

**División Ciencias Biológicas y de la Salud  
Maestría en Biología Experimental**

**Evaluación del amnios humano y piel porcina radioesterilizados como biomatrices para el cultivo de células troncales mesenquimales y su efecto en el tratamiento de quemaduras de segundo grado profundo.**

**Biol. Exp. Beatriz del Carmen Cabello Arista**

**Co-Director externo:**

**Dr. Roberto Sánchez Sánchez**

Investigador en Ciencias Médicas.  
Instituto Nacional de Rehabilitación, CENIAQ.

**Co-Director interno:**

**Dr. Julio Cesar Almanza Pérez**

Profesor Titular "C"  
Lab. de Farmacología  
Depto. Ciencias de la Salud D. C. B. S. UAM-Iztapalapa

**Asesora:**

**Dra. María Cristina Velasquillo Martínez**

Investigador en Ciencias Médicas.  
Instituto Nacional de Rehabilitación, CENIAQ.



**Co-Director externo:**



---

**Vo. Bo. Dr. Roberto Sánchez Sánchez**  
Investigador en Ciencias Médicas.  
Laboratorio de Biotecnología  
Instituto Nacional de Rehabilitación, CENIAQ

**Co-Director interno:**



---

**Vo. Bo. Dr. Julio Cesar Almanza Pérez**  
Profesor Titular "C"  
Lab. de Farmacología  
Depto. Ciencias de la Salud D. C. B. S. UAM-Iztapalapa

**Asesora:**



---

**Vo. Bo. Dra. María Cristina Velasquillo Martínez**  
Investigador en Ciencias Médicas.  
Laboratorio de Biotecnología  
Instituto Nacional de Rehabilitación, CENIAQ.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Piel .....	1
Anatomía.....	2
Reparación de la herida .....	9
Quemaduras.....	10
Terapéutica.....	11
Amnios humano radioesterilizado (AHR).....	12
Piel porcina radioesterilizada (PPR).....	12
Células troncales mesenquimales .....	13
ANTECEDENTES .....	13
JUSTIFICACIÓN .....	17
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	17
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVO GENERAL .....	18
OBJETIVOS PARTICULARES .....	18
MATERIAL Y MÉTODO .....	18
Obtención de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.....	18
El análisis histológico.....	19
Citometría de flujo .....	19
Diferenciación celular.....	20
Generación del sustituto biológico de piel. ....	21
Comparación de las características biológicas de las MSC sobre el AHR y sobre la PPR in vitro.....	21
Modelo de quemadura de segundo grado profundo en ratones NU/NU. ....	22
Cuantificación de citocinas. ....	23
Análisis de la reparación del tejido. ....	23
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
RESULTADOS .....	25

Obtención de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.....	25
Determinación del fenotipo .....	25
Capacidad de diferenciación de las células troncales derivadas de tejido adiposo .....	26
Análisis histológico del amnios humano radioesterilizado y piel porcina radioesterilizada. .....	28
Generación del sustituto biológico de piel.....	29
Cuantificación de citocinas de las células troncales mesenquimales cultivadas sobre Amnios Humano Radioesterilizado y Piel Porcina Radioesterilizada .....	31
Análisis de la reparación del tejido. ....	32
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES .....	41
PROPUESTA DE TEMAS SELECTOS I, II Y III.....	41

## INTRODUCCIÓN

Las quemaduras son un problema mundial de salud pública principalmente en países de bajos y medianos ingresos, ya que son una de las causas de morbilidad, que incluye severa discapacidad física, psicológica social, así como grandes periodos de hospitalización que a menudo conllevan a la estigmatización y el rechazo. (Wolf et al., 2014) Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman 265 000 muertes al año debido a quemaduras

En México, las quemaduras son una de las causas más frecuentes de atención médica en las salas de urgencias. Los niños y los adultos mayores son los grupos más vulnerables de la población. En México, más del 18% de los lesionados hospitalizados no sobrevive, a diferencia del 5.4% reportado en otros países. (Ramírez et al.)

### Piel

La piel, también conocida como cutis o tegumento (derivado del latín *integumentum* que significa “cubierta”) es el órgano más grande del cuerpo ya que, representan el 15-20% de masa corporal total con área aproximada de 1.8-2 m<sup>2</sup>. (Zaidi and Lanigan, 2010a) Tiene varias funciones, siendo la más importante la protección del organismo, ya que actúa como una barrera de protección ante agentes físicos, químicos y biológicos del ambiente externo, lo que permite limitar la entrada y salida de agua electrolitos y diversas sustancias mientras proporciona protección contra los microorganismos, la radiación ultravioleta, agentes tóxicos y lesiones mecánicas. Como órgano termorregulador presenta una función homeostática que contribuye a mantener un equilibrio en el ambiente interno mediante la regulación de la temperatura corporal a través de la sudoración, de

esta manera se lleva a cabo un balance hídrico así como función excretora. La piel es capaz de brindar información sobre el ambiente externo, mediante diferentes terminaciones nerviosas, las cuales permiten percibir estímulos de sensibilidad como tacto, dolor y temperatura entre otros (Brodell and Rosenthal, 2008). Este órgano se encuentra en constante cambio, ya que las células de las capas externas se desprenden continuamente y se sustituyen por células internas que migran hasta la superficie.

Dado a que presenta funciones primordiales, cualquier lesión que se presente debe ser tratada con rapidez.

El grosor de la piel difiere en las distintas regiones de la superficie corporal sin embargo este grosor oscila entre 1 hasta más de 5 um, siendo más gruesa en las regiones dorsales del cuerpo y más delgada en los párpados (Kolarsick et al., 2011).

## **Anatomía**

La piel está constituida principalmente por tres capas: epidermis (capa más superficial) la cual funciona como barrera ante el ambiente externo, debajo de la epidermis se localiza la dermis la cual se encarga de brindar soporte estructural a la piel, y finalmente debajo de la dermis se encuentra la hipodermis o tejido subcutáneo la cual sirve como depósito de grasa.

## **Epidermis**

La epidermis es la capa más externa de la piel, se compone de capas de queratinocitos intercalados por folículos pilosos. Es una capa delgada que se regenera con facilidad después de una lesión y sirve para mantener la humedad en el interior del cuerpo. Está compuesta por epitelio escamoso estratificado donde el 95% de las células son los queratinocitos (los cuales secretan citocinas ante una lesión), mientras que los melanocitos, células dendríticas, células de Langerhans y las células de Merkel representan el 5% restante (Zaidi and Lanigan, 2010a). La epidermis no tiene irrigación sanguínea propia, y sus requerimientos nutritivos son aportados por la dermis subyacente.

En la epidermis se pueden identificar cuatro capas bien diferenciadas en función de la localización y morfología de los queratinocitos. Estas son:

- Estrato basal o germinativo; está representado por una única capa de células basales que descansan sobre la lámina basal. Contiene células troncales que dan origen a los queratinocitos. En la capa basal, los queratinocitos expresan las queratinas K5 y K14.

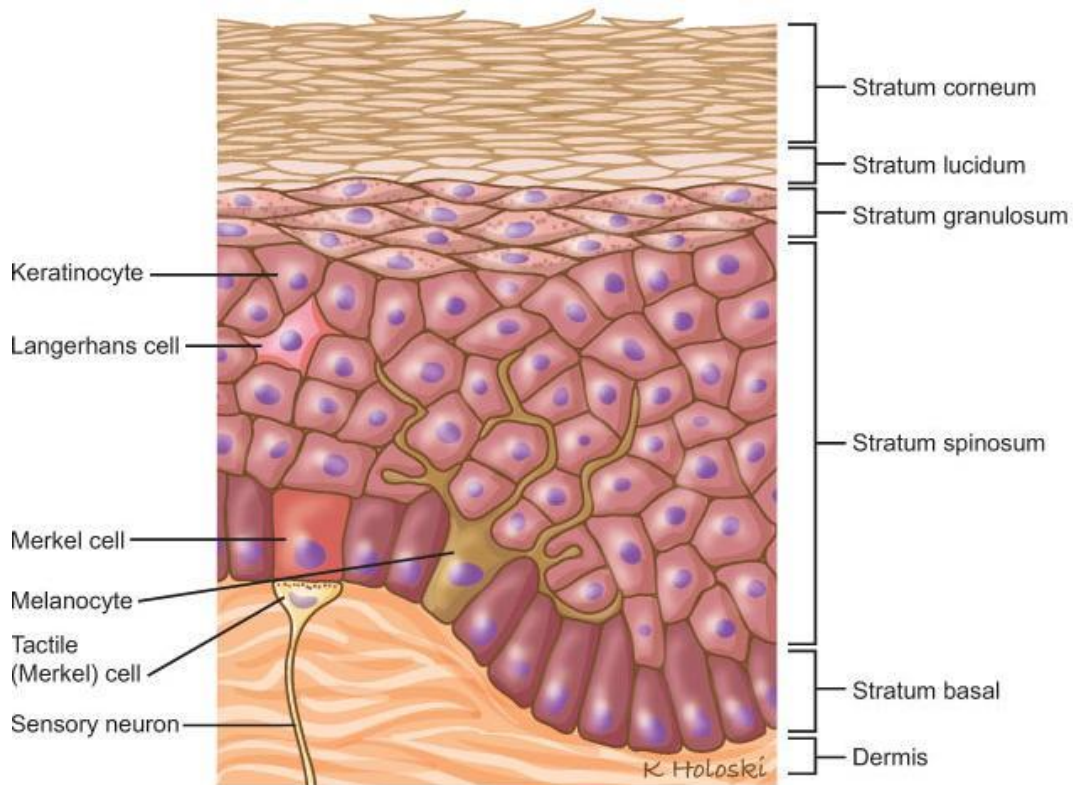
Estrato espinoso; nombrado de esta manera debido a que presenta varias capas celulares (5-15 capas) con grandes prolongaciones citoplásmicas o “espinas” las cuales maduran y migran hacia la superficie uniendo sus prolongaciones mediante desmosomas. Esta capa proporciona la resistencia mecánica necesaria



para resistir los traumas físicos. Los queratinocitos localizados en esta capa expresan las queratinas K1 y K10.

- Estrato granuloso; Consta de 1-3 capas, se localizan en la porción no queratinizada mas superficial de la epidermis, las células presentes contienen abundantes gránulos de queratohialina. Esta capa juega un papel esencial en la retención de agua del cuerpo. Las células presentes en esta capa expresan las queratinas K2 y K11 .
- Estrato córneo; es la capa más externa de la epidermis, está compuesta principalmente por células que han emigrado desde el estrato granuloso. Estas son células aplanadas que han perdido sus núcleos y orgánulos citoplásmicos, dando lugar a la queratina blanda. El tiempo transcurrido desde la división celular a la formación de la capa córnea es de aproximadamente 28 días. Las queratinas que se expresan en esta capa son la K3 y K12 (Moll et al., 2008) .

En ciertas zonas como la palmoplantar, existe una capa visible, amorfa, entre la capa granulosa y la capa córnea que se denomina estrato lúcido (Ackerman, 2008).



### Membrana basal

Es una capa fina de matriz extracelular especializada que se localiza entre la epidermis y la dermis, ésta es sintetizada por células basales de la epidermis, está formada principalmente por colágena tipo IV, laminina, nidógeno-entactina, y proteoglicanos. La membrana plasmática de las células basales están unidos a la lámina basal por hemidesmosomas. Este tipo de unión dermo-epidérmica, establece la polaridad celular y la dirección del crecimiento, dirige la organización del citoesqueleto de las células basales, proporciona señales de desarrollo, y funciona como una barrera semipermeable entre capas.

## **Dermis**

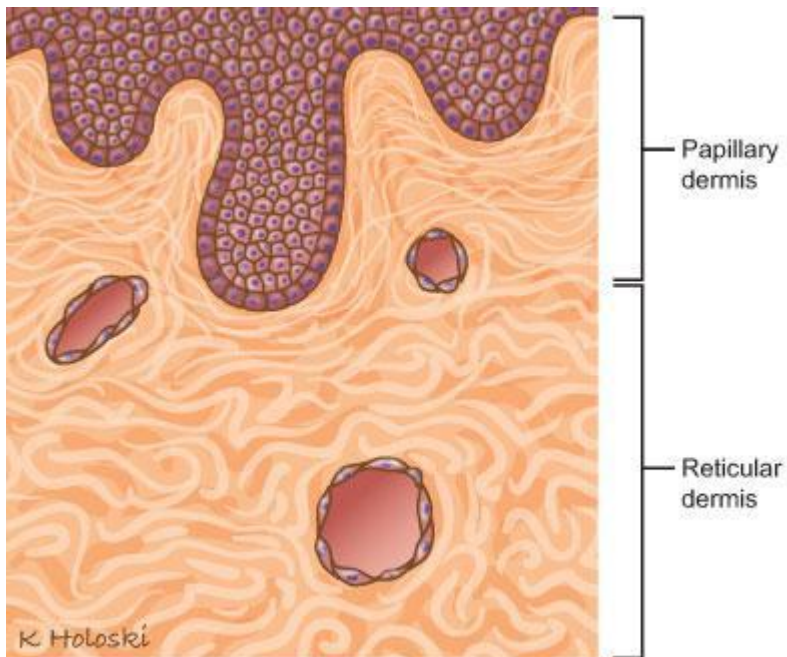
La dermis, representa alrededor del 90% del peso de la piel, y constituye la base de este sistema, esta integrada de tejido conectivo fibroso, filamentoso, y amorfo que presenta apéndices epidérmicos, fibroblastos, macrófagos y mastocitos, sin embargo en respuesta a diferentes estímulos los linfocitos, células plasmáticas y otros leucocitos, entran en la dermis. La dermis es una capa dura y resistente que protege contra el daño mecánico y contiene estructuras especializadas, comprende la mayor parte de la piel, ayuda en la regulación térmica, e incluye receptores de estímulos sensoriales (Brodell and Rosenthal, 2008). La dermis está compuesta por 2 capas, la dermis papilar y la dermis reticular.

- La dermis papilar es la capa superior delgada de la dermis, consiste en un tejido conjuntivo laxo ubicado inmediatamente por debajo de la epidermis, las fibras de colágena que presenta suelen ser mas delgadas que las que se localizan en la porción profunda, presenta gran cantidad de nervios y vasos sanguíneos. (Pringle et al., 2002)
- La dermis reticular subyace a la capa papilar mas gruesa y menos celular que la dermis papilar. Se caracteriza por la presencia de fibras elásticas mas gruesas y por presentar un acomodo irregular de colágena.

El fibroblasto es el tipo celular predominante en la dermis y por lo tanto es la célula encargada de sintetizar los elementos fibrosos de la dermis como colágena, fibras elásticas y sustancia fundamental. Sin embargo, la colágena también puede ser

sintetizada por otras células como miofibroblastos, osteoclastos, etc. Es importante mencionar que la colágena no es homogénea en todo el organismo ya que en la actualidad, existen aproximadamente 20 tipos de colágena en relación con la morfología, composición de aminoácidos y propiedades físicas (Zaidi and Lanigan, 2010b)

Se ha reportado que la composición de proteínas de la capa dérmica de la piel incluye la colágena tipo I, III, VI, XII y XIV,(Li et al., 2007) siendo la colágena tipo I la más abundante (75%) en la dermis reticular a diferencia de la colágena tipo III que está presente principalmente en la dermis papilar y mínimamente en la dermis reticular (Vitellaro-Zuccarello et al., 1992). Las fibras elásticas son esenciales para las propiedades retráctiles de la piel y solo representan un 2-4% de los constituyentes de la dermis.



## Hipodermis

Se localiza debajo de la capa reticular, se caracteriza por la presencia de adipocitos, por lo cual se considera un sitio importante para el almacenamiento de energía y como aislante ya que está conformada por el panículo adiposo y el tejido conectivo laxo. En esta zona se originan algunas células musculares lisas aisladas, así como pequeños haces de músculo liso, los cuales forman los músculos erectores del pelo y conectan con las partes más profundas de los folículos pilosos con la dermis superficial. (Brodell and Rosenthal, 2008)

## Reparación de la herida

La dermis interactúa con la epidermis en el mantenimiento de las propiedades de ambos tejidos. Las dos regiones interactúan en la reparación y remodelación de la piel ante una lesión. La reparación de la herida está orquestada por numerosas moléculas, incluyendo factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas pro/ anti-inflamatorias y factores angiogénicos producidos por una variedad de tipos de células, incluyendo queratinocitos, fibroblastos, leucocitos y células endoteliales. Esta reparación se lleva a cabo mediante 3 fases de acción simultánea: inflamación, formación de tejido y remodelación tisular, las cuales generan como resultado un tejido con características similares, pero no idénticas a la piel ilesa .

La reparación de la epidermis lesionada se produce por regeneración, un proceso similar a la producción normal de la epidermis. Las células de la capa basal se multiplican, migran desde las áreas no lesionadas y sustituyen las áreas lesionadas. Grandes cantidades de fibrina, coágulos sanguíneos o tejidos muertos forman una barrera física que impide la penetración del fibroblasto y retrasa la producción de fibras de colágena. Sin embargo, a medida que los fibroblastos avanzan en el área lesionada, ocurre fibrinólisis que destruye la red de fibrina y permite el paso y proliferación de fibroblastos; el espacio de la herida se llena de pequeñas fibras orientados al azar los cuales aumentan gradualmente de volumen y producen una estructura densa formada por fibroblastos fusiformes y fragmentos de tejido elástico y por lo tanto la producción de colágeno.(Tamama and Kerpedjieva, 2012) A medida que disminuye la población de fibroblastos, las fibras de colágena se convierten en el rasgo anatómico predominante de las heridas. Una de las características de la remodelación de la herida es el cambio de composición de la matriz extracelular. Como se mencionó anteriormente, el colágeno tipo I representa aproximadamente el 75% de colágena y colágeno tipo III constituye 10% de colágena presente en la dermis. Sin embargo, al inicio del proceso de cicatrización, la colágena de tipo III es la predominante. En este caso, la

colágena de tipo III comienza a sintetizarse después de 48 a 72 horas y se secreta al máximo entre 5 y 7 días. La cantidad total de colágeno aumenta durante el proceso de la reparación, alcanzando una máxima deposición de 2 a 3 semanas después de la lesión (Li et al., 2007) para finalmente formar una estructura que une los bordes de los tejidos seccionados, la cicatriz, la cual funciona como un mecanismo de reparación para regenerar los tejidos de la dermis y epidermis que hayan sido afectados tras una lesión que altere la continuidad de la superficie. (Tamama and Kerpedjieva, 2012) Durante el período de 1 año o más, la dermis vuelve gradualmente a la fenotipo previo a la lesión estable, que consiste principalmente de colágeno tipo I (Li et al., 2007).

Es poco probable que los procesos biológicos que actúan para reparar heridas de quemaduras que sea diferente de aquellos que actúan para reparar cualquier otra herida.

## **Quemaduras**

Las quemaduras se definen como una lesión cutánea causada por un efecto térmico u otro mediante cualquier agente, ya sea físico, químico o biológico, el cual provoca cambios de orden general. Una quemadura se produce cuando algunas o todas las células en la piel u otros tejidos son destruidos. (Peck, 2011) Su gravedad variará de acuerdo a su extensión, profundidad y localización; clasificándose de la siguiente manera:

Primer grado o superficiales, se definen como quemaduras en la epidermis que se traducen en una sencilla respuesta inflamatoria. Segundo grado superficial, se producen cuando se destruye la epidermis y menos del 50% de la dermis. Segundo grado profundas, presentan afectación de la epidermis y de más del 50% de la dermis con destrucción de fibras nerviosas por lo que son generalmente menos dolorosas (usualmente necesitan injertos). Tercer grado o de espesor total,

son aquellas en las que se dañan todos los elementos epidérmicos (epidermis, dermis, tejido subcutáneo y folículos pilosos). Como resultado de la extensa destrucción de las capas de la piel, no pueden regenerarse a sí mismos sin injerto.(Peck, 2012)

## **Terapéutica**

El tratamiento de una quemadura dependerá de acuerdo a la profundidad de las capas dañadas de la piel. Hasta la fecha, el trasplante de piel autólogo es la terapia de reemplazo recomendada para quemaduras dérmicas profundas donde hay poca vascularización, sin embargo cuando se presenta un alto porcentaje de piel quemada, el trasplante autólogo no es suficiente.(Andreassi et al., 2005) La segunda estrategia es el trasplante de piel donada, sin embargo, la baja tasa de donación dificulta la aplicación de este tratamiento.

Por otra parte, las lesiones epidérmicas como quemaduras solares no requieren tratamiento quirúrgico específico y se regeneran sin dejar cicatriz. Las quemaduras de segundo grado superficial, se curan por la epitelización de los márgenes de la herida, donde los queratinocitos basales se transforman, migran y proliferan. (Held et al.) La administración de cubiertas temporales, acelera la reparación de la piel dañada por quemaduras superficiales, ya que requieren de un material que pueda restablecer la función epidérmica. (Pessolato et al., 2011) Las funciones generales de las cubiertas temporales son la protección de la herida, la prevención de la infección y promover la cicatrización proporcionando un microambiente óptimo para la curación.

A pesar de esto, hasta la fecha, ningún sustituto de piel puede reemplazar todas las funciones de la piel humana intacta, debido a que estos se encuentran desprovistos de células y solo son utilizados para que las propias células del paciente proliferen y sanen las heridas.



### **Amnios humano radioesterilizado (AHR)**

La membrana amniótica humana es un tejido trilaminar compuesto por un mesénquima avascular, la membrana basal y el epitelio interno. Tanto las partes celulares y acelulares de la membrana tienen características antiinflamatorias que podrían ayudar a la velocidad de cierre de la herida. (Aartsen et al., 2015)



*Figura 1. Amnios Humano Radioesterilizado (AHR)*

Las membranas amnióticas se encuentran entre el apósito biológico más utilizado ya que actúa como una barrera eficaz, tiene buena adherencia a la herida, es bacteriostático y no tiene ninguna reacción inmunológica. (Singh and Chacharkar, 2011)

Para esto, el amnios requiere ser lavado, secado al aire, determinar la carga microbiana inicial y calcular dosis de esterilización. Posteriormente, el tejido es empacado al vacío, etiquetado y esterilizado con radiación gamma de Cobalto-60 en la Planta de Irradiación Gamma del Instituto. Ya irradiados, se realizan pruebas de esterilidad y se almacenan a temperatura ambiente, en espera de resultados serológicos negativos practicados a las donadoras 6 meses después, para confirmar que no existe ningún agente infeccioso que pudiera transmitirse. Cumplido lo anterior, los tejidos son liberados para su distribución y aplicación clínica.

### **Piel porcina radioesterilizada (PPR)**

La piel porcina puede emplearse como cubierta temporal que sustituye la piel en grandes heridas como son las causadas por quemaduras. Esto debido a su similitud con la piel humana como densidad de la



*Figura 2. Piel Porcina*

piel, espesor de la dermis, composición y cantidad de la grasa subcutánea, además de su disponibilidad y fácil manejo. (Koob et al., 2014)

La piel se obtiene de cerdos sanos, seleccionados por un médico veterinario. La piel se retira de los cerdos en una planta de sacrificio y después se traslada al banco de tejidos, donde se limpia, se desinfecta y se corta en tiras de tamaño y espesor adecuado. Las tiras de piel se preservan congeladas, en glicerol o bien se deshidratan por liofilización. Una vez empacadas, las tiras de piel se envían a la Planta de Irradiación Gamma del ININ para su esterilización por irradiación.

Posteriormente los apósitos de piel de cerdo se envían a hospitales donde son utilizados en el tratamiento de pacientes con heridas difíciles de sanar. (Martínez-Pardo et al., 2007)

### **Células troncales mesenquimales**

El problema específico en el tratamiento de quemaduras es encontrar una fuente de células que tengan una alta disponibilidad después de la quemadura. En las últimas décadas el uso de las células troncales mesenquimales (MSC) surge como una alternativa para la reparación de diversos tejidos dañados. Estas células muestran capacidades de auto-renovación y de diferenciación multipotencial, se caracterizan por ser positivas a ciertos antígenos de superficie como CD90, CD105, CD29, entre otros y ser negativas a CD34 y CD45. Además de su capacidad de diferenciación, una de las ventajas principales es su obtención, ya que pueden ser aisladas de distintas fuentes del cuerpo humano, tales como: médula ósea, pulpa dental, cordón umbilical y de tejido adiposo entre otras, (Stewart and Stewart, 2011) lo cual nos indica una alta disponibilidad después de una quemadura.

### **ANTECEDENTES**

Una de las problemáticas actuales para la aplicación de las MSC en heridas cutáneas es encontrar un material de soporte que permita trasplantar estas células

a una lesión o quemadura evitando su dispersión hacia sitios distintos a los de la herida. (Clover et al., 2015)

Se ha reportado que una matriz acelular ideal debe tener una estructura de malla tridimensional relativamente intacta y natural que favorezca la infiltración de células y vasos sanguíneos, así como la reparación de tejidos. Además, debe contener un bajo nivel de componentes inmunológicos e inducir una débil respuesta inmune inflamatoria. (Song et al., 2015)

Ante esto, el amnios humano radioesterilizado (AHR) y la piel porcina radioesterilizada (PPR) son biomateriales acelulares que actualmente se usan como coberturas cutáneas temporales y que han mostrado propiedades regenerativas, pues cuentan con una matriz extracelular similar a la de la membrana basal de la piel humana. (Martínez-Pardo et al., 2007)

La piel porcina radioesterilizada (PPR) es un apósito biológico que permite la recuperación de la piel en pacientes con quemaduras superficiales ya que reduce la sensación de dolor, disminuye la pérdida de calor y electrolitos, evita la deshidratación, impide que la herida se infecte con microorganismos, acelera la epitelización y mejora la movilidad del paciente, además de presentar componentes de la matriz extracelular, como son laminina, fibronectina, colágena tipo I y IV, los cuales, son fundamentales para la estructuración de la lámina basal presente entre la dermis y la epidermis (Song et al., 2015) (Reing et al., 2010) que, además de inducir la adhesión celular también son promotores de proliferación.

El Amnios humano radioesterilizado (AHR) se ha utilizado como cubierta cutánea temporal para la reparación del epitelio dañado en pacientes quemados, ya que presenta propiedades anti inflamatorias, anti bacterianas, ofrece una barrera de protección en las heridas cutáneas y permite la reepitelización. (Mohammadi et al., 2013)

Dentro de los componentes de esta membrana encontramos que es rica en distintos tipos de matriz extracelular tales como colágenas, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos y elastina (Mohammadi et al., 2013; Shortt et al., 2009) .Estas moléculas son idóneas para el crecimiento celular ya que son inductores de proliferación y viabilidad celular. Esto ha permitido que el AHR sea utilizado como

biomaterial, para promover la cicatrización en enfermedades de la córnea, tales como quemaduras químicas y térmicas, úlceras, así como defectos epiteliales persistentes ya que muestra una alta capacidad para reducir la inflamación, y mejorar la cicatrización de heridas. (Shortt et al., 2009)

Se ha reportado que el amnios humano contiene células troncales mesenquimales antes de ser radioesterilizada.(Onishi et al., 2015) En este sentido, el amnios promete ser un microambiente ideal si tratamos de re-incorporar MSC en este andamio para su cultivo.

El proceso de radioesterilización de ambas bio-matrices se lleva a cabo en México en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) dentro del banco de tejidos radioesterilizados, los tejidos de este banco se encuentran certificados para la aplicación clínica bajo la norma ISO 9001:2000 (Martinez-Pardo and Mariano-Magana, 2007). Además de haber demostrado tener una aplicación clínica segura. En cuanto al proceso de reparación, se ha demostrado que las citocinas juegan un papel clave en el proceso de cicatrización, ya que en estudios en los cuales se inyecta IL-6 a heridas fetales se origina como consecuencia una cicatriz, mientras que IL-8 es capaz de reclutar neutrófilos que a su vez generan inflamación y fibrosis, estos resultados sugieren que estas citocinas pro-inflamatorias son responsables en gran manera de la formación de cicatrices.(Konstantinova et al., 1996) Por su parte la Interleucina-10 (IL-10) es un potente anti-inflamatorio que se ha implicado en prevenir la respuesta inflamatoria del feto durante la gestación, además de estar presente en líquido amniótico y reducir la producción de IL-6 y-8. Los fetos de ratones deficientes en IL-10 muestran que la reparación de su piel produce cicatrices lo que indica que esta citocina es de gran importancia para que la reparación de la piel no produzca una cicatriz. (Liechty et al., 2000) Por tal motivo, el tratar de regular la respuesta inmune la reparación de las lesiones de la piel podría resultar en un tejido con un menor grado de cicatrización.

Las células troncales mesenquimales (MSC) han generado gran interés dentro de la medicina regenerativa, ya que han mostrado tener múltiples efectos terapéuticos, por lo tanto, surgen como una alternativa para la reparación de tejidos dañados.

El tejido adiposo es la principal opción para la obtención células troncales mesenquimales autólogas para el tratamiento de las heridas como las quemaduras debido a su rápida disposición. Sin embargo, cuando se obtienen las células de linaje comprometido desde una fuente apropiada, la eficiencia del trasplante es limitada debido a la falta de microambientes adecuados que favorecen la adhesión celular, la proliferación y la diferenciación. (Sivan et al., 2014)

Recientemente, diferentes estudios ha demostrado la participación de las MSC aplicándolas mediante aspersores con los cuales estas se rocían con una mezcla de fibrinógeno y trombina a lo largo de la herida, (Falanga et al., 2007) o bien, mediante inyecciones de células en el lugar de la lesión, ambos métodos han reportado una recuperación de las lesiones.(Sivan et al., 2014)

La eficacia de las MSC puede estar mediada principalmente por los factores secretados ya que se ha reportado que a nivel funcional, inducen el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que promueven la angiogénesis y la reparación de la herida. (Tamama and Kerpedjieva, 2012)

Algunos autores afirman que las MSC secretan IL-10 en condiciones específicas con el ambiente inflamatorio y ante la presencia de citocinas proinflamatorias que activan ciertos receptores tipo Toll en MSC. Se ha demostrado que las MSC secretan factores que hasta de regular la secreción de IL-10 por las células mononucleares de sangre periférica, así como por los macrófagos (Kyurkchiev et al., 2014)

Es importante mencionar que dentro de las ventajas que ofrece el uso de este tipo de células en la medicina regenerativa es que no han mostrado formar tumores, se les ha adjudicado un componente inmunoregulador gracias a su capacidad de secretar moléculas anti-inflamatorias y reducción de la cicatrización. (Krampera et al., 2006; Sasaki et al., 2008)

Resultados preliminares en nuestro laboratorio indican que tanto el AHR y la PPR son excelentes bio-materiales para el cultivo de las MSC, el cual mantiene a las

células viables, promueve la proliferación y migración celular además de fomentar la liberación de IL-10.

## **JUSTIFICACIÓN**

El uso de células troncales mesenquimales tanto en pacientes con heridas cutáneas como en estudios pre-clínicos han demostrado que estas células son capaces de disminuir la formación de cicatrices debido a la liberación de citocinas anti inflamatorias, la generación de vasos sanguíneos y la inhibición de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, lo cual es una ventaja ya que aún en pacientes con gran porcentaje de superficie corporal quemada es muy probable encontrar tejido adiposo sano, mediante el cual podremos aislar MSC para el tratamiento autólogo de pacientes con quemaduras mixtas. Sin embargo, los métodos de aplicación de las MSC al área a reparar son diversos y no existen estudios donde se compare la eficiencia de integración de las MSC a la lesión.

En este estudio proponemos el uso del AHR y PPR para el crecimiento de MSC, ya que contienen proteínas de matriz extracelular que probablemente favorecerán la adhesión y proliferación. Hasta el momento ningún estudio ha reportado el uso de estas matrices para el cultivo de células troncales mesenquimales ni sus respuestas celulares, lo que otorga originalidad a este estudio y no duplicidad de ensayos. La mayoría de los sustitutos biológicos que se comercializan son de origen extranjero, por lo que es de gran importancia generar constructos que sean fabricados en México con la finalidad de disminuir costos y fomentar el desarrollo tecnológico que favorezca a los pacientes con quemaduras así como con otras afecciones de piel.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué efecto tendrán las células troncales mesenquimales cultivadas sobre el amnios humano o piel porcina radioesterilizadas en el tratamiento de quemaduras de segundo grado profundo?

## **HIPÓTESIS**

Las células troncales mesenquimales (MSC) cultivadas sobre amnios humano o piel porcina radioesterilizada, reparará eficazmente daños en la piel generados por quemaduras de segundo grado profundo.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de las MSC cultivadas sobre dos biomatrices en el tratamiento de quemaduras de segundo grado profundo.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Caracterizar las células troncales mesenquimales cultivadas en las biomatrices AHR y PPR.
- Evaluar el grado de reparación tisular que generan el AHR y la PPR enriquecido con MSC en tejido neo-formado.
- Determinar el efecto de las MSC sobre el cierre de heridas cutáneas en ratones atómicos.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

Se evaluarán 4 condiciones experimentales: 1. Tratamiento con el AHR; 2. Tratamiento con la PPR; 3. Tratamiento con AHR+MSC; 4. PPR+MSC; 5. Grupo control cubiertos con gasa y vaselina. Cada ensayo se realizará por triplicado.

### **Obtención de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo**

Las MSC se obtuvieron a partir de remanentes de grasa de lipoaspirados de cirugías estéticas mediante la colaboración con la Dra. Lourdes Rodríguez Rodríguez Subdirectora del CENIAQ del Instituto Nacional de Rehabilitación y el Dr. Erik Márquez Gutiérrez quienes laboran en distintas clínicas particulares e invitan a los pacientes a donar el tejido para investigación, previa firma de

consentimiento informado. Estos lipoaspirados fueron transportados en medio DMEM + 10% de antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina), se lavaron con PBS + 1% de antibiótico/antimicótico. La grasa fué disgregada mecánicamente con bisturí y después con colagenasa I (2mg/ml) durante 1hr con agitación constante a 37°C. Posteriormente, las células se centrifugaron y fueron contadas para ser sembradas a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Después de 24 h las células que no se adhirieron a la caja de cultivo fueron removidas con PBS.

### **El análisis histológico**

Tanto el Amnios Humano Radioesterilizado como la Piel Porcina Radioesterilizada fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante 10 minutos, se lavaron tres veces con PBS y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Las MSCs que fueron diferenciadas hacia el linaje condrogénico se tiñeron utilizando azul alcian, las MSCs que se diferenciaron en osteocitos fueron teñidos mediante la tinción de Von Kossa, y finalmente las células que se diferenciaron hacia el linaje condrogénico fueron teñidas mediante rojo oleoso.

### **Citometría de flujo**

Para verificar la presencia de MSC en nuestros cultivos, se realizó un análisis de los marcadores característicos de las MSC, mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (FACS; Becton Dickinson). La elección de los anticuerpos utilizados en este estudio se basó en los marcadores de superficie propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular eligiendo a los marcadores CD73 (ecto-5'-nucleotidasa), CD90 (Thy-1), así como CD34 y CD45 (LCA). Al llegar al 80% de confluencia, las células del primer pase eran cultivadas en cajas de 75cm<sup>2</sup> a una



concentración aproximada de  $0.2 \times 10^6$  células por prueba de anticuerpos. Se tomaron 50uL y se colocaron en tubos de citometría, donde se incubaron durante 45 min. a 4°C con CD34-PE (Becton Dickinson), CD45-FITC (Becton Dickinson), CD73-APC (BD Pharmingen) y CD90-APC (BD Pharmingen). Posteriormente, las células fueron lavadas y se diluyeron en 500 ul de PBS. Finalmente, los datos fueron adquiridos por el equipo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado con un láser azul de 488nm. El análisis de datos fue realizado con el software de Quest Pro (Becton Dickinson ImmunocytometrySystems).

### **Diferenciación celular**

Para corroborar la capacidad de diferenciación de las MSCs a condrocitos, hacia células de linaje cartilaginoso, adipogénico y osteogénico se realizó lo siguiente:

La diferenciación adipogénica fue inducida por MSC cultivadas durante una semana en un medio adipogénico (DMEM suplementado con 10 % de SFB , 1 mM de dexametasona , 0.5 isobutilmetilxantina mM, 10 mg / ml de insulina y 60 mM indometacina) y se evaluó mediante la tinción de rojo oleoso . La diferenciación osteogénica se indujo mediante el cultivo de MSCs durante 1 semana en medio osteogénico ( DMEM suplementado con 10 % de SFB , 100 nM dexametasona , glicerofosfato 10 mM, 10 ng / ml BMP7 y 50 mM de ácido ascórbico) y se evaluó la presencia de este tipo celular mediante inmunofluorescencia para detectar Runx2 y la tinción Von Kossa . Por último para la diferenciación condrogénica se utilizaron las MSC cultivadas durante dos semanas en medio condrogénico ( DMEM suplementado con 1 % de SFB , 50g / ml de ácido ascórbico, 10 ng / ml de factor de crecimiento transformante -  $\beta 1$  , y 6,25 mg / ml de insulina ) confirmando la presencia de este tipo celular mediante la tinción con azul alcian y la inmunofluorescencia para detectar colágena tipo II.

## **Generación del sustituto biológico de piel.**

Una vez que se obtuvieron las MSC estas fueron sembradas sobre 1cm<sup>2</sup> de PPR y 1cm<sup>2</sup> de AHR (tanto la Piel Porcina Radioesterilizada como el Amnios Humano Radioesterilizado son parte de la colaboración con la Dra. María Esther Martínez Pardo y la Maestra Ma. de Lourdes Reyes Frías del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares) a una concentración de 70,000 células /cm<sup>2</sup>.

Los sustitutos se mantuvieron en medio de cultivo 24 h antes de realizar el implante.

## **Comparación de las características biológicas de las MSC sobre el AHR y sobre la PPR in vitro.**

### Ensayo de viabilidad

Mediante inmunofluorescencias se realizó un análisis del porcentaje de incorporación de homodímero de propidio (muerte celular) y del porcentaje de células con incorporación de calceína (viabilidad).

Para confirmar que tanto el Amnios Humano Radioesterilizado como la Piel Porcina Radioesterilizada son biomatrices factibles para el acarreamiento de las MSC aisladas a partir de tejido adiposo, se realizó una prueba de viabilidad utilizando el kit de Molecular Probes LIVE / DEAD ® Viability/Cytotoxicity para células de mamífero. Siguiendo las especificaciones establecidas por el fabricante; fueron diluidos 1 µM de calceína AM y 2 µM de EthD-1 en medio de Hank. Las biomatrices fueron inubadas con esta solución durante 45 minutos a 37 ° C. Finalmente, las biomatrices se lavaron con PBS y se analizaron mediante microscopia confocal (microscopio LSM 780 y ZEN 2010 con el software de Carl Zeiss).

### Ensayo de proliferación

Después de 4 días de cultivo de las células troncales mesenquimales sobre RHA o RPS, se determinaron los porcentajes de células positivas mediante inmunofluorescencias para la proteína Ki-67. Ambas biomatrices enriquecidas se lavaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% / PBS 0,1 M (pH = 7,4). Las células se marcaron con el anticuerpo primario contra Ki67 humano (1: 100, BioLegend) y se incubaron a 4 ° C durante toda la noche. Posteriormente, las biomatrices se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1: 500) durante 2 horas. Los núcleos se tiñeron utilizando 1 mg / ml de 4', 6-diamidina-2-phenylidole-dihidrocloruro (DAPI) durante 10 minutos. Imágenes fueron capturadas con un microscopio Axio visio Observer A.1 (Zeiss).

### **Modelo de quemadura de segundo grado profundo en ratones NU/NU.**

Se utilizaron ratones atómicos machos de entre 6 y 7 semanas de edad obtenidos del bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

A su llegada al bioterio del INR los ratones fueron mantenidos en cuarentena para eliminar aquellos que no se encuentren sanos. Cada ratón contaba con una hoja de evaluación donde se describía el sexo, peso, fecha de gestación, fecha de operación, condición experimental, cambios de vendajes, medidas tomadas durante el experimento y observaciones generales.

En condiciones asépticas, todos los animales fueron anestesiados mediante la inyección de ketamina (100mg/kg) y xilazina (40mg/kg). El estado de anestesia se monitoreaba mediante la compresión de la oreja y/o cola del ratón buscando que estos reflejos no estén presentes pero que el ritmo cardiaco siga constante.

Para la inducción de la lesión, se realizó una quemadura mediante un dispositivo que contiene una placa de cobre que será calentada a 105 °C durante 10 seg., la cual será apoyada sobre el dorso de los ratones durante 5 seg. para marcar una quemadura de 1 cm<sup>2</sup>. Posteriormente, se realizó una debridación del tejido necrosado, tomaron fotografías a una distancia fija y se colocaron las biomatrices

de las diferentes condiciones experimentales sobre el lecho de la herida humedecida con solución salina. Se colocó una gasa encima de la quemadura y se cubrió con hypafix para evitar que las biomatrices fueran removidas. Posteriormente a cada ratón se le administró solución salina y meloxicam (1mg/kg) como analgésico. Al término de la cirugía los ratones se alojaron en las mismas jaulas bajo las mismas constantes ambientales.

Con las mismas condiciones de anestesia mencionadas anteriormente se realizaron cambios de vendaje a los días 3,6,8 y 10, se midió el área de la herida y se cuantificó el cierre de las mismas mediante fotografías. Las fotografías fueron tomadas desde la misma distancia y con una regla junto a la herida para que el programa pueda tomar como medida de referencia esa escala.

Al finalizar el estudio, los animales fueron sacrificados por toracotomía y dislocación cervical como método secundario. Posteriormente, se les realizará biopsia de la zona de lesión.

#### **Cuantificación de citocinas.**

Al tercer día del cultivo de las células troncales mesenquimales cultivadas sobre amnios humano radioesterilizado y piel porcina radioesterilizada, se recolectó el medio de cultivo y se realizó un ensayo de ELISA para la cuantificación de IL-10 e IL-1 $\beta$ .

Para la cuantificación de citocinas posquemadura, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca al día 14 posquemadura. Las muestras se recolectaron en tubos BD Microtainer, posteriormente se centrifugaron a 6000rpm para la obtención del suero, a partir del cual se cuantificó la concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$  mediante ensayos de ELISA.

#### **Análisis de la reparación del tejido.**

Una vez sacrificados los animales (7,14 días post-quemadura), se tomó el tejido a analizar, y se fijó en PFA 4% durante 24 horas, posteriormente las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina para obtener cortes de 5 $\mu$ m en el micrótopo para determinar la reparación del tejido.

Determinación de la proliferación celular: Para analizar la proliferación celular se realizarán inmunofluorescencias que detecten a fibroblastos (antígeno de superficie de fibroblastos), queratinocitos (Citoqueratina 5 y 10) y al antígeno Ki67. Lo cual nos permitirá determinar el porcentaje de células en proliferación de cada linaje.

Cuantificación de la reepitelización de la herida: Mediante tinciones de hematoxilina/eosina se tomarán fotografías que serán analizadas por el software Image J, se calculará el espesor del tamaño del epitelio neo-formado así como el tamaño de la zona que aun carezca de epitelio.

Análisis de la composición de la matriz extracelular: Se realizarán tinciones de Masson y Herovici para determinar la colágena depositada tras la reparación de la herida, el porcentaje de tejido teñido y la intensidad se determinarán mediante el software Image J. Además se realizarán inmunofluorescencias para conocer el porcentaje de Colágena tipo I, III y IV presentes en la lesión así como para Vimentina para determinar la síntesis de la membrana basal.

Cierre de la herida: Se cuantificó mediante la toma de fotografías con una escala y medición fija, el área de superficie de la herida se midió mediante el software Image J a diferentes tiempos (0,3,6,8,10 y 14 días).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados numéricos serán comparados con pruebas estadísticas paramétricas o no paramétricas previa comprobación de normalidad dentro de cada grupo con el estadístico de Shapiro-Wilk. Si los datos pasan la prueba de normalidad se realizará una ANOVA seguida de una prueba de Tukey siendo  $p < 0.05$  considerado como diferencias significativas entre las condiciones experimentales. Los análisis se realizarán mediante el programa SPSS ver 17.0 para Windows.

## **RESULTADOS**

### **Obtención de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo**

#### **Determinación del fenotipo**

Múltiples estudios han demostrado la existencia de una pequeña población de células troncales mesenquimales en el tejido adiposo. Las células troncales mesenquimales se obtuvieron de lipoaspirados de pacientes sometidos a la cirugía estética previo consentimiento firmado. Una vez obtenido el tejido adiposo se pasa por una aguja de número 4, de esta manera se obtienen aproximadamente cinco veces más el número total de células que cuando el tejido solo es disgregado con bisturí. Se incubó con colagenasa tipo I durante 1 hora a 37 ° C y 200 rpm. Una característica de MSC es su capacidad de adherirse a las cajas de cultivo; para esto se sembraron 50.000 células /cm<sup>2</sup> durante 24 h. Las células que no se adhieren fueron removidas con PBS. Las células adheridas alcanzaron la confluencia alrededor de 1 semana después. En el inicio de los cultivos, se observaron células con diferentes morfología; una parte de ellos tenía una forma espiculada como fibroblastos y otros tenía una morfología redondeada (Figura 1). Durante el cultivo, las células adquieren gradualmente un fenotipo de fibroblastos. Como se informó en otros estudios, las MSC expresan CD90 y CD73, y la expresión negativa de CD34 y CD45. En nuestros cultivos se ha detectado la expresión de CD90 (84,8%), CD73 (99.9%), CD45 (0,15%) y CD34 (1,6%) (Figura 2). Estos datos, junto con los fenotipos morfología celular antes mencionados sugieren que obtuvimos una población de células troncales derivadas de tejido adiposo. Esto fue apoyado además por otras investigaciones que han demostrado el aislamiento de MSCs en el tejido adiposo.

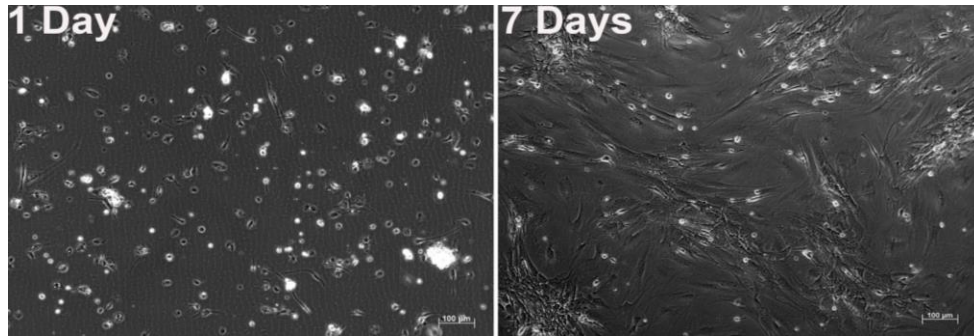


Fig.1 Fenotipo de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano. Fotografía de cultivos primarios de células de tejido adiposo. Aislamiento en el primer día y el día siete. En el primer día se observan células con diferente morfología; al día siete las células presentan una morfología de tipo fibroblastoid, así como adherencia, ambas características son primordiales para la caracterización de las células troncales mesenquimales

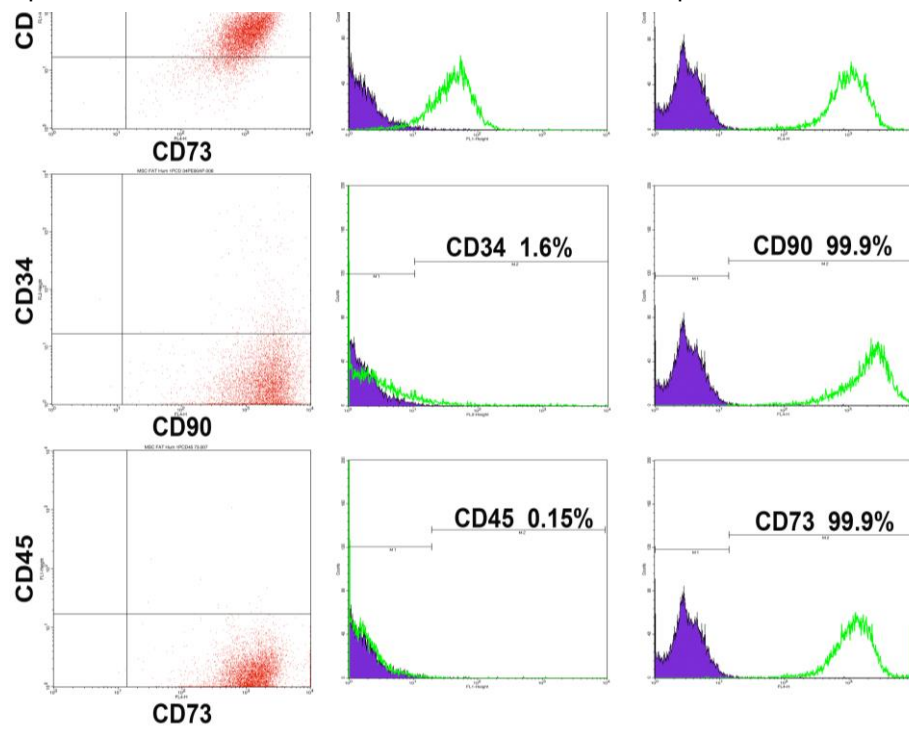


Fig.2 Citometría para los marcadores de células troncales mesenquimales: CD90 y CD73 positivos y CD45, CD34 negativos. La observación de una población de células mixtas se corroboró con citometría de flujo en donde encontramos la presencia de los marcadores de superficie: CD90 y CD73 ; también se observó un bajo porcentaje de células positivas para CD34 y CD45.

## Capacidad de diferenciación de las células troncales derivadas de tejido adiposo

Una tercera característica de las células troncales mesenquimales es su capacidad de diferenciación y, por tanto, se diferencian en condrocitos, osteocitos,



y adipocitos. Para analizar la presencia de condrocitos después de el proceso de diferenciación, se realizó una inmunofluorescencia para el colágeno de tipo II y tinción con azul alciano; para los osteocitos, se analizó la presencia de Runx2 y realizó la tinción de Von Kossa. Por último, para la detección de los adipocitos, se realizó tinción con rojo oleoso. Nuestros datos sugieren que tenemos una población de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo en nuestras cultivos, y esta población es capaz de diferenciarse en otros tipos celulares (Figura 2).

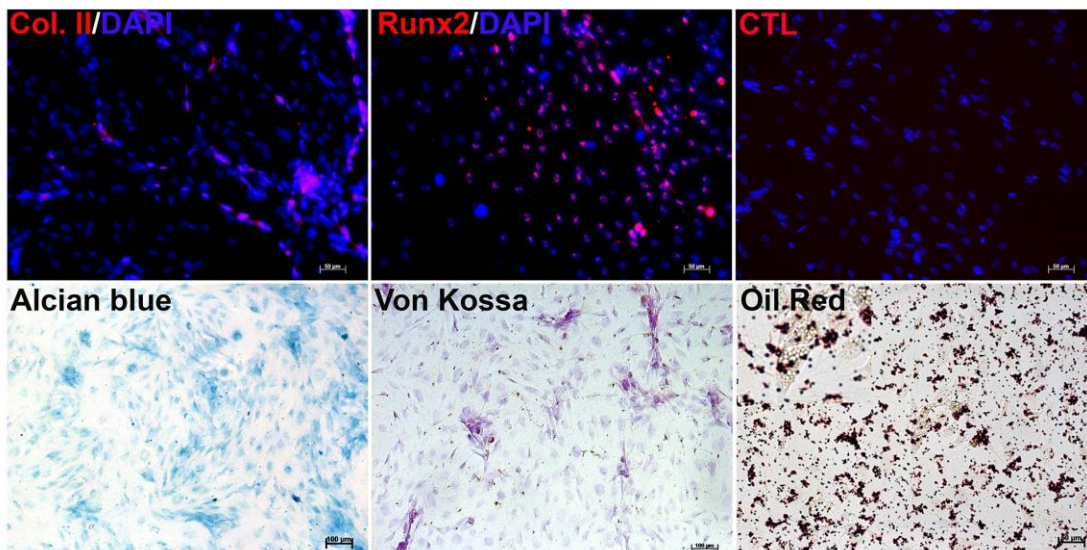


Fig.3 Diferenciación de células trocales mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano. Las células fueron diferenciadas al linaje condrogénico y se evaluó mediante una inmunofluorescencia para colágeno tipo II (rojo) y mediante la tinción con azul alciano. Para la diferenciación osteogénica se analizó Runx2 por inmunofluorescencia (rojo) y mediante la tinción VonKossa. Finalmente, para detectar la diferenciación hacia el linaje adipogénico se realizó tinción con rojo oleoso. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).



### **Análisis histológico del amnios humano radioesterilizado y piel porcina radioesterilizada.**

Una vez que se aislaron y caracterizaron las células, se realizó un análisis histológico del AHR y la PPR. Aunque estos sustitutos biológicos se han utilizado durante mucho tiempo como cubiertas para el tratamiento de quemaduras sin ningún tipo de problema, es importante conocer los componentes que prevalecen en ellos después del lavado, secado y radioesterilización. Ante esto, aunque ambos materiales son expuestos a diversos procesos como el lavado con hipoclorito, se puede notar la presencia de células epidermales en el AHR y la epidermis completa, así como algunas células de la dermis en la piel porcina radioesterilizada (Fig.4)

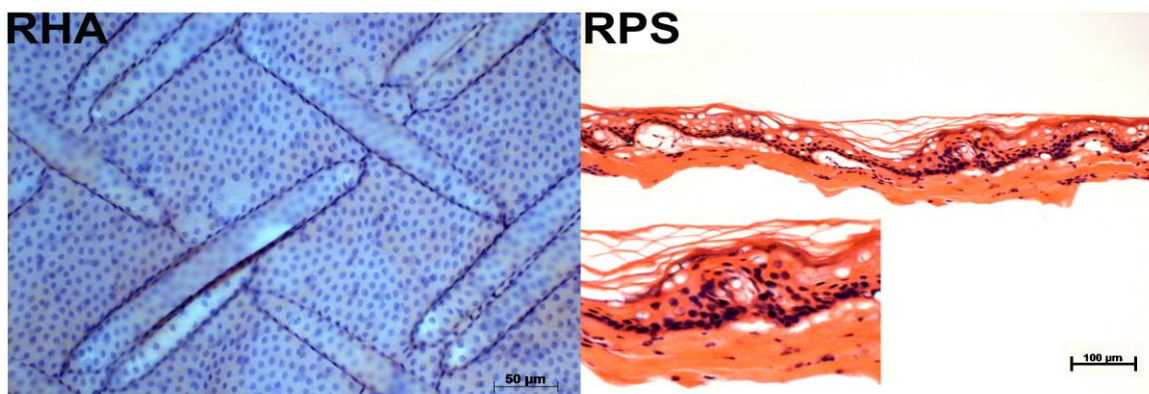


Figura 4. Análisis Histológico de Amnios Humano Radioesterilizado y Piel Porcina Radioesterilizada. Tanto el Amnios Humano Radioesterilizado (izquierda) como la Piel Porcina Radioesterilizada(derecha) presevan componentes celulares después del tratamiento con hipoclorito y la radioesterilización.

## **Generación del sustituto biológico de piel**

Para confirmar la viabilidad de las MSC sobre estos dos sustitutos, se realizó una prueba que mediante fluorescencia determina simultáneamente las células vivas y muertas. Es decir la actividad de esterasas intracelulares y la integridad de la membrana plasmática, mediante la calceína AM y EthD-1. Ambos sustitutos se compararon usando el software Image J; 10X y 20X, analizando diferentes campos para contar las células en toda el área del andamio. La viabilidad de las MSC sembradas sobre el AHR fue de 92.7%, mientras que en la PPR fue de 90.5%. Lo cual sugiere que ambos sustitutos podrían funcionar como buenos andamios, así como presentar una opción potencial para futuros trasplantes de células autólogas o heterólogas en pacientes con lesiones por quemaduras o por otros problemas de la piel.

Para analizar la capacidad de autorenovación de las células troncales mesenquimales, se realizó un ensayo mediante la evaluación de la proteína Ki67 (implicada en el ciclo celular) para evaluar que estas células son capaces de proliferar sobre estos sustitutos biológicos. Las células que proliferan emiten una señal fluorescente en el interior de los núcleos donde Ki67 participa activamente en la división celular. El aumento en la proliferación celular es un buen parámetro debido a que permitiría utilizar estos materiales como acarreadores de células autólogas para promover la formación de nuevo tejido en las heridas.

Las células troncales mesenquimales cultivadas sobre el amnios humano radioesterilizado mostraron un mayor porcentaje de proliferación (49.5%) en comparación con las células troncales mesenquimales sembradas sobre la piel porcina radioesterilizada (27.7%). Las células muestran claramente una señal fluorescente en el interior de los núcleos donde Ki67 participa activamente en la división celular (Figura 5). El aumento en la proliferación celular es un buen parámetro porque queremos utilizar estos materiales como portadores de células autólogas para promover la formación de nuevo tejido en las heridas.

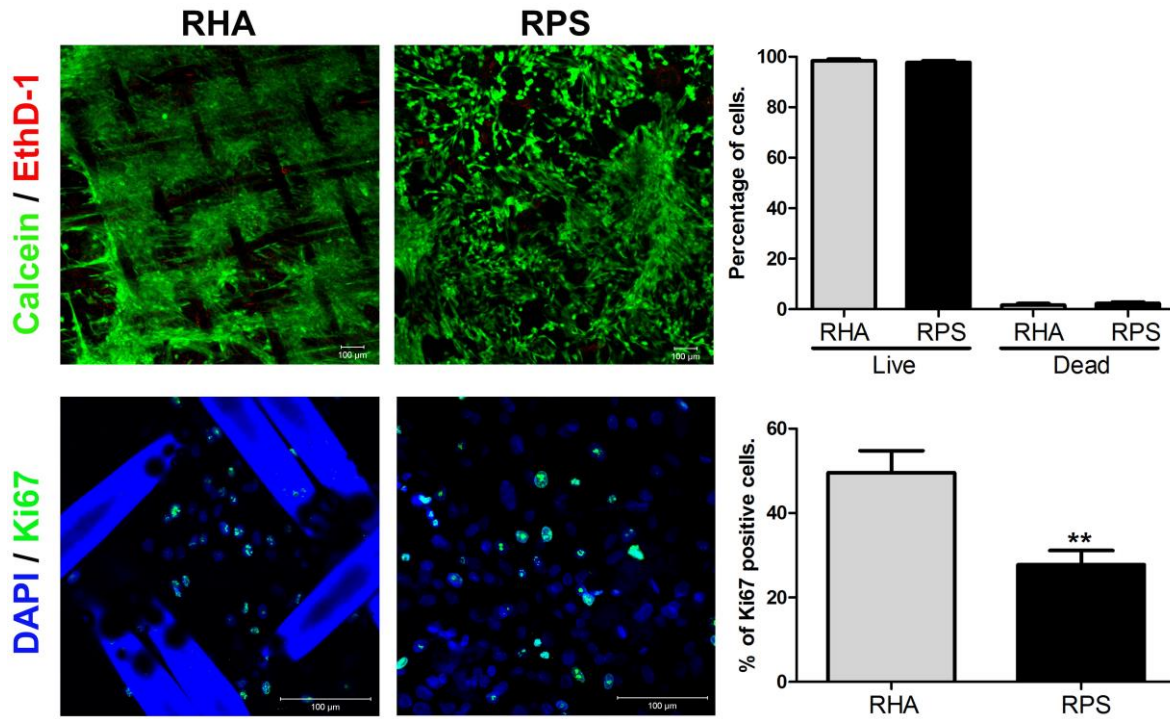


Fig.5 Viabilidad de células troncales mesenquimales derivadas de tejido asiposo sobre Amnios Humano Radioesterilizado y Piel Porcina Radioesterilizada. Las células troncales mesenquimales muestran alta viabilidad y proliferación celular cuando están sembradas sobre Amnios Humano Radioesterilizado (RHA) y Piel Porcina Radioesterilizada (RPS). Ensayo de viabilidad con calceína (fotografías superiores), las células vivas se tiñen de verde, mientras que las células muertas son positivas para EthD-1 tiñéndose de rojo, no se encontraron diferencias significativas entre el amnios humano radioesterilizado y la piel porcina radioesterilizada. El ensayo de proliferación (fotografías inferiores) muestra la presencia de marcador de proliferación Ki67 (verde) de las células troncales mesenquimales sembradas sobre los dos sustitutos biológicos. Las células que crecen en RHA tienen una mayor capacidad proliferativa en comparación con RPS. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Prueba T-student, \*\*  $p < 0.001$ .

## Cuantificación de citocinas de las células troncales mesenquimales cultivadas sobre Amnios Humano Radioesterilizado y Piel Porcina Radioesterilizada

Dado que la inflamación es un proceso crucial para el proceso de reparación de la herida, se evaluó la capacidad de secreción de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo sobre el Amnios Humano Radioesterilizado y la Piel Porcina Radioesterilizada. Se ha reportado que la secreción de IL-10 es característica de las células troncales mesenquimales y, esta implicada en el proceso antiinflamatorio, mientras que la IL-1 $\beta$  es una citocina implicada en el proceso inflamatorio. Por lo tanto, se cuantificó mediante un ensayo de ELISA, la secreción de las citocinas antes mencionadas después de que las células fueran sembradas sobre los andamios, encontrando que las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo secretan una mayor cantidad de IL-1 $\beta$  cuando son sembradas sobre la Piel Porcina Radioesterilizada a diferencia de aquellas sembradas sobre el Amnios Humano Radioesterilizado. Lo cual probablemente pueda adjudicarse al origen xenogénico del andamio.

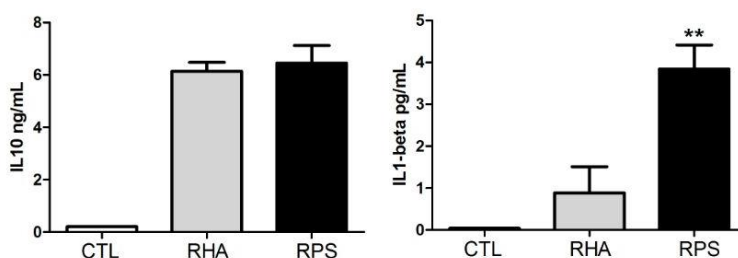
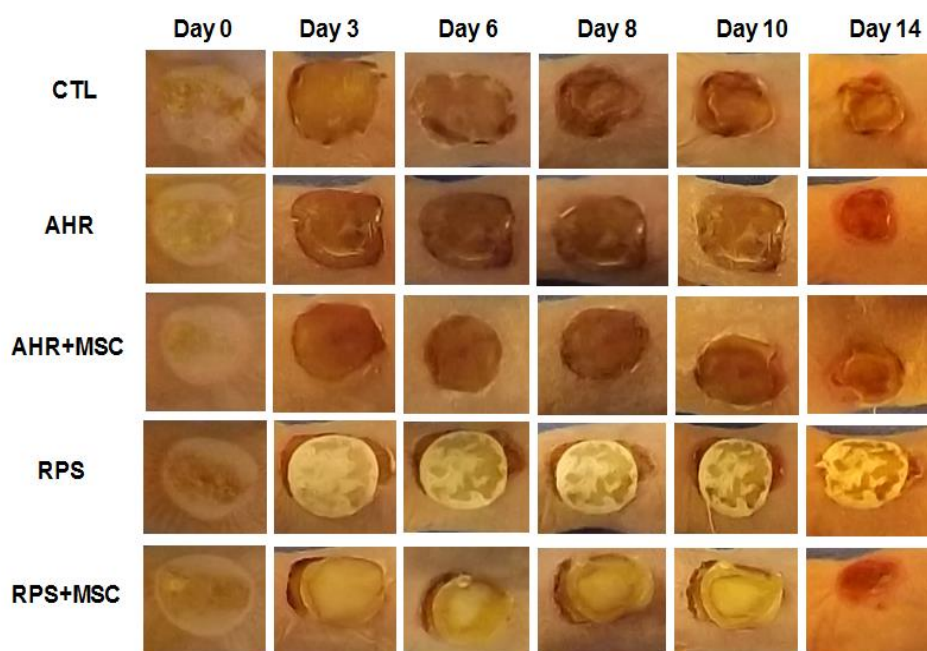


Fig.6 El Amnios Humano Radioesterilizado y la Piel Porcina Radioesterilizada promueve la secreción de citocinas. La primera gráfica representa la concentración de IL-10 por las células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo mostrando que no hay diferencias significativas entre los andamios. La segunda gráfica representa la concentración de IL-1 $\beta$ , mostrando que la Piel Porcina Radioesterilizada induce una mayor secreción de IL-1 $\beta$  en comparación con el Amnios Humano Radioesterilizado.

### **Análisis de la reparación del tejido.**

Una vez que se realizó la quemadura, se llevó a cabo un seguimiento de la reparación del tejido a diferentes tiempos (0,3,6,8,10,14 días) mediante fotografías a una distancia fija, de esta manera se lograron notar los cambios progresivos en el área de la lesión , la cual fue medida mediante el programa ImageJ encontrando que evidentemente hay una reducción del tamaño de la quemadura desde el día cero hasta el día 14 posquemadura.



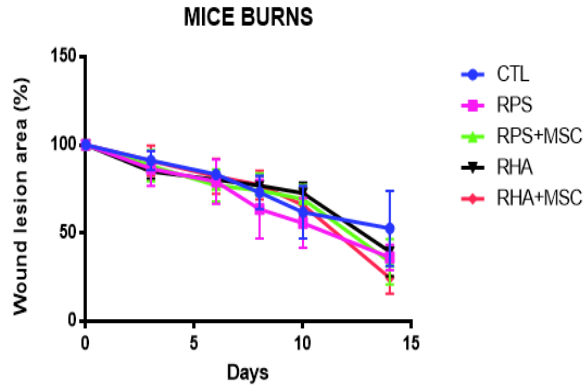


Fig.7 Progresión de la reparación del tejido desde el día 0 hasta el día 14 posquemadura. En la gráfica se muestra el área de la lesión en la cual se ve una tendencia en la disminución de la herida, sin embargo no se encontraron diferencias significativas.

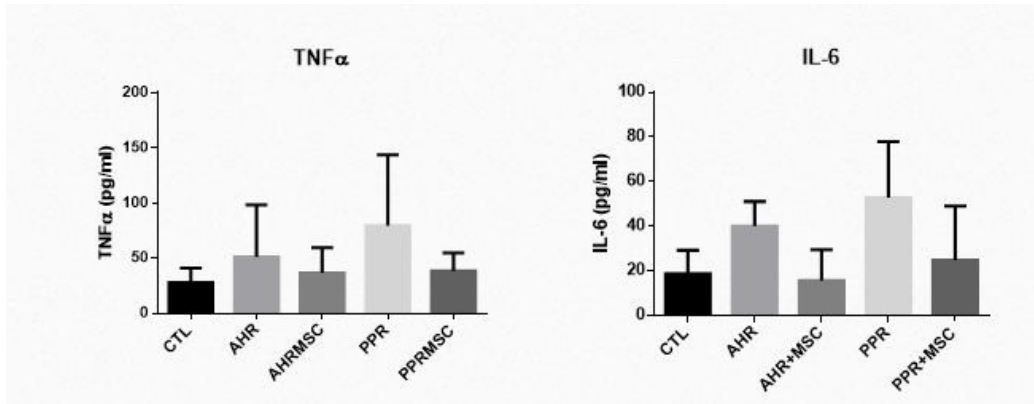


Fig. 8 Secreción de citocinas 14 días posquemadura. Secreción sistémica de TNF-a e IL-6 a los 14 días posquemadura, no se encontraron diferencias significativas.

Para el análisis histológico, se obtuvieron las biopsias y se incluyeron en parafina para obtener cortes de 5  $\mu$ m de cada condición, realizando la tinción de hematoxilina&eosina para evaluar la reepitelización de la herida, así como para cuantificar el espesor del tejido neoforado. De la misma manera se analizará la composición de la matriz extracelular mediante la tinción de Masson y Herovicci



para determinar la colágena depositada tras la reparación de la herida así como el porcentaje del tejido teñido. Además se realizarán inmunofluorescencias para conocer el porcentaje de Colágena tipo I, III y IV presentes en la lesión así como para Vimentina para determinar la síntesis de la membrana basal. A continuación se muestran las tinciones preliminares a los 7 y 14 días.

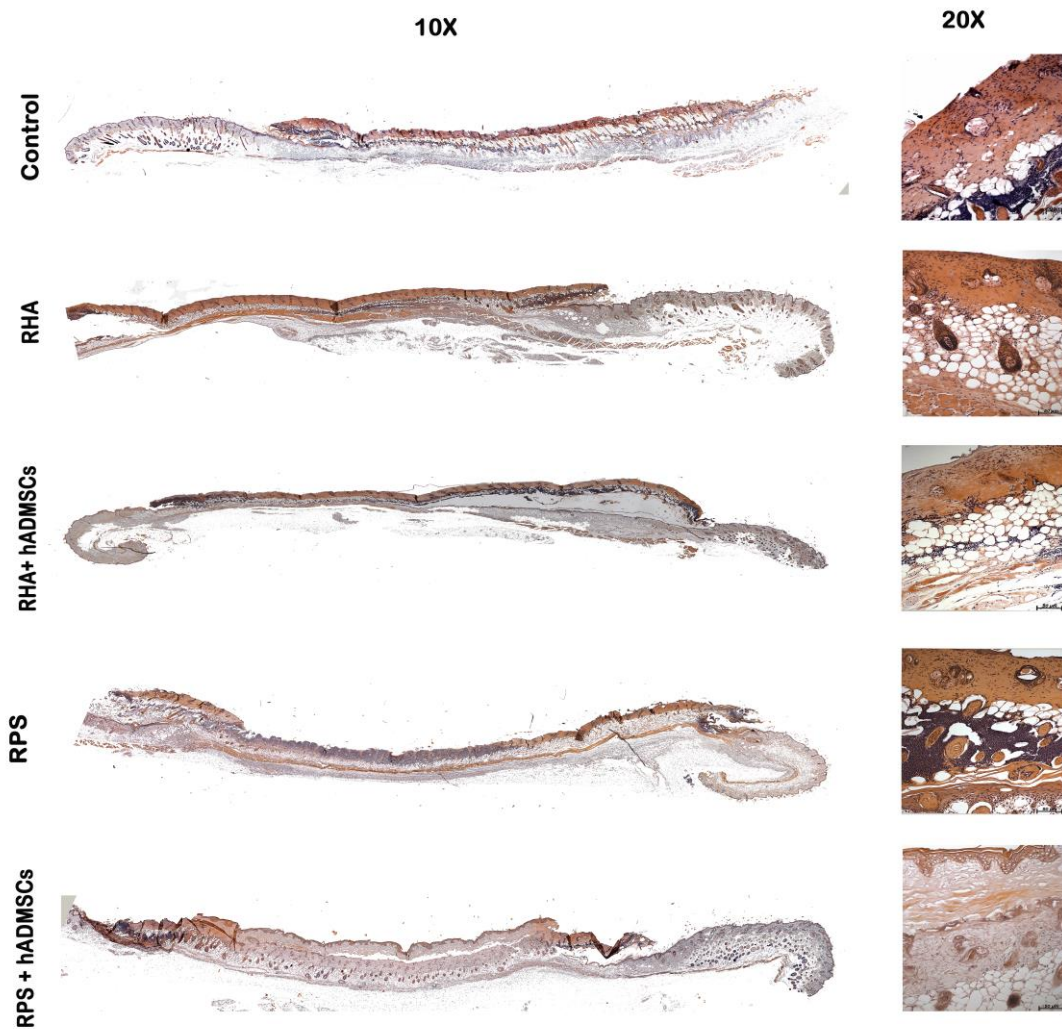


Fig. 8 Análisis histológico 7 días posquemadura. Tinción H&E

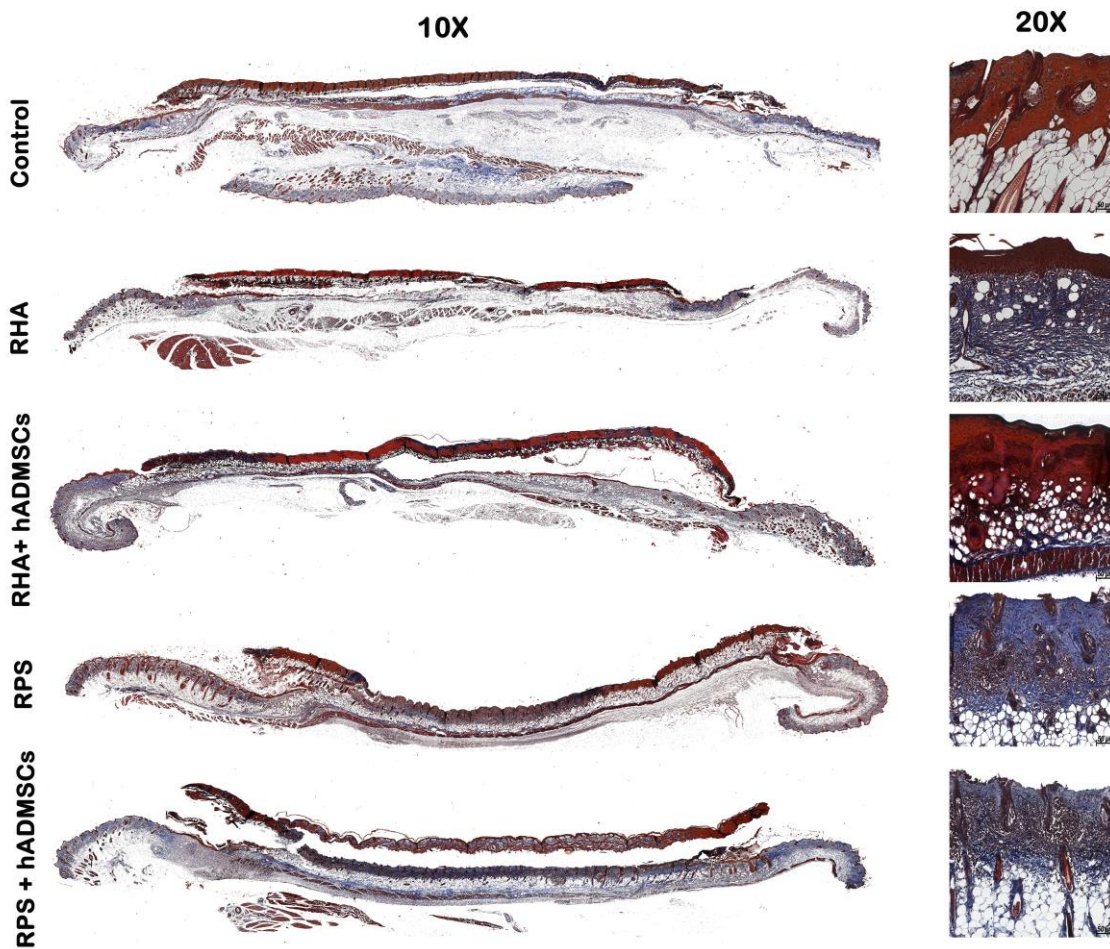


Fig. 9 Análisis histológico 7 días posquemadura. Tinción Masson



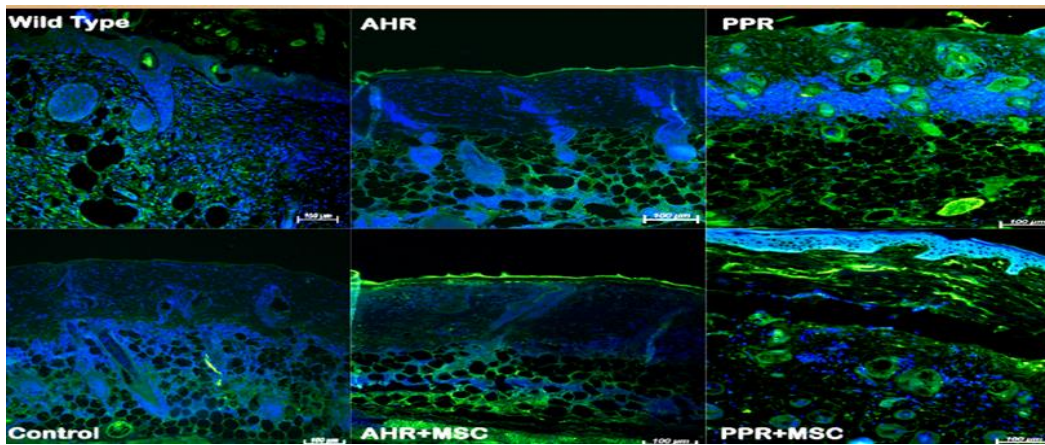


Fig. 10 Inmunofluorescencia para la detección de colágena tipo 1 a los 7 días posquemadura.

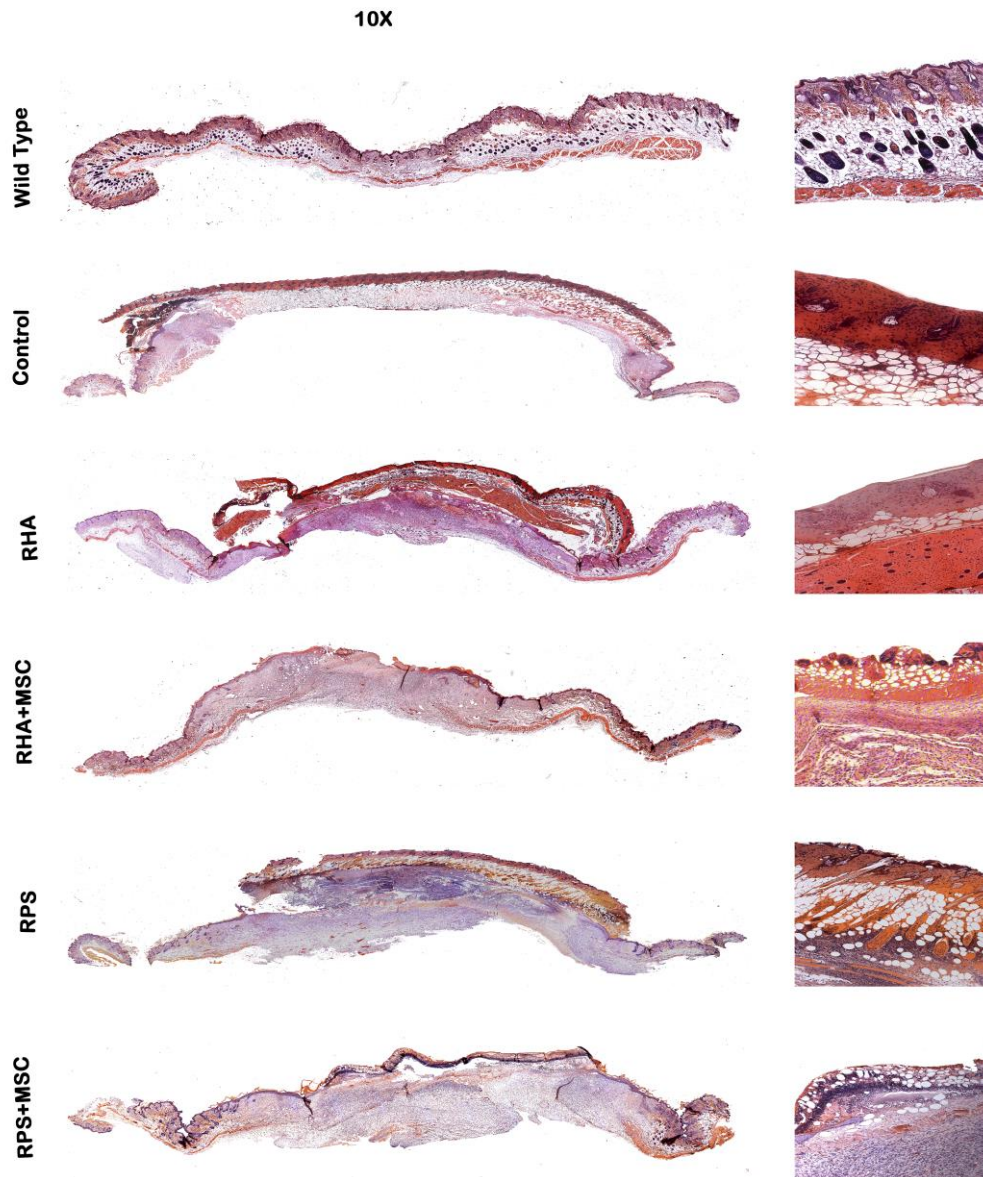


Fig.11 Análisis histológico. Tinción H&E día 14 posquemadura.

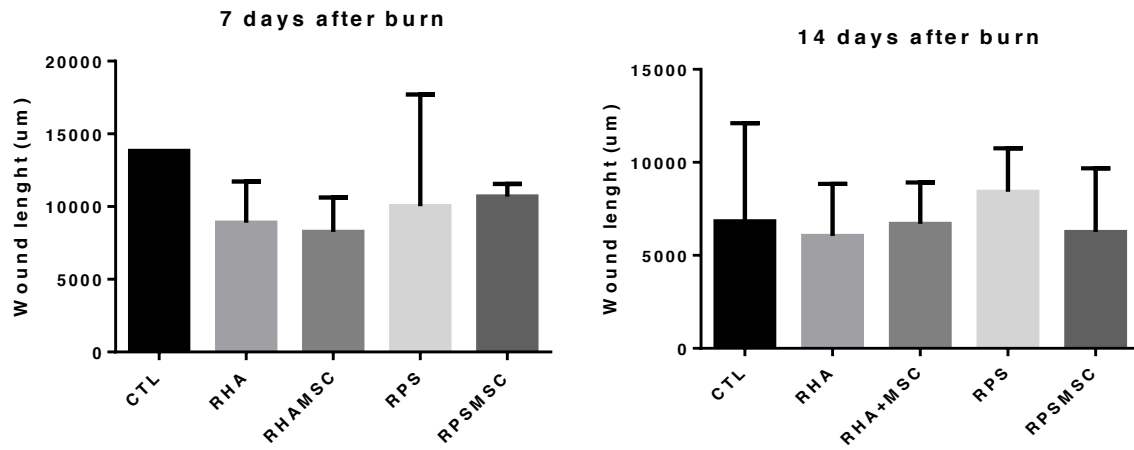


Fig.12 Análisis cierre de la herida a los 7 y 14 días posquemadura. . La primera gráfica representa la longitud de la lesión a los 7 días posquemadura. La segunda gráfica representa la longitud de la lesión a los 14 días posquemadura. No se encuentran diferencias significativas entre grupos.

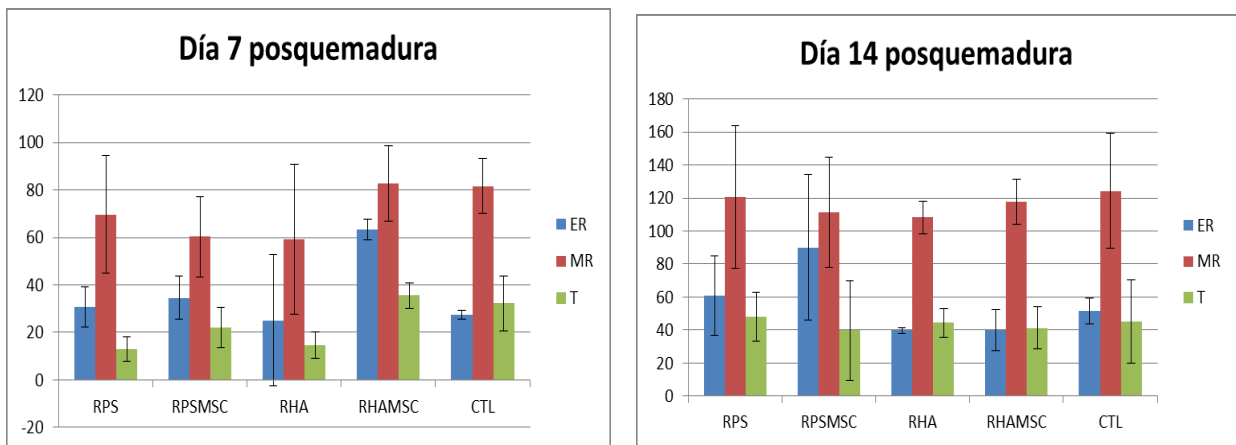


Fig.13 Análisis la longitud de la reepitelización. La primera gráfica representa el ancho de la reepitelización a los 7 días posquemadura. La segunda gráfica representa la longitud de la lesión a los 14 días posquemadura. Las medidas se tomaron al inicio de la reepitelización (ER), en la parte media de la reepitelización (MR) y al término de la reepitelización (T).

## REFERENCIAS

- Aartsen, M.G., Ackermann, M., Adams, J., Aguilar, J.A., Ahlers, M., Ahrens, M., Altmann, D., Anderson, T., Argüelles, C., Arlen, T.C., *et al.* (2015). Flavor Ratio of Astrophysical Neutrinos above 35 TeV in IceCube. *Physical review letters* *114*, 171102.
- Andreassi, A., Bilenchi, R., Biagioli, M., and D'Aniello, C. (2005). Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clinics in Dermatology* *23*, 332-337.
- Clover, A.J.P., Kumar, A.H.S., Isakson, M., Whelan, D., Stocca, A., Gleeson, B.M., and Caplice, N.M. (2015). Allogeneic mesenchymal stem cells, but not culture modified monocytes, improve burn wound healing. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* *41*, 548-557.
- Falanga, V., Iwamoto, S., Chartier, M., Yufit, T., Butmarc, J., Kouttab, N., Shrayar, D., and Carson, P. (2007). Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng* *13*, 1299-1312.
- Held, M., Rahmanian-Schwarz, A., Rothenberger, J., Schiefer, J., Janghorban Esfahani, B., Schaller, H.E., and Jaminet, P. Alteration of biomechanical properties of burned skin. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*.
- Konstantinova, N.V., Duong, D.M., Remenyik, E., Hazarika, P., Chuang, A., and Duvic, M. (1996). Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology* *107*, 615-621.
- Koob, T.J., Lim, J.J., Masee, M., Zabek, N., and Denoziere, G. (2014). Properties of dehydrated human amnion/chorion composite grafts: Implications for wound repair and soft tissue regeneration. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* *102*, 1353-1362.
- Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., and Vinante, F. (2006). Role for Interferon -  $\gamma$  in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells* *24*, 386-398.
- Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K., and Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells* *6*, 552-570.
- Liechty, K.W., Kim, H.B., Adzick, N.S., and Crombleholme, T.M. (2000). Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. *Journal of Pediatric Surgery* *35*, 866-873.
- Martínez-Pardo, M.E., Ley-Chávez, E., Reyes-Frías, M.L., Rodríguez-Ferreyra, P., Vázquez-Maya, L., and Salazar, M.A. (2007). Biological wound dressings sterilized with gamma radiation: Mexican clinical experience. *Radiation Physics and Chemistry* *76*, 1771-1774.
- Martinez-Pardo, M.E., and Mariano-Magana, D. (2007). The tissue bank at the Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares: ISO 9001:2000 certification of its quality management system. *Cell Tissue Bank* *8*, 221-231.
- Mohammadi, A.A., Johari, H.G., and Eskandari, S. (2013). Effect of amniotic membrane on graft take in extremity burns. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* *39*, 1137-1141.
- Onishi, R., Ohnishi, S., Higashi, R., Watari, M., Yamahara, K., Okubo, N., Nakagawa, K., Katsurada, T., Suda, G., Natsuizaka, M., *et al.* (2015). Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell

Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats. *Cell transplantation*.

Peck, M.D. (2011). Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 37, 1087-1100.

Peck, M.D. (2012). Epidemiology of burns throughout the World. Part II: intentional burns in adults. *Burns* 38, 630-637.

Pessolato, A.G.T., Martins, D.d.S., Ambrósio, C.E., Maçanares, C.A.F., and de Carvalho, A.F. (2011). Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 37, 1192-1201.

Ramírez, F.A., Romay, A.Á., Benítez, T.P., Luna, V.N., and Chávez, M.C. Tratamiento láser en niños con cicatrices postquemadura.

Reing, J.E., Brown, B.N., Daly, K.A., Freund, J.M., Gilbert, T.W., Hsiong, S.X., Huber, A., Kullas, K.E., Tottey, S., Wolf, M.T., *et al.* (2010). The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 31, 8626-8633.

Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., and Shimizu, H. (2008). Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 180, 2581-2587.

Shortt, A.J., Secker, G.A., Lomas, R.J., Wilshaw, S.P., Kearney, J.N., Tuft, S.J., and Daniels, J.T. (2009). The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials* 30, 1056-1065.

Singh, R., and Chacharkar, M.P. (2011). Dried gamma-irradiated amniotic membrane as dressing in burn wound care. *Journal of Tissue Viability* 20, 49-54.

Sivan, U., Jayakumar, K., and Krishnan, L.K. (2014). Constitution of Fibrin-Based Niche for In Vitro Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Keratinocytes. *BioResearch Open Access* 3, 339-347.

Song, G., Wu, Y., Wang, F., Shao, Y., Jiang, J., Fan, C., Li, P., Zhang, Y., and Zuo, H. (2015). Development and preparation of a low-immunogenicity porcine dermal scaffold and its biocompatibility assessment. *J Mater Sci: Mater Med* 26, 1-13.

Stewart, M.C., and Stewart, A.A. (2011). Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 27, 243-261.

Tamama, K., and Kerpedjieva, S.S. (2012). Acceleration of Wound Healing by Multiple Growth Factors and Cytokines Secreted from Multipotential Stromal Cells/Mesenchymal Stem Cells. *Advances in Wound Care* 1, 177-182.

Wolf, S.E., Phelan, H.A., and Arnoldo, B.D. (2014). The year in burns 2013. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 40, 1421-1432.

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Descripción de actividades	Trimestres durante el segundo año de la maestría								
	1			2			3		
Mes:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Manejo y aislamiento de células troncales <b>mesenquimales</b>	X	X	X	X	X				
2. Generación del sustituto biológico de piel		X	X	X	X				
3. Generar quemadura de segundo grado profundo en ratones <b>atímicos</b>			X	X	X				
4. Análisis a 7 y 14 días de tratamiento				X	X				
5. Comparar el efecto de las MSC sobre AHR y PPR en la reparación tisular						X	X	X	
6. Análisis de resultados			X			X		X	
7. Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8. Escritura de tesis	X	X	X	X	X	X	X	X	X

## PROPUESTA DE TEMAS SELECTOS I, II Y III

- I. Citocinas y quimiocinas en la respuesta inflamatoria. Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.
- II. Ingeniería de tejidos Dra. María Cristina Velasquillo
- III. Células troncales. Dr. Roberto Sánchez Sánchez