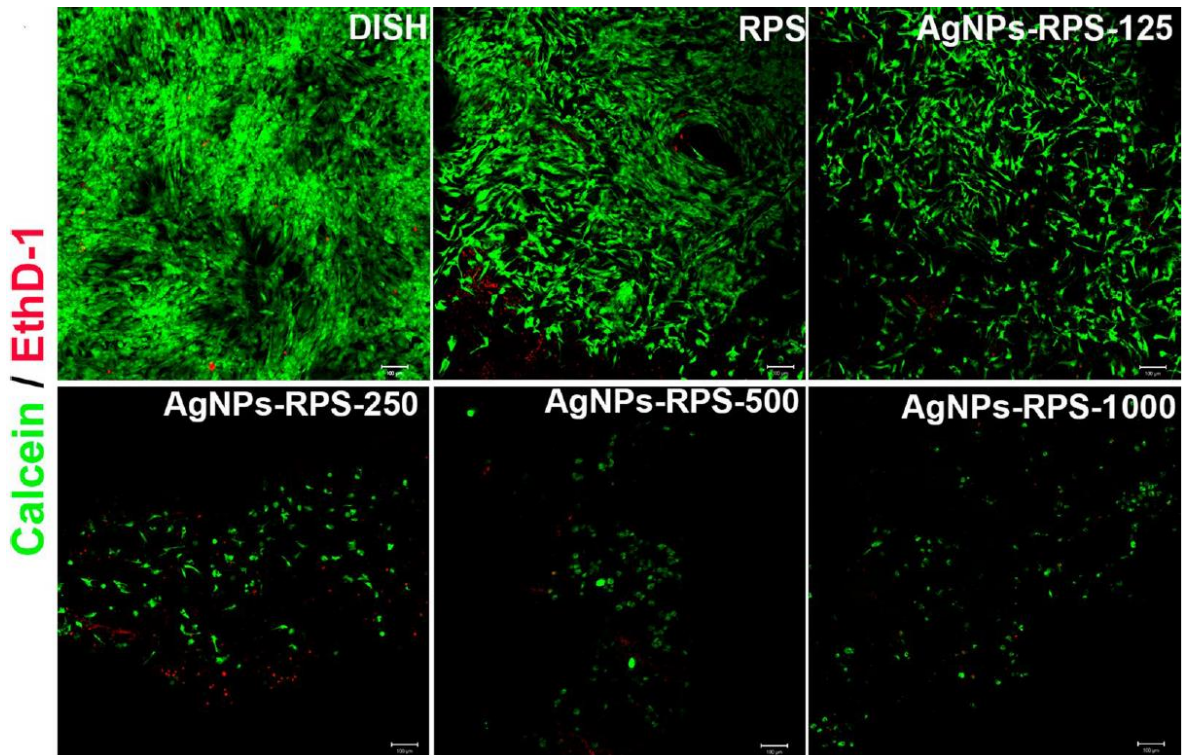


Figura 16: Viabilidad celular de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo cultivadas sobre piel porcina radioesterilizada e impregnada a diluciones seriadas de nanopartículas de plata. Las células vivas se tiñeron con calceína Am (verde) y las células muertas se tiñeron de homodímero-1 de etidio (rojo). Las células se sembraron a una densidad de 30,000 células y se cultivaron por 24 horas. La intensa densidad de calceína Am en el grupo control de piel porcina radioesterilizada (PPR= RPS), disminuye considerablemente inversamente proporcional a la concentración de nanopartículas de plata (AgNPs). Imagen tomada con microscopio confocal LSM 780 y ZEN 2010 Carl Zeiss a escala de 100 µm. Imagen obtenida y modificada de Pérez-Días y colaboradores 2018 (64).

Planteamiento del problema

Las quemaduras extensas representan una de las lesiones más graves y complejas en el ámbito de la medicina, ya que superan la capacidad de reparación de la piel en el espectro de regeneración. Estas lesiones presentan desafíos significativos, especialmente cuando la superficie quemada es demasiado extensa para considerar el autoinjerto como una opción

viable. Además, las infecciones y contaminaciones son complicaciones comunes en pacientes quemados, lo que aumenta la urgencia de buscar opciones terapéuticas eficaces y seguras.

En el contexto de México, la situación se complica debido a la limitada opción terapéutica actual, que se basa principalmente en el uso de epifast. Esto con la posibilidad de poner en riesgo la ventana de intervención terapéutica adecuada para los pacientes. Por lo tanto, es imperativo abordar esta problemática mediante la investigación y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que permitan mejorar los resultados clínicos y la calidad de vida de los pacientes quemados en el país.

La primera problemática radica en el hecho de que las heridas por quemaduras extensas superan la capacidad de regeneración de la piel. La piel es el principal órgano protector del cuerpo humano y su función de barrera se ve comprometida cuando se produce una quemadura extensa. Esto dificulta enormemente el proceso de cicatrización natural y aumenta el riesgo de infecciones.

Además, cuando la superficie quemada es demasiado extensa, el autoinjerto se vuelve inviable como opción de tratamiento. El autoinjerto implica tomar piel sana de una parte del cuerpo del paciente y trasplantarla a la zona quemada. Sin embargo, en casos de quemaduras extensas, la cantidad de piel sana disponible es limitada y no es suficiente para cubrir toda la superficie afectada. Por lo tanto, es necesario explorar nuevas opciones terapéuticas que puedan brindar una cobertura efectiva para estas lesiones extensas.

Otro desafío importante se presenta cuando el sitio lesionado tiene sospechas de infección. Las infecciones en pacientes quemados pueden tener consecuencias devastadoras y retrasar significativamente el proceso de curación. Por lo tanto, es fundamental buscar opciones terapéuticas que tengan propiedades antimicrobianas efectivas y puedan prevenir y tratar infecciones de manera eficaz.

En México, la opción terapéutica actual se limita principalmente al uso de epifast, lo cual implica una sola alternativa para el tratamiento de pacientes quemados. Esta limitación pone en riesgo el tiempo y el tratamiento médico adecuado, ya que no se cuenta con suficientes opciones terapéuticas para abordar las necesidades de estos pacientes de manera óptima.

Por consiguiente, surge la imperante necesidad de abordar estas problemáticas en pacientes con quemaduras extensas en México mediante un enfoque de investigación innovador. Una propuesta prometedora radica en la creación de coberturas de piel de cerdo, enriquecidas con nanopartículas de plata de propiedades antimicrobianas. Esta novedosa estrategia busca proporcionar una alternativa terapéutica efectiva, segura y de amplio acceso, con el potencial de optimizar los resultados clínicos y mejorar la cicatrización, además de prevenir infecciones en pacientes quemados.

En este contexto, se plantean preguntas cruciales que requieren respuestas para fundamentar y enriquecer este enfoque. ¿Es viable el cultivo de fibroblastos sobre la piel porcina radioesterilizada e impregnada con nanopartículas de plata? Este interrogante apunta a explorar la interacción entre los fibroblastos y la piel tratada, identificando si los fibroblastos

pueden prosperar en este entorno modificado y potencialmente acelerar el proceso de cicatrización.

Adicionalmente, se interroga sobre si la piel porcina radioesterilizada tiene la capacidad de estimular a los fibroblastos para liberar mayores cantidades de Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF). Esta cuestión busca desentrañar el potencial impacto bioquímico de la piel modificada en las funciones celulares, específicamente en la secreción de FGF, que es fundamental para el proceso de cicatrización.

Objetivos.

Objetivo general

Analizar si la PPR impregnada con nanopartículas de plata permite la viabilidad de fibroblastos y si promueve la liberación de FGF.

Objetivos específicos

1. Evaluar la viabilidad celular de los fibroblastos cultivados sobre PPR y PPR impregnada con nanopartículas de plata.
2. Analizar la concentración de FGF en los sobrenadantes mediante ensayos de ELISA.

Material y métodos.

Recursos Materiales

1. Caja de Cultivo (CDC) marca Corning
2. Linaje celular Fibroblasto de cultivos primarios
3. Medio de cultivo DMEM-F12 marca Gibco (MDC)
4. Medio de cultivo suplementado (MDC+S)
5. PBS pH 7.4 marca Gibco
6. Tripsina 0.25% marca Gibco
7. Suero Fetal Bovino marca Gibco
8. Solución Nanopartículas de Plata 1,000ppm (AgNPs) caracterizado como Pérez-Díaz MA y colaboradores (64).
9. Antibiótico: penicilina y estreptomina marca Gibco
10. Kit: Human FGF-basic Standard ABTS ELISA Development Kit marca Peptotech
11. Tween-20 marca Gibco
12. ABS marca Gibco
13. Pipetas de 10 ml
14. Pipetas de 25 ml
15. Pipetas Pasteur
16. Bomba de vacío
17. Pipetor
18. Pinzas de relojero

19. Pinzas de disección con dientes
20. Esterilizador de radiación
21. Placa para ELISA de 96 pozos
22. Placa de cultivo de 48 pozos (PDC)
23. Micropipetas de 1000 μ l , 200 μ l, 10 μ l.
24. Puntas para Micropipetas de 1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l.
25. Tubos Falcon de 15 ml y de 50 ml
26. Tubos Eppendorf de 500 μ l.
27. Espectrómetro
28. Micropipeta multicanal de 12 canales
29. Micropipeta multicanal de 8 canales
30. Recipiente volumétrico estéril
31. Campo estéril
32. Piezas circulares de piel de cerdo radio esterilizada (PPR) de 5mm de diámetro
33. Piezas circulares de piel de cerdo radio esterilizada impregnada con AgNPs (PPR+AgNPs) a 125ppm de 5mm de diámetro.
34. Cámara de Neubauer
35. Perforadora de metal inoxidable
36. Trampa para bomba de vacío
37. Manguera para trampa y bomba de vacío
38. Alcohol isopropílico marca Sigma Aldrich
39. Dimetilsulfóxido marca Sigma Aldrich.
40. Campana de flujo laminar
41. Equipo de incubación celular
42. Equipo de irradiación ionizante
43. Equipo de agitación de laboratorio.
44. Equipo de lavado ultrasónico.

Métodos

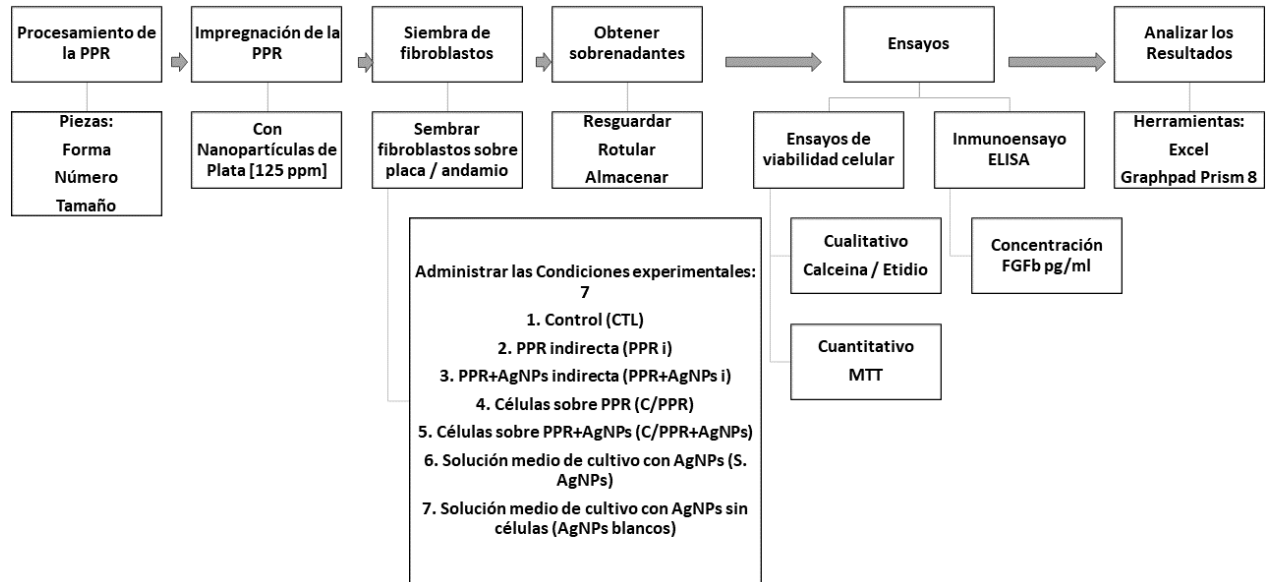


Figura 17: Diagrama de actividades del trabajo de investigación. Autoría propia

1. Procesamiento de la Piel Porcina Radioesterilizada (PPR)

Las láminas de PPR (ver anexo 1) fueron provistas por el Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). El BTR tiene la licencia sanitaria para el procesamiento de tejidos desde el 07 de julio de 1999 y su Sistema de Gestión de Calidad está certificado por la norma ISO 9001:2008 desde el 01 de agosto de 2003 (64). Se encarga de seleccionar cuidadosamente al animal donador con apoyo de un veterinario, se sacrifican en una planta de sacrificio, se traslada al banco de tejidos donde se procesa: Se limpia, se desinfecta, se corta en tiras de tamaño y espesor adecuado; las cuales se preservan congeladas, en glicerol o bien se deshidratan por liofilización. Estas se irradian con gamma del Cobalto-60 (70).

En el BTR se verifica que todo el proceso se llevó a cabo de la manera establecida y verificada por el Control de Calidad. Esta pieza de PPR es llevada a su destino (70).

La PPR se procesó bajo condiciones estériles y asépticas en campana de flujo y con el material: Perforadora de acero inoxidable, pinzas Kelly rectas, 2 tubos Falcón estériles de 50 ml, y rotulador.

En la campana de flujo se expuso la PPR y se procedió con el apoyo de instrumentación, la toma de fragmentos circulares, de aproximadamente 1 cm de diámetro y en cantidades adecuadas (ver anexo 2).

Las piezas circulares se resguardaron en los 2 tubos Falcon de 50 ml. Uno de ellos se rotuló como PPR, y quedaron las piezas listas para el protocolo.

El resto de las piezas se rotularon como PPR+AgNPs y se sometieron al proceso de impregnación.

2. Impregnación de la Piel Porcina Radioesterilizada con nanopartículas de plata a 125 ppm (PPR+AgNPs)

Las nanopartículas fueron sintetizadas como Pérez-Díaz y colaboradores describieron (57). Se obtuvo un suspendido de AgNPs a 1,000 ppm.

En tubo falcon de 15 ml se preparó una solución de AgNPs con agua estéril hasta una dilución de 125 ppm (ver anexo 3).

En el tubo Falcon de 50 ml, que contenía las piezas restantes de PPR y que se rotuló como PPR+AgNPs, se llenó con la solución AgNPs 125 ppm. Este tubo se dejó incubar en equipo de agitación a 37° C y a 250 rpm.

Tras 24 horas, se colocaron en sonicación a 40kHz por 10 min (ver anexo 4). Se retiró la solución de AgNPs y se realizó un lavado con PBS para retirar el exceso de nanopartículas de plata. Las piezas impregnadas se extendieron en una placa Petri estéril en la campana de flujo y se dejaron secar (ver anexo 5). Una vez retirada la humedad, se almacenaron en un nuevo tubo Falcon de 50 ml, se rotularon y las piezas impregnadas a 125 ppm estaban listas para continuar con el protocolo.

3. Cultivo de Fibroblastos con las condiciones experimentales de PPR y PPR impregnada

Siembra de Fibroblastos sobre placa de cultivo / PPR

A partir de cultivo primario de fibroblastos. se expandieron en cajas de cultivo y se sometieron a solución PBS : Tripsina 25%. Se obtuvo un suspendido celular en Medio de cultivo DMEM F-12 suplementado (suero fetal bovina 10% + antibiótico 1%).

En una placa de cultivo de 48 pozos se distribuyó la planeación de 7 condiciones experimentales:

1. Grupo Control (CTL): Fibroblastos cultivados sobre la placa de cultivo.
2. Grupo PPR indirecta (PPR i): Fibroblastos cultivados sobre la placa de cultivo y medio de cultivo no suplementado que incubó 24 horas en contacto con PPR.
3. Grupo PPR impregnada indirecta (PPR+AgNPs i): Fibroblastos cultivados sobre la placa de cultivo y medio de cultivo no suplementado que incubó 24 horas en contacto con PPR impregnada
4. Grupo Células cultivadas sobre PPR (C/PPR): Fibroblastos cultivados sobre PPR con medio de cultivo no suplementado.
5. Grupo Células cultivadas sobre PPR impregnada (C/PPR+AgNPs): Fibroblastos cultivados sobre PPR impregnada con medio de cultivo no suplementado.
6. Grupo Solución medio de cultivo con AgNPs (S. AgNPs): Fibroblastos cultivados sobre la placa de cultivo y medio de cultivo no suplementado con nanopartículas de plata a 125 ppm.
7. Grupo Solución medio de cultivo con AgNPs sin células (AgNPs blancos): Placa de cultivo sin células con medio de cultivo no suplementado con nanopartículas de plata a 125 ppm.

Cada grupo (vertical) se realizó por triplicado en la placa de cultivo a nivel de “A-B-C” (ver anexo 6). En los grupos 1, 2, 3 y 6 se colocó en el centro del pozo una gota de 10 µl con una densidad de 40,000 fibroblastos suspendidos en DMEM-F12 suplementado.

En los grupos 4 y 5 a nivel de “A-B-C” se colocó una pieza de PPR y PPR+AgNPs respectivamente, de manera que la cara dérmica quedara superficial (ver anexo 7) y de esta manera recibiera las células. También se colocó sobre la piel una gota de 10 µl con una densidad celular de 40,000 fibroblastos suspendidos en DMEM F-12 suplementado (ver Anexo 5).

En el grupo 7 a nivel “A-B-C” se administró 320 µl DMEM F-12 no suplementado (ver anexo 6).

En los grupos 4 y 5 a nivel “D-E-F” se colocó una pieza de PPR y PPR+AgNPs respectivamente. A cada pozo se le administró 320 µl de DMEM F-12 no suplementado (ver anexo 8)

La placa se dejó incubar 1 hora para permitir la adhesión celular. Posteriormente se administraron 320 µl de DMEM F-12 suplementado a los 1 – 6 a nivel de “A-B-C”. Cada protocolo de siembra se realizó por triplicado.

Cultivo de fibroblastos con las condiciones experimentales

Tras 24 horas de incubación de las células sobre la placa de cultivo de 48 pozos. Se retiraron los sobrenadantes a nivel de “A-B-C” y se sometieron los mismos pozos a 2 lavados con PBS.

A los grupos 1, 4 y 5 a nivel “A-B-C” se administró 320 µl por pozo de DMEM F-12 no suplementado (ver anexo 9).

A los grupos 2 y 3 a nivel “A-B-C” se pasó el DMEM F-12 no suplementado que se dejó incubar 24 horas PPR y PPR+AgNPs a nivel “D-E-F” respectivamente (ver anexo 9).

A nivel 6 y 7 a nivel “A-B-C” se administró 320 µl por pozo de DMEM F-12 no suplementado con nanopartículas de plata a 125 ppm (ver anexo 9).

La placa se dejó incubar por otras 24 horas.

4. Obtención de sobrenadantes

Tras las 24 horas de incubación de los fibroblastos con las condiciones experimentales, se resguardaron los sobrenadantes en tubos eppendorf de 1.5 ml, se rotularon y almacenaron a -20° C hasta su utilización en el ensayo ELISA.

5. Ensayos de viabilidad celular

Se realizaron 2 tipos de ensayos, el ensayo cualitativo por reactivo Calceina Am / Homodímero -1 de Etidio y, el ensayo cuantitativo por reactivo MTT.

Ensayo de viabilidad celular cualitativo Calceina / Etidio

Una vez resguardados los sobrenadantes de la placa de cultivo, se administró a los pozos a nivel “A-B-C” 320 µl por pozo de DMEM F-12 con calceina a 1 µM y etidio a 2 µM. La placa se dejó incubar 45 min en incubadora para cultivo celular y se tomaron fotografías a través de microscopio vertical de fluorescencia con apoyo de software ZEN 2010.

Ensayo de viabilidad celular cuantitativo MTT

Una vez resguardados los sobrenadantes de la placa de cultivo, se administró 320 µl por pozo de la solución DMEM F-12 : MTT 10%. Se dejó incubar la placa en incubadora de cultivo celular por 2.5 horas. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se administraron 320 µl de

la solución isopropanol : dimetilsulfóxido 50%. Se pasó 100 µl por duplicado de cada pozo de cada condición experimental en una placa de lectura para equipo de espectrometría y se leyó la placa a 570 nm sin corrección de onda.

6. Ensayo ELISA

Se suspendió los liofilizados del Kit ELISA FGFb marca PeproTech, que presenta un rango de detección de 63 – 4,000 pg/ml.

Se sintetizaron las soluciones de lavado, bloqueo, diluyente como especificado en la ficha técnica del fabricante.

Se administró 100 µl por pozo del anticuerpo de captura en la placa para ensayo ELISA de 96 pozos. Se cubrió del medio externo y se dejó incubar a temperatura ambiente por una noche.

Al día siguiente, los sobrenadantes de descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en agitación hasta su administración en la placa, que consistió en 3 curvas y las 7 condiciones experimentales (ver anexo 10 y 11)

Se realizó el protocolo del ensayo ELISA siguiendo las especificaciones de la ficha técnica del fabricante

La placa ELISA se leyó con equipo de espectrometría a 415 nm sin corrección de onda. Las absorbancias se obtuvieron en intervalos de 5 minutos para un total de 5 veces en 25 minutos.

Resultados.

Resultados de ensayo de viabilidad cualitativa Calceína / Etidio

Las Fotografías de viabilidad cualitativa Calceína / Etidio fueron analizadas con software ZEN 2010. Este ensayo consiste en observar la tinción de los componentes celulares. La membrana celular de las células vivas se tiñe de calceína que se aprecia de color verde, el núcleo de las células muertas se tiñe de etidio que se aprecia de color rojo (ver figura 18).

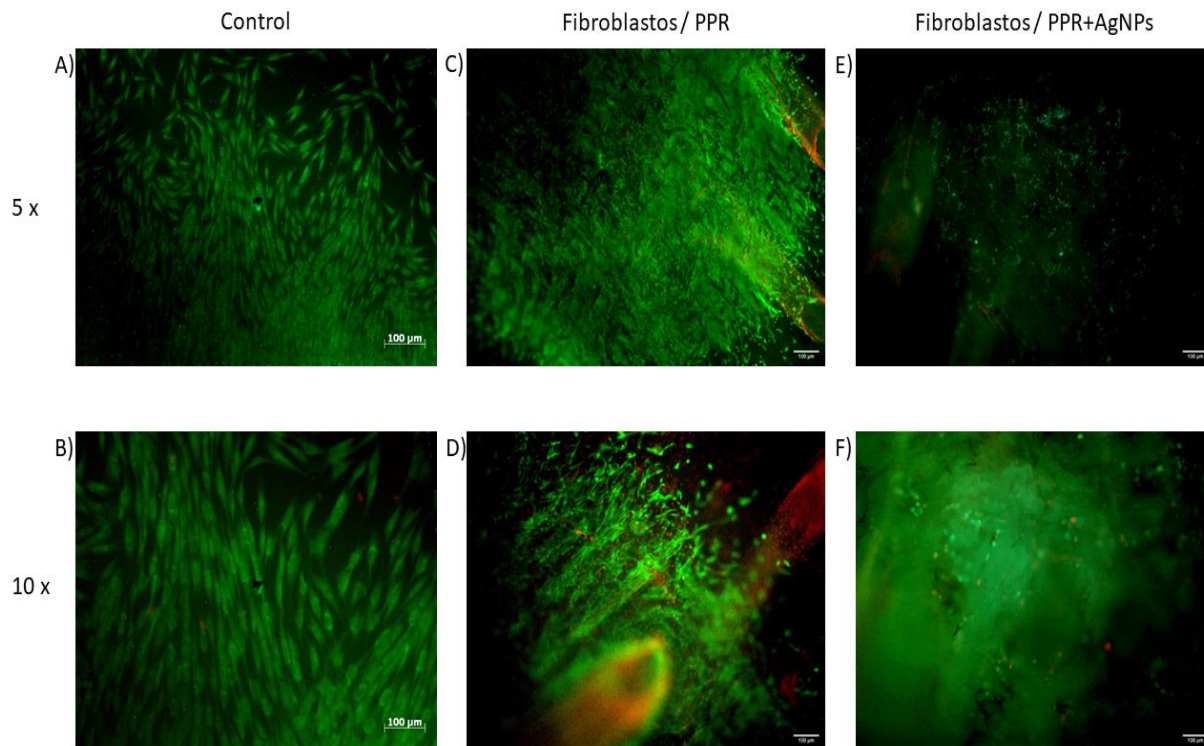


Figura 18: Fotografías de ensayo Calceína / Etidio de fibroblastos cultivados sobre andamio PPR y PPR+AgNPs. Fotografías A) y B) tomadas con microscopio invertido y escala de 100 µm. Fotografías C), D), E) y F) tomadas con microscopio vertical y escala a 100 µm. Las figuras A) y B) son fibroblastos cultivados sobre la placa de cultivo, el grupo control. La figura C) son fibroblastos cultivados sobre PPR, la cual demostró gran adhesión celular y estos fibroblastos mostraron buena viabilidad celular, buena morfología. La figura D) son fibroblastos cultivados sobre la PPR con mayor aumento y muestra la adhesión celular, la conservación de la morfología fusiforme del fibroblasto y restos celulares del andamio biológico (en rojo). En la parte inferior se aprecia un folículo piloso, resto de la piel porcina. La figura E) y F) son fibroblastos cultivados sobre la PPR impregnada con nanopartículas de plata a 125 ppm. En la figura E) se aprecia menor densidad celular y una morfología anormal. En la figura F) se aprecia mayor densidad celular que la impregnación dificulta visualizar al microscopio, se muestran con una morfología esférica y mayor número de células no viables. PPR, piel porcina radioesterilizada; PPR+AgNPs, piel porcina radioesterilizada con nanopartículas de plata a 125 ppm. Autoría propia.

Los fibroblastos cultivados sobre la PPR mostraron buena adhesión celular, morfología conservada fusiforme del fibroblasto y alta viabilidad celular dado que la mayoría de las células que se observan sobre la PPR son positivas a calceína y pocas son positivas a homodímero de etidio.

Los fibroblastos cultivados sobre la PPR impregnado con AgNPs a 125 ppm mostraron menor adhesión celular y una morfología esférica anormal, lo cual indica que no es propicio para el cultivo de fibroblastos dérmicos.

Resultados de ensayo de viabilidad cuantitativa MTT.

Después de realizar los ensayos de MTT, Los datos de absorbancia fueron analizados en software Graphpad Prism 8. Se realizó test ANOVA. La prueba de Dunnett comparó el grupo control con el resto de las condiciones experimentales y demostró (ver figura 19) que no hay diferencias significativas en cuanto a viabilidad celular con los grupos PPR indirecto y PPR+AgNPs indirecto y, diferencias significativas en cuanto a una viabilidad celular con los grupos Células cultivadas sobre PPR, Células cultivadas sobre PPR impregnada, Solución medio de cultivo con AgNPs y Solución medio de cultivo con AgNPs sin células.

DUNNETT					
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
CTL vs. PPR i	0.02183	-0.02121 to 0.06488	No	ns	0.5713
CTL vs. PPR+AgNPs i	0.02417	-0.01888 to 0.06721	No	ns	0.4713
CTL vs. C/PPR	0.1253	0.08229 to 0.1684	Yes	****	<0.0001
CTL vs. C/PPR+AgNPs	0.1615	0.1134 to 0.2096	Yes	****	<0.0001
CTL vs. S. AgNPs	0.1982	0.1551 to 0.2412	Yes	****	<0.0001
CTL vs. AgNPs blancos	0.2062	0.1631 to 0.2492	Yes	****	<0.0001

Figura 19: Gráfica de Dunnet de viabilidad celular de fibroblastos. Autoría propia

Se graficaron los datos de MTT (ver figura 20). Se grafico el valor de media y error estándar.

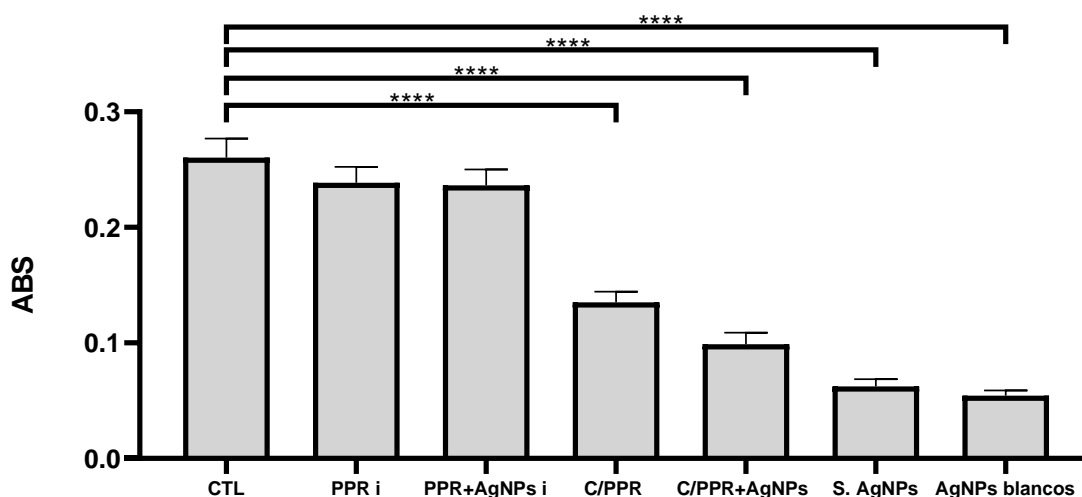


Figura 20: Gráfica de viabilidad celular de fibroblastos. Los grupos 2 y 3 no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control. Los grupos 4 – 7 mostraron diferencias significativas respecto al grupo control. $P < 0.0001$. ABS, Absorbancia. Autoría propia.

Lo que implica que el medio de cultivo que incubó por 24 horas con la PPR y la PPR impregnada no modifica la viabilidad celular.

En cuanto al andamio de PPR y la PPR+AgNPs modifican negativamente la viabilidad celular, pero sin diferencias significativas entre estos dos biomateriales. Lo que implica que el andamio impregnado no modifica negativamente la viabilidad celular en comparación al andamio no impregnado.

Resultados de ensayo ELISA

Una vez que se realizaron los ensayos, se obtuvieron los sobrenadantes de los diferentes cultivos para analizar la liberación de FGF mediante ELISA. Los datos se registraron en software Excel. Se graficó las absorbancias de concentraciones conocidas de FGFb pg/ml de las curvas patrón y se obtuvo la función (ver figura 21) de la tendencia. De esta función se despejó “x” que representaba la concentración de FGFb y se sustituyeron los valores de absorbancia de las muestras.

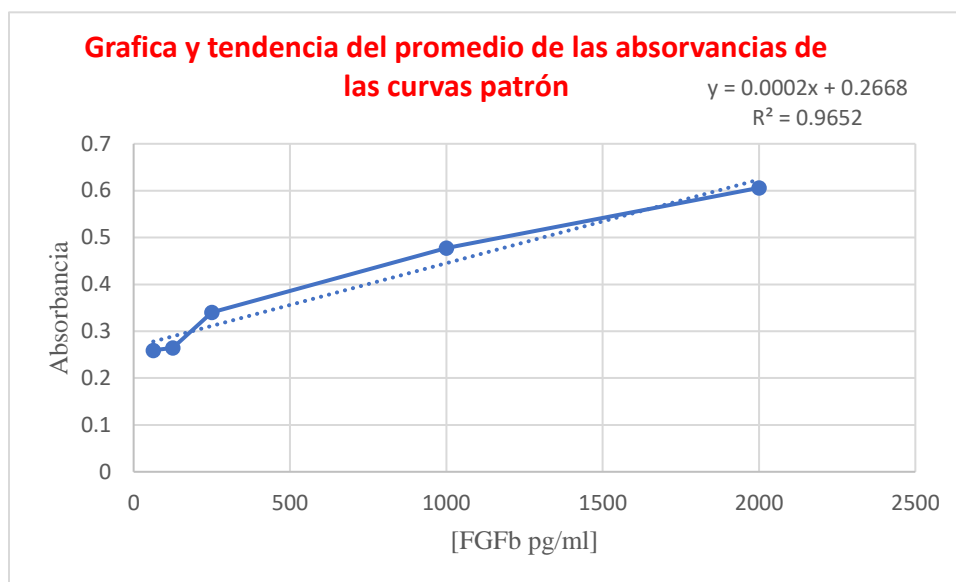


Figura 21: Gráfica de los valores conocidos de concentración de FGFb en las curvas del ensayo ELISA.

Los datos de FGFb pg/ml de las muestras se analizaron en Graphpad Prism 8 y se realizó test ANOVA. La prueba de Dunnett (ver figura 22) comparó el grupo control con el resto de las condiciones experimentales y sugirió que no hay diferencias significativas con las condiciones experimentales. Lo que implica que la incubación de los andamios PPR y PPR+AgNPs, ni el cultivo de fibroblastos sobre el andamio PPR y sobre la PPR+AgNPs no modifica los valores de FGFb presentes en el sobrenadante.

DUNNETT			
	Mean Diff.	95.00% CI of diff.	Significant?
CTL vs. PPR i	-71.57	-309.2 to 166.1	No
CTL vs. PPR+AgNPs i	-243.3	-491.9 to 5.275	No
CTL vs. C/PPR	75	-190.7 to 340.7	No
CTL vs. C/PPR+AgNPs	17.17	-248.6 to 282.9	No
CTL vs. S. AgNPs	53.83	-211.9 to 319.6	No
CTL vs. AgNPs blancos	12	-253.7 to 277.7	No

Figura 22: Test de Dunnett de las concentraciones de FGFb entre el grupo control y el resto de las condiciones experimentales.

Se graficó los datos de concentración de FGFb de las condiciones experimentales. Se graficó la media y error estándar (ver figura 23). No se encontraron diferencias significativas.

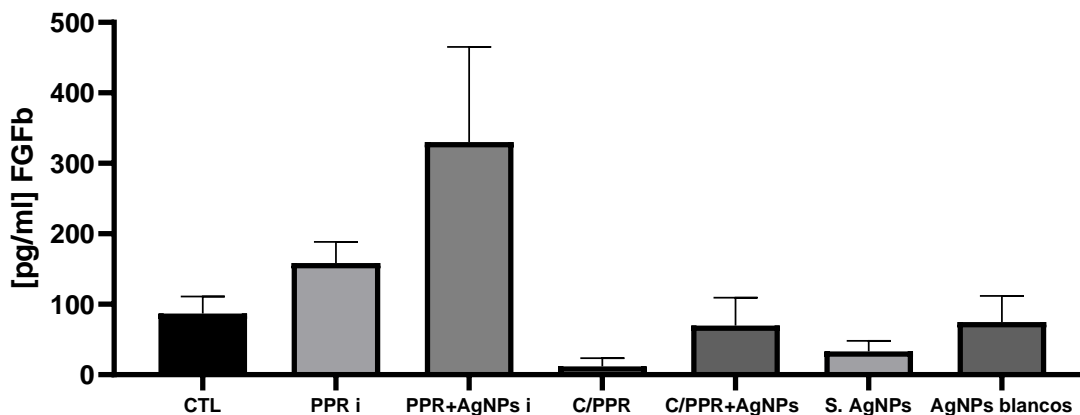


Figura 23: Gráfica de las concentraciones de FGFb de las condiciones experimentales. No hay diferencias significativas entre el grupo control y el resto de las condiciones experimentales.

Dado que los resultados con MTT mostraron menor viabilidad celular con respecto al control, se buscó normalizar los datos obtenidos de FGF con el número de células, es decir la relación entre la secreción de FGF con respecto al número de células por ensayo. Después de realizar la normalización se observa que los fibroblastos cultivados sobre PPR incrementan la concentración de FGF (ver figura 24).

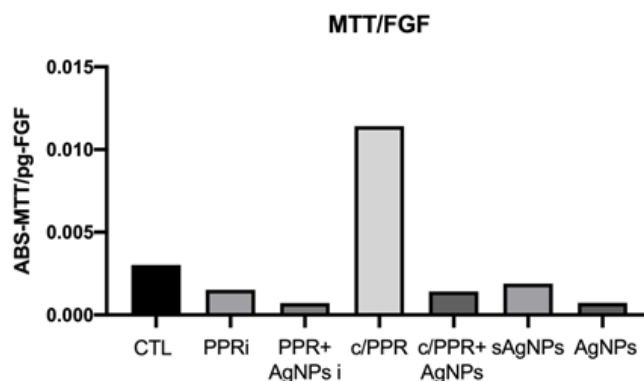


Figura 24: Normalización de la liberación de FGF con respecto a la media obtenida por los ensayos de MTT.

Discusión.

La piel porcina radiesterilizada (PPR) ha demostrado ser un andamio adecuado para cultivar células troncales (59 - 61, 64). El ensayo calceína / etidio demostró que los fibroblastos cultivados sobre la PPR presentan buena adhesión celular, alcanzan alta densidad celular y conservan la morfología fusiforme característica del fibroblasto.

El ensayo Calceína / EthD-1 mostró que los fibroblastos cultivados sobre la PPR impregnada con nanopartículas de plata a 125 ppm (PPR+AgNPs) presentan una morfología esférica. Podría implicar que la presencia de las nanopartículas de plata afecta la adhesión y las uniones entre la célula y el andamio, generando una morfología anormal como se ha encontrado en estudios sobre células del orden mamífero que se han estudiado con nanopartículas de plata (71 - 74)

El ensayo Calceína / EthD-1 mostró que los fibroblastos cultivados sobre la PPR+AgNPs se aprecian con una densidad celular menor que aquellos cultivados sobre la PPR. El andamio PPR impregnado demostró que al teñirse con los reactivos Calceína / EthD-1 obstaculiza la percepción del fibroblasto cultivado sobre el andamio impregnado (ver figura 18).

Aunque la morfología y la mayoría de los fibroblastos cultivados sobre PPR presentan alta viabilidad observada por los ensayos de Calceína / EthD-1, en el ensayo MTT se observa que hay una reducción de la viabilidad. Esto puede deberse a que al momento de realizar los cultivos, algunas células pueden ir al fondo de la placa y no quedar sobre la PPR, quedando una densidad menor de células y por ende menor señal de MTT. Aunque los resultados no mostraron diferencias significativas entre los fibroblastos cultivados sobre la PPR y los fibroblastos cultivados sobre la PPR+AgNPs, se observa una tendencia a disminuir la señal en las células cultivadas con las AgNPs, lo cual se corrobora con los ensayos de Calceína / EthD-1. Vinicius Saura Cardoso y colaboradores (75) encontraron que las AgNPs unido a colágeno no afecta negativamente la viabilidad la viabilidad. Chuangang You y colaboradores (76) también demostraron que las fibras de colágeno con las AgNPs no modifican negativamente la viabilidad celular, sin embargo, en nuestros ensayos se observó una reducción en la viabilidad celular con los tratamientos con AgNPs.

Anna, Löfdahl y colaboradores (77) estudiaron el efecto de las nanopartículas de plata en la viabilidad celular y encontraron que esta citotoxicidad depende de dos factores, de la dosis, que a partir de 10 microgramos/ml (aproximadamente 63 ppm) y; del tiempo, cuya citotoxicidad asciende proporcionalmente a al tiempo de interacción. Así, interacciones mayores a 48 horas reducen significativamente la viabilidad celular (78).

El análisis de la concentración de FGFb de los sobrenadantes sugirió que no hay diferencias significativas entre el grupo control y las restantes 6 condiciones experimentales. Podría implicar los siguientes hechos: que el cultivo únicamente de fibroblastos modifica el sobrenadante FGFb libre, pues estos fibroblastos en cultivo secretan y depositan matriz extracelular (MEC) (79, 80, 81). Esta MEC podría proporcionar sitios de adhesión a los FGFb y modificar la concentración libre en el sobrenadante de este factor de crecimiento, como Prudovsky I y colaboradores (33) mencionan sobre los FGF canónicos *in vivo*.

Se encontró que la solución de AgNPs con DMEM F-12 produce valores de FGFb en el inmunoensayo ELISA y podría implicar que los resultados de los grupos PPR+AgNPs indirecto y Células cultivadas sobre PPR+AgNPs sean hipotéticamente menores al resultado actual. La literatura menciona que las nanopartículas afectan la vía de traducción del factor de crecimiento fibroblástico (82), con esto la fuerza de unión ligando-receptor y los valores libres del FGFb.

Dado que no se detectaron diferencias significativas en la liberación de FGF entre los grupos experimentales, pero si en los ensayos de viabilidad, se decidió determinar si la relación entre el número de células con respecto a la liberación del FGF mostraba cambios entre los grupos. Se observó que tras dicha normalización se observa una tendencia de las células cultivadas sobre PPR a liberar mayor FGF con respecto a los demás grupos experimentales

Idealmente podríamos apuntar a fabricar desde el plano nanométrico estos andamios, para disminuir factores no predecibles como los sitios de adhesión que proporcionan las fibras de la matriz extracelular, controlar y predecir sitios de unión celular, la densidad celular que se adhiere al andamio, y los factores que se adhieren al mismo andamio y los que quedarán libres en el sobrenadante, como Yildirimer L y colaboradores (44) refieren a los andamios.

Conclusiones.

La piel porcina radioesterilizada (PPR) es un andamio útil para el cultivo de fibroblastos, permitiendo una morfología espiculada clásica y la adhesión celular al andamio, donde la mayoría de las células que permanecen son viables.

Los fibroblastos cultivados sobre PPR y PPR impregnada con nanopartículas de plata a 125 ppm (PPR+AgNPs) presentaron una reducción en la viabilidad detectada por MTT, pero no se afectó la liberación de FGF en ninguna condición experimental.

PERSPECTIVAS

Si bien nuestros resultados son alentadores, es importante destacar la necesidad de investigaciones adicionales para comprender más profundamente los mecanismos subyacentes de cómo las AgNPs interactúan con las células y los factores de crecimiento.

En última instancia, este estudio fomenta las bases para futuras investigaciones en la ingeniería de andamios biológicos a nivel nanométrico, con el objetivo de optimizar la interacción célula – andamio y potenciar la liberación controlada de factores de crecimiento. Presentando un impacto significativo en la ingeniería de tejidos y en la creación en entornos propicios para la regeneración tisular.

Bibliografía.

1. Gerstl JVE, Ehsan AN, Lassarén P, Yearley A, Raykar NP, Anderson GA, Smith TR, Sabapathy R, Ranganathan K. THE GLOBAL MACROECONOMIC BURDEN OF BURN INJURIES. *Plast Reconstr Surg.* 2023 Apr 25. doi: 10.1097/PRS.0000000000010595. Epub ahead of print. PMID: 37093034.
2. Moctezuma-Paz LE, Páez-Franco I, Jiménez-González S, Miguel-Jaimes KD, Foncerrada-Ortega G, SánchezFlores AY y col. Epidemiología de las quemaduras en México. *Rev Esp Med Quir* 2015;20:78-82.
3. Gacto-Sanchez P. Surgical treatment and management of the severely burn patient: Review and update. *Med Intensiva.* 2017 Aug-Sep;41(6):356-364. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medin.2017.02.008. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28456441.
4. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol.* 2015 Jul;66(1):14-21. doi: 10.1016/j.molimm.2014.10.023. Epub 2014 Nov 13. PMID: 25466611.
5. Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, Ni Z, Zhang B, Zhang D, Luo F, Chen H, Sun X, Feng JQ, Qi H, Chen L. FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2020 Sep 2;5(1):181. doi: 10.1038/s41392-020-00222-7. PMID: 32879300; PMCID: PMC7468161.
6. Lachiewicz AM, Hauck CG, Weber DJ, Cairns BA, van Duin D. Bacterial Infections After Burn Injuries: Impact of Multidrug Resistance. *Clin Infect Dis.* 2017 Nov 29;65(12):2130-2136. doi: 10.1093/cid/cix682. PMID: 29194526; PMCID: PMC5850038.
7. Mishra A, Pradhan D, Halder J, Biswasroy P, Rai VK, Dubey D, Kar B, Ghosh G, Rath G. Metal nanoparticles against multi-drug-resistance bacteria. *J Inorg Biochem.* 2022 Dec;237:111938. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111938. Epub 2022 Jul 21. PMID: 36122430.
8. Pawlina W, Ross MH. Ross. *Histología: Texto Y Atlas.* 8a ed. Baltimore, MD, Estados Unidos de América: Wolters Kluwer Health; 2019.
9. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 12;20(8):1811. doi: 10.3390/ijms20081811. PMID: 31013709; PMCID: PMC6515324
10. Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, Darling N, Ritchie P, Määttä A, Karakesisoglou I, Nelson G, von Zglinicki T, Dicolandrea T, Isfort R, Bascom C, Przyborski S. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat.* 2019 Apr;234(4):438-455. doi: 10.1111/joa.12942. Epub 2019 Feb 10. PMID: 30740672; PMCID: PMC6422806
11. Fitoussi R, Faure MO, Beauchef G, Achard S. Human skin responses to environmental pollutants: A review of current scientific models. *Environ Pollut.* 2022 Aug 1;306:119316. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119316. Epub 2022 Apr 22. PMID: 35469928.

12. Egert M, Simmering R, Riedel CU. The Association of the Skin Microbiota With Health, Immunity, and Disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Jul;102(1):62-69. doi: 10.1002/cpt.698. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28380682
13. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol.* 2014 Jan-Feb;32(1):3-13. doi: 10.1016/j.clindermatol.2013.05.021. PMID: 24314373
14. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2017 Aug;25(3):283-289. doi: 10.1016/j.fsc.2017.03.001. Epub 2017 May 30. PMID: 28676156
15. 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.
16. Becker GJ. The national institute of general medical sciences. *J Am Coll Radiol* [Internet]. 2005 [citado el 11 de abril de 2023];2(9):790–2. Disponible en: <https://nigms.nih.gov/education/fact-sheets/Pages/burns-spanish.aspx>
17. 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.
18. Fernández Santervás Y, Melé Casas M. Quemaduras. *Protoc diagn ter pediatr.* 2020;1:275-287.
19. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Lesión celular, muerte celular y adaptaciones. En: Robbins Y Cotran. *Patología Estructural Y Funcional.* 10a ed. Abbas AK, Aster JC, editores. Elsevier; 2021.
20. Cómo tratar quemaduras I [Internet]. Hospital Universitario de Getafe. 2019 [citado el 11 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.comunidad.madrid/hospital/getafe/profesionales/tratar-quemaduras-i>
21. O'Dowd G, Bell S, Wright S. Wheater's pathology: A text, atlas and review of histopathology E-book. 6th ed. Elsevier; 2019.
22. Tottoli EM, Dorati R, Genta I, Chiesa E, Pisani S, Conti B. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020;12(8):735. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
23. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):75-81. doi: 10.1126/science.276.5309.75. PMID: 9082989.
24. Guillamat-Prats R. The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. *Cells.* 2021 Jul 8;10(7):1729. doi: 10.3390/cells10071729. PMID: 34359898; PMCID: PMC8305394.
25. Loeffler AG, Hart MN. Introduction to human disease: Pathophysiology for health professionals. 7th ed. Sudbury, MA: Jones and Bartlett; 2018.
26. Parenchymal tissue - MeSH - NCBI [Internet]. Nih.gov. [cited 2023 May 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/2016687>
27. Ojeh N, Pastar I, Tomic-Canic M, Stojadinovic O. Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct

- 23;16(10):25476-501. doi: 10.3390/ijms161025476. PMID: 26512657; PMCID: PMC4632811.
28. Stromal cells - MeSH - NCBI [Internet]. Nih.gov. [cited 2023 May 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68017154>
29. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Inflamación y Reparación*. En: Robbins Y Cotran. *Patología Estructural Y Funcional*. 10a ed. Abbas AK, Aster JC, editores. Elsevier; 2021.
30. Punt J, Stranford SA, Jones PP, Owen JA, Kuby J. *Kuby inmunología*. México: Mcgraw Hill Interamericana; 2020.
31. García Esteo FJ, García Castellano JM, Pérez-Caballer AJ. Fundamentos de los procesos de reparación tisular: factores de crecimiento. *Rev Ortop Traumatol* [Internet]. 2005;49:5–16. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0482-5985\(05\)74461-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0482-5985(05)74461-8).
32. Valencia Basto C, CICATRIZACIÓN: PROCESO DE REPARACIÓN TISULAR. APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS. *Investigaciones Andina* [Internet]. 2010;12(20):85-98. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=239016509008>
33. Prudovsky I. Cellular Mechanisms of FGF-Stimulated Tissue Repair. *Cells*. 2021 Jul 20;10(7):1830. doi: 10.3390/cells10071830. PMID: 34360000; PMCID: PMC8304273.
34. Rao GN, Rosaian AS, Jawahar G, Raj PHN, Rachel JB, Emmanuel PB. Fibroblastic Growth Factor as a Diagnostic and Prognostic Marker in Odontogenic Cysts and Tumors: A Systematic Review. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021 Jun;13(Suppl 1):S6-S10. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_563_20. Epub 2021 Jun 5. PMID: 34447033; PMCID: PMC8375897.
35. Ackerman JE, Geary MB, Orner CA, Bawany F, Loisel AE. Obesity/Type II diabetes alters macrophage polarization resulting in a fibrotic tendon healing response. *PLoS One*. 2017 Jul 7;12(7):e0181127. doi: 10.1371/journal.pone.0181127. PMID: 28686669; PMCID: PMC5501654.
36. Jafarian AH, Kooshkiforooshani M, Farzad F, Mohamadian Roshan N. The Relationship Between Fibroblastic Growth Factor Receptor-1 (FGFR1) Gene Amplification in Triple Negative Breast Carcinomas and Clinicopathological Prognostic Factors. *Iran J Pathol*. 2019 Fall;14(4):299-304. doi: 10.30699/ijp.2019.96713.1952. Epub 2019 Sep 22. PMID: 31754359; PMCID: PMC6824770.
37. Liu P, Liu Y, Ke CN, Li WS, Liu YM, Xu S. Therapeutic effect of autologous concentrated growth factor on lower-extremity chronic refractory wounds: A case report. *World J Clin Cases*. 2021 Jun 26;9(18):4797-4802. doi: 10.12998/wjcc.v9.i18.4797. PMID: 34222450; PMCID: PMC8223823.
38. Ornitz DM, Itoh N. *The Fibroblast Growth Factor signaling pathway*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2015 May-Jun;4(3):215-66. doi: 10.1002/wdev.176. Epub 2015 Mar 13. PMID: 25772309; PMCID: PMC4393358.

39. Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem.* 1994 Apr 8;269(14):10753-7. PMID: 7511604.
40. Brauchle M, Angermeyer K, Hübner G, Werner S. Large induction of keratinocyte growth factor expression by serum growth factors and pro-inflammatory cytokines in cultured fibroblasts. *Oncogene.* 1994 Nov;9(11):3199-204. PMID: 7936642.
41. Singh M, Akkaya S, Preuß M, Rademacher F, Tohidnezhad M, Kubo Y, Behrendt P, Weitkamp JT, Wedel T, Lucius R, Gläser R, Harder J, Bayer A. Platelet-Released Growth Factors Influence Wound Healing-Associated Genes in Human Keratinocytes and Ex Vivo Skin Explants. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 4;23(5):2827. doi: 10.3390/ijms23052827. PMID: 35269967; PMCID: PMC8911300.
42. Figure: (A) Regla de los nueve (para adultos) y (B) Diagrama de Lund-Browder (para niños) para estimar el alcance de las quemaduras - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. [cited 2023 May 21]. Available from: <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/multimedia/figure/a-regla-de-los-nueves-para-adultos-y-b-diagrama-de-lund-browder-para-ni%C3%B1os-para-estimar-el-alcance-de-las-quemaduras>
43. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Sahu R, Dixit S, Dennis V, Singh SR, Pillai SR. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *Int J Mol Sci.* 2016 Nov 25;17(12):1974. doi: 10.3390/ijms17121974. PMID: 27898014; PMCID: PMC5187774.
44. Yildirim L, Thanh NTK, Seifalian AM. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2012;30(12):638–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.004>.
45. Böttcher-Haberzeth S, Biedermann T, Reichmann E. Tissue engineering of skin. *Burns* [Internet]. 2010;36(4):450–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2009.08.016>
46. Davison-Kotler E, Sharma V, Kang NV, García-Gareta E. A new and universal classification system of skin substitutes inspired by factorial design. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2018;(ten.teb.2017.0477). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0477>
47. Jones I, Currie L, Martin R. A guide to biological skin substitutes. *Br J Plast Surg.* 2002 Apr;55(3):185-93. doi: 10.1054/bjps.2002.3800. PMID: 12041969.
48. Kumar P. Classification of skin substitutes. *Burns* [Internet]. 2008;34(1):148–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2007.04.016>.
49. Hojo M, Inokuchi S, Kidokoro M, Fukuyama N, Tanaka E, Tsuji C, Miyasaka M, Tanino R, Nakazawa H. Induction of vascular endothelial growth factor by fibrin as a dermal substrate for cultured skin substitute. *Plast Reconstr Surg.* 2003 Apr 15;111(5):1638-45. doi: 10.1097/01.PRS.0000053842.90564.26. PMID: 12655209.
50. Aristizabal AM, Caicedo LA, Martínez JM, Moreno M, Echeverri GJ. Xenotrasplantes, una realidad cercana en la práctica clínica: revisión de la literatura.

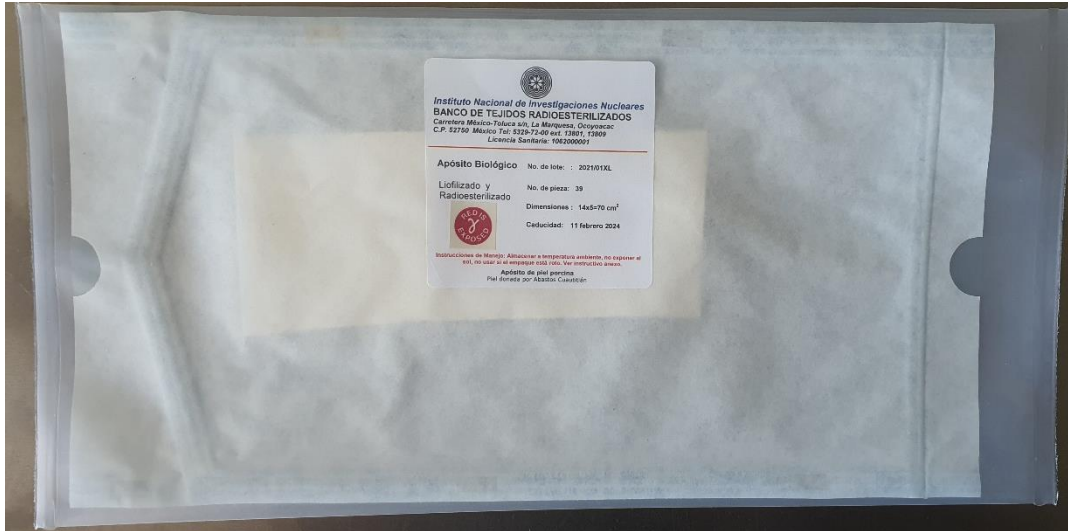
- Cir Esp [Internet]. 2017;95(2):62–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ciresp.2016.12.008>
51. Bazán Milián M, González Jiménez N, Delgado Bereijo L. Xenotransplante: Estado actual, limitantes y expectativas. *Rev Cuba Cir* [Internet]. 2004 [cited 2023 May 8];43(2):0–0. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74932004000200010.
 52. Debeer S, Le Luduec JB, Kaiserlian D, Laurent P, Nicolas JF, Dubois B, Kanitakis J. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur J Dermatol*. 2013 Jul-Aug;23(4):456-66. doi: 10.1684/ejd.2013.2060. PMID: 24047577
 53. Turner NJ, Pezzone D, Badylak SF. Regional variations in the histology of porcine skin. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Apr;21(4):373-84. doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0246. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25205147
 54. Chiu T, Burd A. "Xenograft" dressing in the treatment of burns. *Clin Dermatol*. 2005 Jul-Aug;23(4):419-23. doi: 10.1016/j.clindermatol.2004.07.027. PMID: 16023938.
 55. Haller HL, Blome-Eberwein SE, Branski LK, Carson JS, Crombie RE, Hickerson WL, Kamolz LP, King BT, Nischwitz SP, Popp D, Shupp JW, Wolf SE. Porcine Xenograft and Epidermal Fully Synthetic Skin Substitutes in the Treatment of Partial-Thickness Burns: A Literature Review. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Apr 30;57(5):432. doi: 10.3390/medicina57050432. PMID: 33946298; PMCID: PMC8146423.
 56. Herbert, L., Haller, Sigrid, E., Blome-Eberwein., Ludwik, K., Branski., Joshua, S, Carson., Roselle, E., Crombie., William, L., Hickerson., Lars-Peter, Kamolz., Booker, T., King., Sebastian, P., Nischwitz., Daniel, Popp., Jeffrey, W., Shupp., Steven, E., Wolf. Porcine Xenograft and Epidermal Fully Synthetic Skin Substitutes in the Treatment of Partial-Thickness Burns: A Literature Review.. *Medicina-lithuania*, (2021). doi: 10.3390/MEDICINA57050432
 57. Angelo, A., Leto, Barone., Melissa, Mastroianni., Evan, A., Farkash., C., Mallard., A, Albritton., Radbeh, Torabi., David, A., Leonard., Josef, Kurtz., Josef, Kurtz., David, H., Sachs., Curtis, L., Cetrulo. Genetically modified porcine split-thickness skin grafts as an alternative to allograft for provision of temporary wound coverage: preliminary characterization.. *Burns*, (2015). doi: 10.1016/J.BURNS.2014.09.003
 58. Diana, Kitala., Agnieszka, Klama-Baryła., Wojciech, Łabuś., Małgorzata, Kraut., Justyna, Glik., Marek, Kawecki., Kamil, Jozsko., Bożena, Gzik-Zroska. Porcine Transgenic, Acellular Material as an Alternative for Human Skin.. (2020). doi: 10.1016/J.TRANSProceed.2020.01.125
 59. Cabello-Arista B, Melgarejo-Ramírez Y, Retana-Flores A, Martínez-López V, Márquez-Gutiérrez E, Almanza-Pérez J, Lecona H, Reyes-Frías ML, Ibarra C, Martínez-Pardo ME, Velasquillo C, Sánchez-Sánchez R. Effects of mesenchymal stem cell culture on radio sterilized human amnion or radio sterilized pig skin in burn wound healing. *Cell Tissue Bank*. 2022 Jan 20. doi: 10.1007/s10561-021-09976-y. Epub ahead of print. PMID: 35059955.
 60. Sánchez-Sánchez R, Brena-Molina A, Martínez-López V, Melgarejo-Ramírez Y, Tamay de Dios L, Gómez-García R, et al. Generation of two biological wound

- dressings as a potential delivery system of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *ASAIO J* [Internet]. 2015;61(6):718–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/MAT.0000000000000277>
61. Ortega-Sánchez C, Pérez-Díaz M, Melgarejo-Ramírez Y, Chopin-Doroteo M, Silva-Bermudez P, Martínez-López V, Zacula-Juárez N, Zamudio-Cuevas Y, Hernández-Valencia C, López-Jácome LE, et al. Radiosterilized Pig Skin, Silver Nanoparticles and Skin Cells as an Integral Dressing Treatment for Burns: Development, Pre-Clinical and Clinical Pilot Study. *Pharmaceutics*. 2023; 15(8):2105. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082105>
 62. Gharpure S, Akash A, Ankamwar B. A Review on Antimicrobial Properties of Metal Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020 Jun 1;20(6):3303-3339. doi: 10.1166/jnn.2020.17677. PMID: 31748024.
 63. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016 Sep 13;17(9):1534. doi: 10.3390/ijms17091534. PMID: 27649147; PMCID: PMC5037809
 64. Pérez-Díaz MA, Silva-Bermudez P, Jiménez-López B, Martínez-López V, Melgarejo-Ramírez Y, Brena-Molina A, et al. Silver-pig skin nanocomposites and mesenchymal stem cells: suitable antibiofilm cellular dressings for wound healing. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2018;16(1):2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-017-0331-0>
 65. Vishwanath N, Whitaker C, Allu S, Clippert D, Jouffroy E, Hong J, Stone B, Connolly W, Barrett CC, Antoci V, Born CT, Garcia DR. Silver as an Antibiotic-Independent Antimicrobial: Review of Current Formulations and Clinical Relevance. *Surg Infect (Larchmt)*. 2022 Nov;23(9):769-780. doi: 10.1089/sur.2022.229. Epub 2022 Sep 29. PMID: 36178480
 66. Ross JA, Allan N, Olson M, Schatz C, Nation PN, Gawaziuk JP, Sethi J, Liu S, Logsetty S. Comparison of the efficacy of silver-based antimicrobial burn dressings in a porcine model of burn wounds. *Burns*. 2020 Nov;46(7):1632-1640. doi: 10.1016/j.burns.2020.04.004. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32381448
 67. Shi T, Wei Q, Wang Z, Zhang G, Sun X, He QY. Photocatalytic Protein Damage by Silver Nanoparticles Circumvents Bacterial Stress Response and Multidrug Resistance. *mSphere*. 2019 May 1;4(3):e00175-19. doi: 10.1128/mSphere.00175-19. PMID: 31043515; PMCID: PMC6495337
 68. Esmaeillo M, Zarrini G, Ahangarzadeh Rezaee M, Shahbazi Mojarrad J, Bahadori A. Vancomycin Capped with Silver Nanoparticles as an Antibacterial Agent against Multi-Drug Resistance Bacteria. *Adv Pharm Bull*. 2017 Sep;7(3):479-483. doi: 10.15171/apb.2017.058. Epub 2017 Sep 25. PMID: 29071232; PMCID: PMC5651071
 69. Bruna T, Maldonado-Bravo F, Jara P, Caro N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 4;22(13):7202. doi: 10.3390/ijms22137202. PMID: 34281254; PMCID: PMC8268496

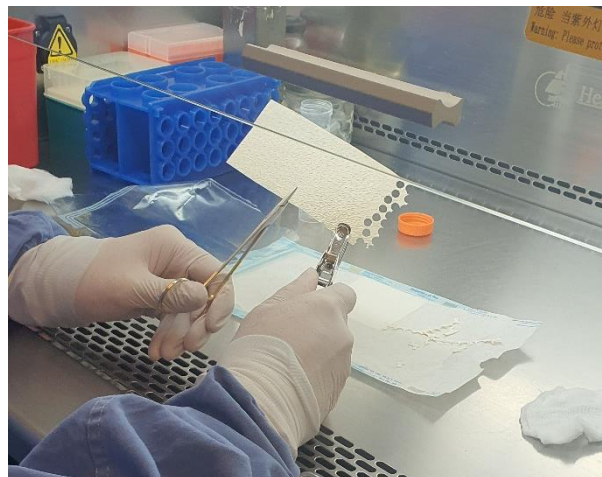
70. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Banco de Tejidos Radioesterilizados (BTR) [Internet]. gov.mx. [cited 2023 Jul 11]. Available from: <https://www.gob.mx/inin/es/articulos/banco-de-tejidos-radioesterilizados-btr-246529?idiom=es>
71. Nataly, Arrieta-Sandoval., Porfirio, Estrada, Rojas., I., Olivas-Armendáriz., Laura, E., Valencia, Gómez., Juan, Francisco, Hernández, Paz., Blanca, E., Monarrez, Cordero., Claudia, A., Rodríguez, González. Effect of Ag 2 S-BSA nanoparticle size on 3T3 fibroblast cell line cytotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research*, (2020). doi: 10.1007/S11051-020-04834-6
72. Agata, Lange., Sławomir, Jaworski., Aysia, Khan. The interaction of metal nanoparticles (copper, silver, platinum, and gold) with cell line HS-5. *Folia Biologica-krakow*, (2020). doi: 10.3409/FB_68-3.11
73. Ifat, Nissan., Hadas, Schori., Vijay, Bhooshan, Kumar., Merav, Antman, Passig., Orit, Shefi., Aharon, Gedanken. Topographical impact of silver nanolines on the morphology of neuronal SH-SY5Y Cells.. *Journal of Materials Chemistry B*, (2017). doi: 10.1039/C7TB02492D
74. Andrea, Haase., Stephanie, Rott., Alexandre, Manton., P., Graf., Johanna, Plendl., Andreas, F., Thünemann., Wolfgang, Meier., Andreas, Taubert., Andreas, Luch., Georg, Reiser. Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: Uptake, oxidative stress and acute calcium responses. *Toxicological Sciences*, (2012). doi: 10.1093/TOXSCI/KFS003
75. Vinicius, Saura, Cardoso., Marcelo, de, Carvalho, Filgueiras., Yago, Medeiros, Dutra., Ramon, Handerson, Gomes, Teles., Alyne, Rodrigues, de, Araújo., Fernando, Lucas, Primo., Ana, Carolina, Mafud., Larissa, Fernandes, Batista., Yvonne, Primerano, Mascarenhas., Iêda, Maria, Martinez, Paino., Valtencir, Zucolotto., Antonio, Claudio, Tedesco., Durcilene, Alves, da, Silva., José, Roberto, S., A., Leite., José, Ribeiro, dos, Santos. Collagen-based silver nanoparticles: Study on cell viability, skin permeation, and swelling inhibition. *Materials Science and Engineering: C*, (2017).;74:382-388. doi: 10.1016/J.MSEC.2016.12.025
76. Chuangang, You., Qiong, Li., Xingang, Wang., Pan, Wu., Jon, Kee, Ho., Ronghua, Jin., Liping, Zhang., Huawei, Shao., Chunmao, Han. Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation. *Scientific Reports*, (2017).;7(1):10489-10489. doi: 10.1038/S41598-017-10481-0
77. Anna, Löfdahl., Andreas, Jern., Samuel, Flyman., Monica, Kåredal., Hanna, L., Karlsson., Anna-Karin, Larsson-Callerfelt. Silver Nanoparticles Alter Cell Viability Ex Vivo and in Vitro and Induce Proinflammatory Effects in Human Lung Fibroblasts. *Nanomaterials*, (2020).;10(9):1868-. doi: 10.3390/NANO10091868
78. Mansoureh, Paknejadi., Mansour, Bayat., Mona, Salimi., Vadood, Razavilar. Concentration- and Time-Dependent Cytotoxicity of Silver Nanoparticles on Normal Human Skin Fibroblast Cell Line. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, (2018).;20(10) doi: 10.5812/IRCMJ.79183

79. Janusz, Franco-Barraza., Dorothy, A., Beacham., Michael, Amatangelo., Edna, Cukierman. Preparation of Extracellular Matrices Produced by Cultured and Primary Fibroblasts. *Current protocols in pharmacology*, (2006). doi: 10.1002/CPCB.2
80. Rachael, A.B., Crabb., Eric, P., Chau., Eric, P., Chau., Danya, M., Decoteau., Danya, M., Decoteau., Allison, Hubel. Microstructural Characteristics of Extracellular Matrix Produced by Stromal Fibroblasts. *Annals of Biomedical Engineering*, (2006). doi: 10.1007/S10439-006-9181-X
81. Francesca, Rescigno., Laura, Ceriotti., Marisa, Meloni. Extra Cellular Matrix Deposition and Assembly in Dermis Spheroids.. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, (2021). doi: 10.2147/CCID.S316707
82. Encarnación, Fuster., Héctor, Candela., Jorge, Estévez., Ariel, J., Arias., Eugenio, Vilanova., Miguel, A., Sogorb. Effects of silver nanoparticles on T98G human glioblastoma cells.. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (2020). doi: 10.1016/J.TAAP.2020.115178

Anexos



Anexo 1: Lámina de Piel porcina radioesterilizada (PPR). Autoría propia



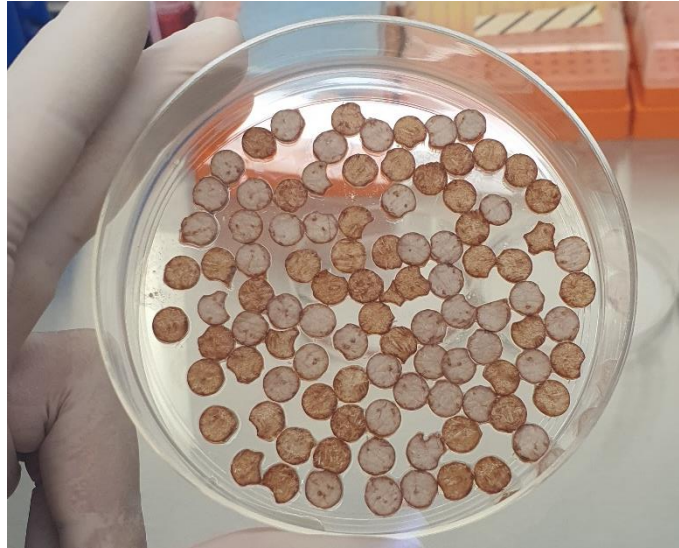
Anexo 2: Procesamiento de la piel porcina radioesterilizada (PPR). En campana de flujo de obtención las piezas circulares de la PPR. Autoría propia



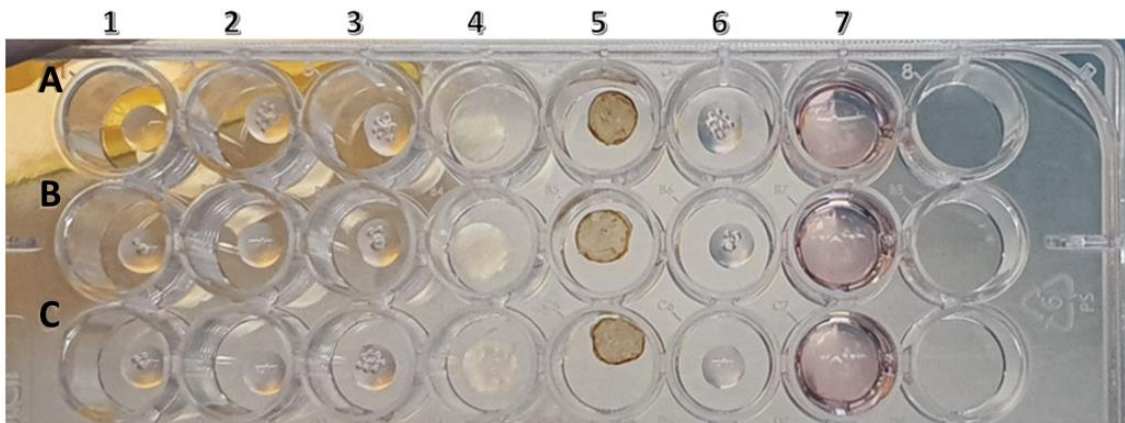
Anexo 3: Soluciones de nanopartículas de plata (AgNPs). El tubo de 15 ml (tapa roja) contiene la solución de AgNPs a 125 ppm, el tubo de 50 ml de enfrente contiene las piezas de PPR que recibirán la solución de AgNPs a 125 ppm. Autoría Propia



Anexo 4: Sonicación de las piezas de PPR impregnadas con nanopartículas de plata (PPR+AgNPs). Las piezas tras las 24 horas en agitación con la solución se tiñen con las AgNPs. Autoría propia.



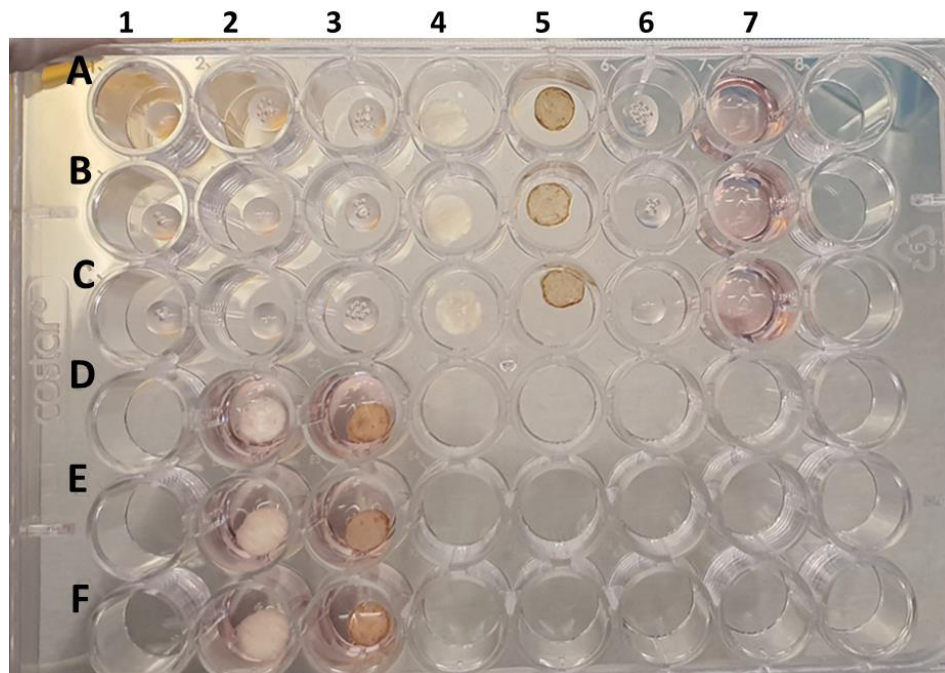
Anexo 5: Piezas de PPR impregnadas con AgNPs a 125 ppm. Las piezas son lavadas con PBS y se retira la humedad en la campana de flujo. Autoría propia



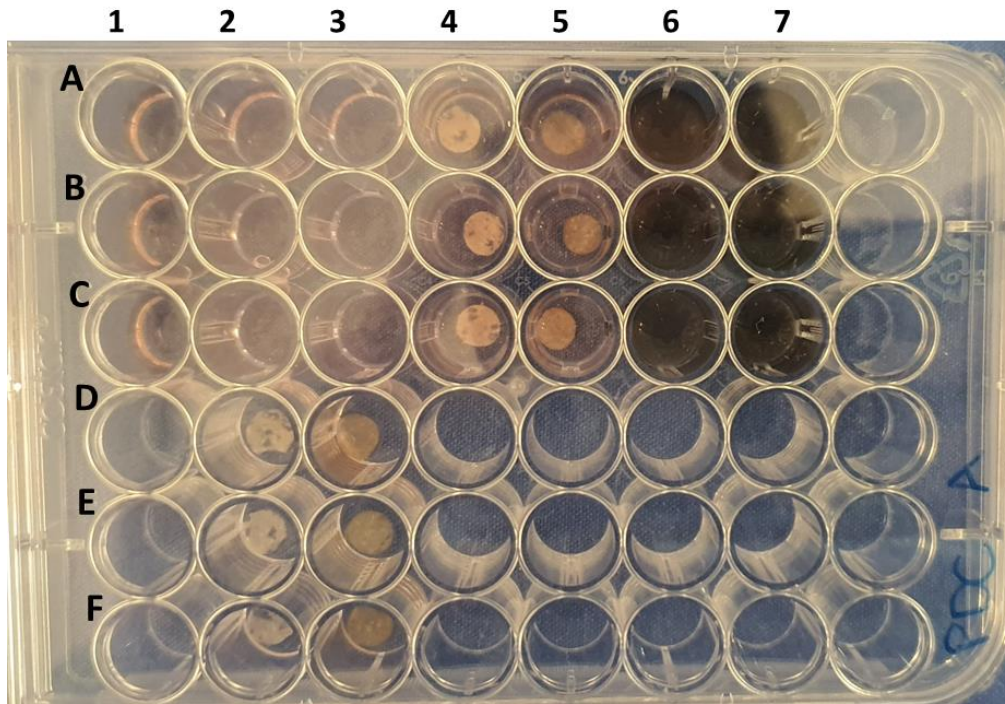
Anexo 6: Siembra de fibroblastos en la placa de cultivo de 48 pozos. Cada pozo de los grupos 1 - 6 recibió 10 μ l con una densidad celular de 40,000 fibroblastos suspendidos en DMEM F-12 suplementado. Autoría propia.



Anexo 7: Epidermis de la pieza de PPR. La fotografía muestra la cara epidérmica de la PPR. Autoría propia.



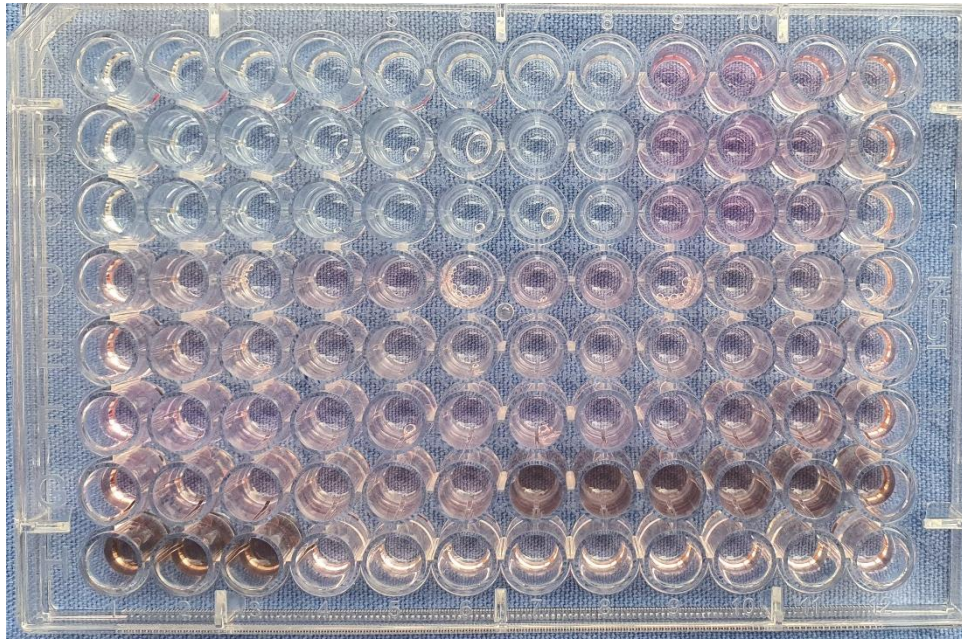
Anexo 8: Placa de cultivo de 48 pozos con fibroblastos sembrados y el resto de los grupos de las condiciones experimentales. En los grupos 2 y 3 a nivel de D-E-F se encuentra DMEM F-12 no suplementado en contacto con la PPR y PPR+AgNPs respectivamente. Autoría propia.



Anexo 9: Placa de cultivo de 48 pozos con las condiciones experimentales administradas. Transcurridas las 24 horas de incubación de la siembra de fibroblastos, se retiró el medio, se realizaron lavados con PBS y se administraron las condiciones experimentales. Autoría propia.



Anexo 10: Administración en la placa ELISA de las curvas y sobrenadantes de las condiciones experimentales. Se administró 100 μ l por pozo. Autoría propia.



Anexo 11: Placa ELISA tras la administración de las curvas y los sobrenadantes de las condiciones experimentales. Autoría propia.