



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
“Francisco García Salinas”**

---

---

**FACULTAD DE INGENIERÍA ELÉCTRICA**

**DESARROLLO DE UN IMPLANTE CON UTILIDAD  
POTENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE  
LESIONES TISULARES POR PIE DIABÉTICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MAESTRÍA EN INGENIERÍA Y  
TECNOLOGÍA APLICADA**

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

**Q.F.B. AURELIO PÉREZ FAVILA**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**Dra. en C. IDALIA GARZA VELOZ**

**Dra. en C. MARGARITA DE LA LUZ  
MARTÍNEZ FIERRO**

**ZACATECAS, ZAC. DICIEMBRE 2019**



# ÍNDICE

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

ABREVIATURAS

### 1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Sistema tegumentario
- 1.2. Estructura y función de la piel
  - 1.2.1. Matriz extracelular
  - 1.2.2. Uniones intercelulares de las células de la piel
- 1.3. Cicatrización de heridas: Proceso normal y en personas diabéticas.
- 1.4. Diabetes Mellitus
  - 1.4.1. Incidencia y prevalencia
  - 1.4.2. Costos de la Diabetes Mellitus y sus complicaciones
  - 1.4.3. Clasificación de la Diabetes Mellitus
  - 1.4.4. Diagnóstico
  - 1.4.5. Complicaciones
- 1.5. Síndrome de pie diabético
  - 1.5.1. Costos por complicaciones de pie diabético
  - 1.5.2. Fisiopatología
- 1.6. Úlceras
  - 1.6.1. Clasificación
  - 1.6.2. Tratamiento
- 1.7. Ingeniería de tejidos.
  - 1.7.1. Historia
- 1.8. Biomateriales para la ingeniería de tejidos
  - 1.8.1. Características y funciones
  - 1.8.2. Hidrogeles
  - 1.8.3. Tipos de biomateriales
  - 1.8.4. Factores de crecimiento
  - 1.8.5. PDGF y funciones

### 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 3. JUSTIFICACIÓN

### 4. HIPOTESIS

### 5. OBJETIVOS

- 5.1. Objetivo general

5.2. Objetivos específicos

6. ESTRATEGIA GENERAL

7. MATERIAL Y MÉTODOS

8. RESULTADOS

9. DISCUSIÓN

10. CONCLUSIONES

11. PERSPECTIVAS

12. REFERENCIAS

13. ANEXOS

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Clasificación de Wagner.

Tabla 2. Clasificación topográfica y grados de gravedad del pie diabético de San Elián.

Tabla 3. Lista de primers utilizados.

Tabla 4. Biopsias obtenidas.

Tabla 5. Experimentos control.

Tabla 6. Experimentos con diferentes condiciones de cultivo.

Tabla 7. Resultados de la caracterización de queratinocitos de acuerdo a la literatura y a lo experimental.

Tabla 8. Comparación de los pesos de las ratas a través del tiempo.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura de la piel.
- Figura 2. Estructura de la Epidermis.
- Figura 3. Estructura de la Dermis.
- Figura 4. Estructura de la Hipodermis.
- Figura 5. Esquematación de una herida.
- Figura 6. Posible vía de la ulceración en el pie diabético.
- Figura 7. Ejemplo de un apósito para DFU.
- Figura 8. Estrategia general.
- Figura 9. Diseño del ensayo de viabilidad en placa de 96 pozos.
- Figura 10. Modelo de la herida.
- Figura 11. Cultivo de queratinocitos.
- Figura 12. Caracterización del cultivo de queratinocitos.
- Figura 13. Comportamiento de las matrices a diferentes temperaturas.
- Figura 14. Capacidad de hinchamiento.
- Figura 15. Ensayo de Viabilidad celular.
- Figura 16. Pesos de las ratas a través del tiempo.
- Figura 17. Cierre de heridas a través del tiempo de los 4 tratamientos.
- Figura 18. Cierre de herida de los grupos de tratamiento a través del tiempo.
- Figura 19. Gráfica de matriz + células vs sin tratamiento día 9.
- Figura 20. Gráfica de matriz + células vs PBS + células día 9.
- Figura 21. Gráfica de matriz + células vs matriz día 13.
- Figura 22. Gráfica de PBS + células vs matriz día 1.
- Figura 23. Gráfica de PBS + células vs matriz día 3.
- Figura 24. Gráfica de PBS + células vs sin tratamiento día 1.

Figura 25. Gráfica de PBS + células vs sin tratamiento día 3.

Figura 26. Gráfica de la temperatura de todos los grupos de tratamiento.

Figura 27. Gráfica de temperatura de los grupos matriz + células vs sin tratamiento día 0.

Figura 28. Gráfica de temperatura de los grupos PBS + células vs sin tratamiento día 0.

## ABREVIATURAS

DM: Diabetes Mellitus

IDF: Federación Internacional de la Diabetes (por sus siglas en inglés, International Diabetes Federation)

GelMA: Gelatin methacrylate

PLGA: Poli (D, L-láctido-co-glicólido)

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

OMS: Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés World Health Organization)

ADA: Asociación Americana de Diabetes (por sus siglas en inglés, American Diabetes Association).

DMID: Diabetes mellitus insulino dependiente

NIDDM: Diabetes mellitus no insulino dependiente (por sus siglas en inglés, non-insulin-dependent diabetes)

PIB: Producto Interno Bruto

DMG: Diabetes mellitus gestacional

OGTT: Prueba de tolerancia oral a la glucosa (por sus siglas en inglés, Oral Glucose Tolerance Test)

FPG: Nivel de glucosa en plasma en ayunas (por sus siglas en inglés, fasting plasma glucose)

EASD: Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (por sus siglas en inglés, European Association for the Study of Diabetes)

NGSP: Programa Nacional de Estandarización de Glicohemoglobina, (por sus siglas en inglés, National Glycohemoglobin Standardization Program)

DCCT: Estudio de Control y Complicaciones de la Diabetes (por sus siglas en inglés, Diabetes Control and Complications Trial)

ND: Nefropatía diabética

DPN: Neuropatía Diabética Periférica (por sus siglas en inglés, Diabetic Peripheral Neuropathy)

PDN: Neuropatía diabética dolorosa (por sus siglas en inglés, Painful diabetic neuropathy)

DFU: Úlceras por pie diabético (por sus siglas en inglés, Diabetic foot ulcer)

NWTP: Terapia con presión negativa sobre heridas (por sus siglas en inglés, Negative Pressure Wound Therapy)

HBOT: Terapia de oxígeno hiperbárico (por sus siglas en inglés, hyperbaric oxygen therapy)

# DESARROLLO DE UN IMPLANTE CON UTILIDAD POTENCIAL EN EL TRATAMIENTO DE LESIONES TISULARES POR PIE DIABÉTICO

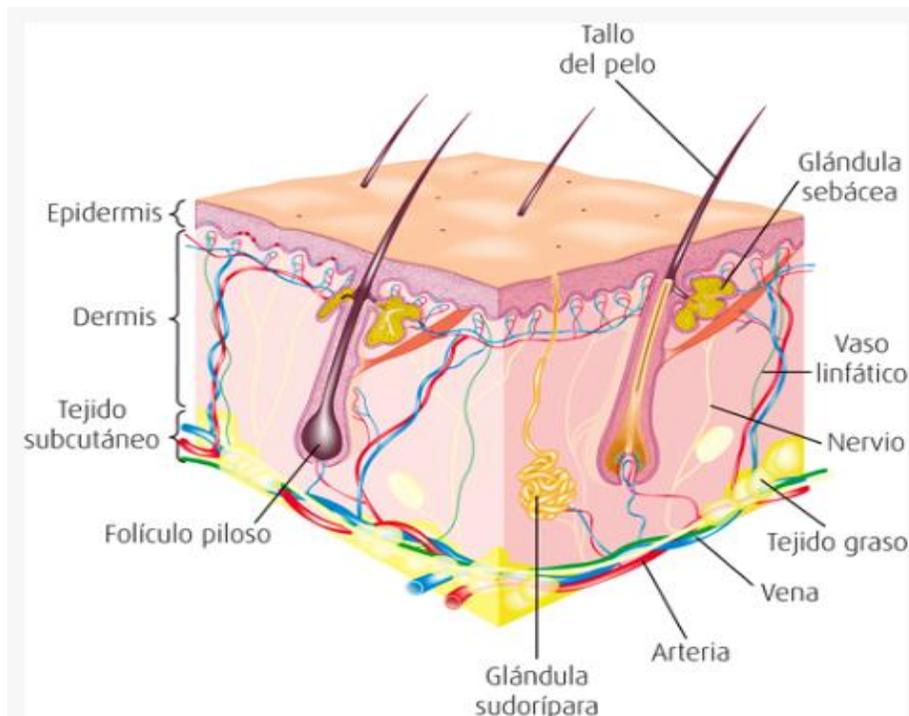
## INTRODUCCIÓN

### Sistema tegumentario

El sistema tegumentario es esencial para el cuerpo, ya que representa la primera barrera de protección contra agentes invasores externos. Está formado por la piel y unas estructuras anexas llamadas faneras, como el pelo, las uñas, las glándulas sudoríparas y sebáceas [1].

### Estructura y función de la piel

La piel es un órgano de gran tamaño, el mayor del organismo, ya que tiene una superficie de alrededor de 2 m<sup>2</sup> (depende de la altura y peso de la persona) y un peso de 4 kg, lo que supone aproximadamente el 6% del peso corporal total. Desde afuera hacia dentro, se distinguen tres capas de tejido, cuyo origen embriológico es doble: se desarrolla a partir del ectodermo, que da nacimiento a la capa superficial llamada epidermis, y del mesodermo, del que se forma la dermis, capa profunda y gruesa, compuesta por tejido conectivo y fibras colágenas ver figura 1.



**Figura 1. Estructura de la piel.** Esquema que muestra las diferentes capas de la piel, epidermis, dermis y el tejido subcutáneo y sus anexos [1].

La epidermis es la capa más superficial de la piel, está constituida por grupos o hileras de células formando un epitelio estratificado y limitando con la dermis mediante una membrana basal a la cual se encuentra firmemente adherida. La epidermis a su vez se divide en cinco capas conocidas como estratos:

**Basal:** El estrato basal o germinativo es una capa de una célula de espesor, fundamentalmente formada por queratinocitos, que se encuentra en la parte más interna de la epidermis. En el estrato basal se encuentran las células troncales (células madre adultas) de los queratinocitos, que dan lugar a los queratinocitos de la epidermis interfolicular. Las células troncales tienen una forma de redondeada a columnar, con un tamaño de unas 6 a 10  $\mu\text{m}$ . Son más basófilos que el resto de células epidérmicas debido a su alto contenido en ribosomas. Poseen numerosos filamentos intermedios y melanosomas, orgánulos con melanina, en torno al núcleo. En esta capa inferior que tiene células basales en forma de columna que dividen y empujan las células más viejas hacia la superficie de la piel. A medida que las células se mueven hacia la superficie a través de la piel, se aplanan y finalmente mueren y se desprenden.

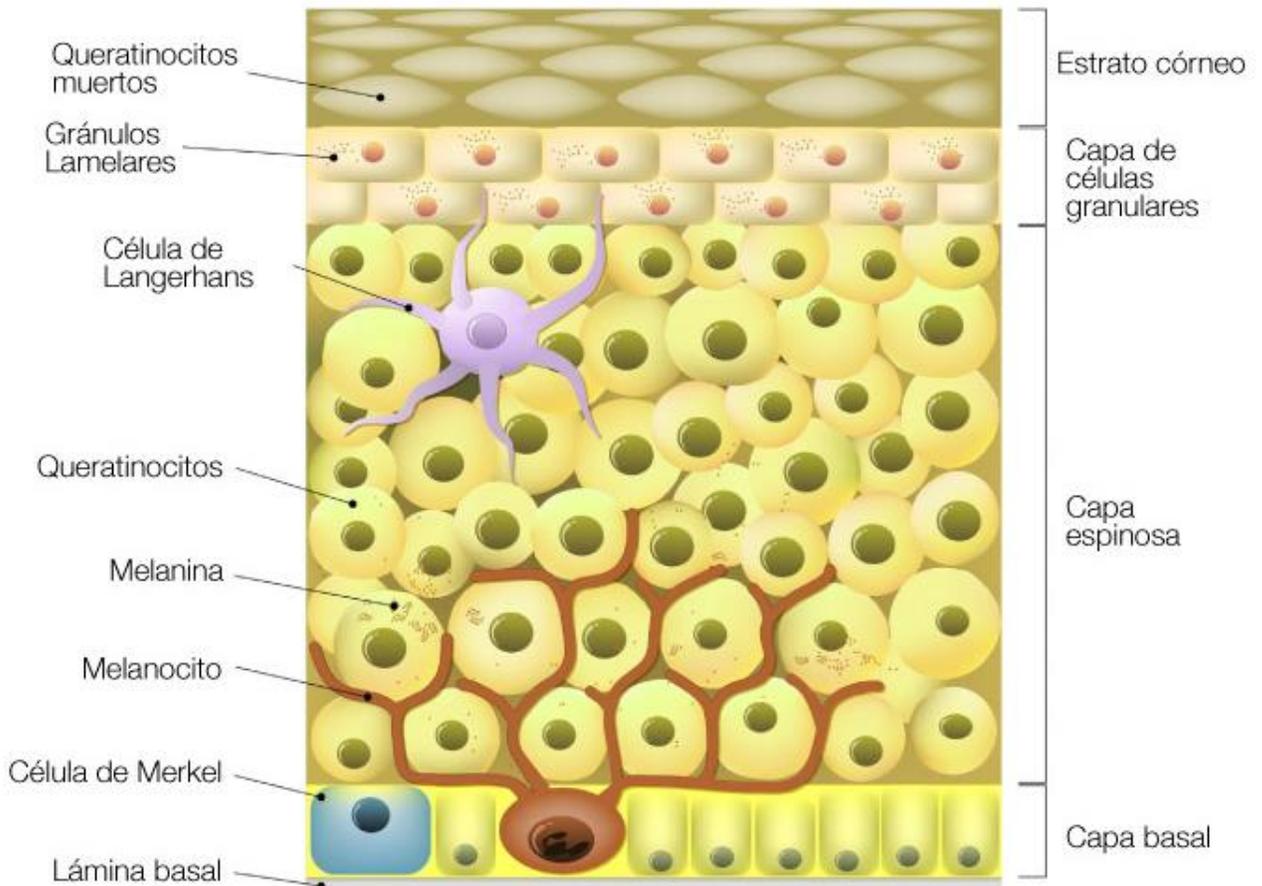
**Espinoso:** También conocida como capa de células escamosas, es la capa más gruesa de la epidermis. Contiene queratinocitos recién formados que son proteínas de fortalecimiento. Además, contiene células de Langerhans que ayudan a prevenir infecciones. Este estrato está formado por queratinocitos con aspecto más o menos poliédrico y de unas 10 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, más grandes que los del estrato basal, con un citoplasma más eosinófilo y con uno o dos nucléolos muy patentes.

**Granuloso:** Es las capas más superficiales del estrato espinoso los queratinocitos cambian su expresión génica y empiezan a sintetizar gránulos de querato-hialina, formándose el estrato granuloso. Este estrato es relativamente delgado, de unas 15  $\mu\text{m}$ , y con queratinocitos muy aplanados con numerosos gránulos de querato-hialina.

**Lúcido:** Esta capa contiene células que están densamente comprimidas, aplanadas y no pueden distinguirse unas de otras, y solo existe en las palmas de las manos y las plantas de los pies. Los queratinocitos del estrato lúcido son diáfanos y se encuentran agrupados. Carecen de núcleo y el citoplasma está lleno de una sustancia gelatinosa, la eleidina, que se transformará en queratina.

**Córneo:** capa más externa o superior de la epidermis. Está compuesta de queratinocitos muertos y planos que se desprenden aproximadamente cada dos semanas. Está formado por los queratinocitos degenerados que algunos autores denominan corneocitos. El grosor del estrato córneo depende del grosor general de la epidermis, de manera que cuantos más queratinocitos se produzcan más grueso será el estrato córneo ver figura 2 [2].

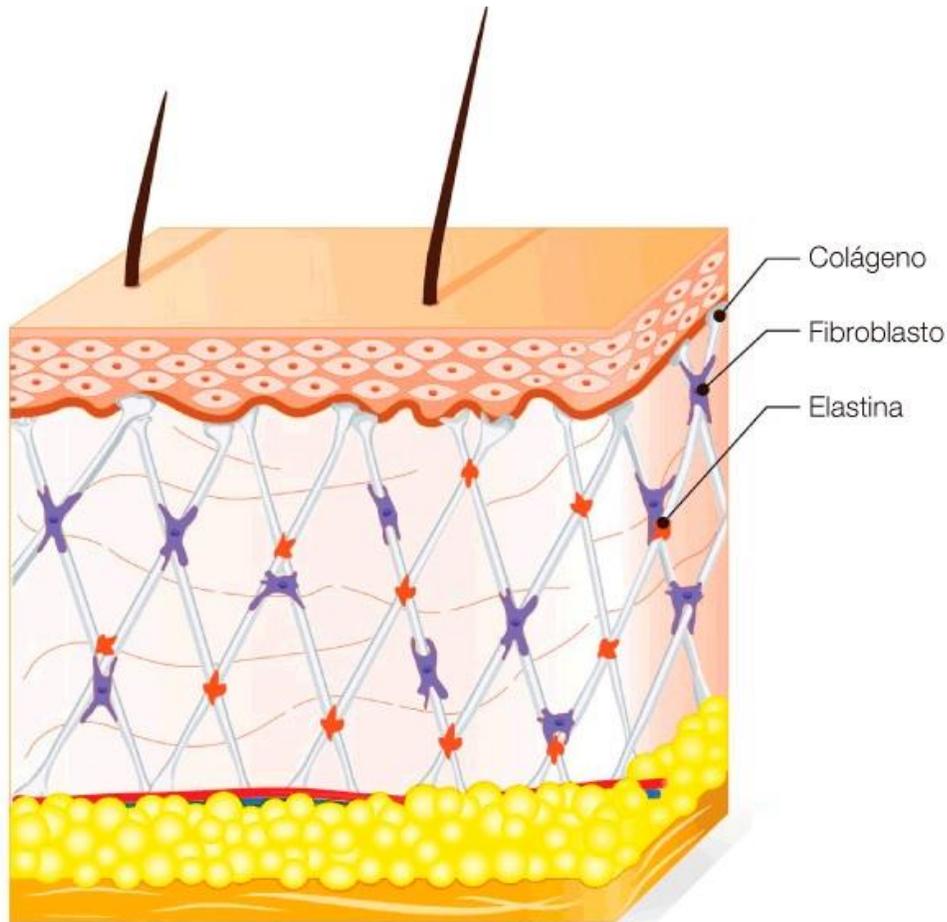
Existen cuatro bloques celulares, los cuales son: los queratinocitos, los melanocitos, las células de Merkel y las células de Langerhans. Los queratinocitos forman la cubierta protectora de la epidermis, se denominan así porque fabrican una proteína llamada queratina, que es impermeable al agua y protege la piel y los tejidos de las agresiones y abrasiones externas. Los melanocitos son de origen nervioso, poseen prolongaciones dendríticas que se sitúan en la capa más profunda de la epidermis, se denominan así porque fabrican un pigmento denominado melanina. Las células de Merkel son células que actúan como receptores del tacto y se sitúan en las capas basales de la epidermis. Y las células de Langerhans son células procedentes de la médula ósea que migran hasta la epidermis, tienen una función fagocitaria y se dice que son también presentadoras de antígenos a los linfocitos participando en reacciones de hipersensibilidad. Se sitúan habitualmente en las capas espinosas, granulosas y basales, ver figura 2 [3].



**Figura 2. Estructura de la Epidermis.** Se pueden observar los diferentes estratos de la epidermis, así como las células que la forman [4].

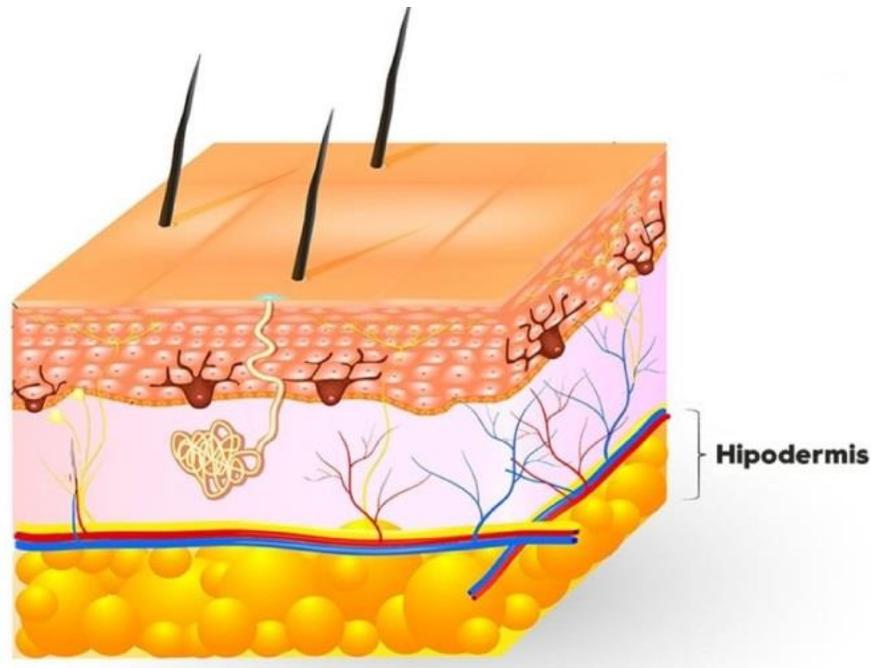
La dermis, o corión, es el tejido conectivo de la piel, sirve de límite dermoepidérmico y su superficie alcanza hasta el tejido celular subcutáneo. Se

encuentra estructurado por el tejido conjuntivo laxo (fibras de colágeno y fibras elásticas) el cual está inmerso en una sustancia amorfa. Así mismo, se encuentran los folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas. Su grosor depende específicamente de la parte del cuerpo que recubre, pero su tamaño promedio es de 1-2 mm y es de 15-40 veces más gruesa que la epidermis, ver figura 3 [5].



**Figura 3. Estructura de la Dermis.** Se puede observar la estructura de la dermis y las fibras de colágeno y elastina que la componen [4].

Y finalmente, la hipodermis se encuentra ubicada por debajo de la dermis, sus principales células son los adipocitos y se encuentran organizados en lóbulos definidos por tabiques de fibras de colágeno [6]. A su vez, la hipodermis se une a los tejidos y órganos subyacentes. Los límites entre la parte epitelial y la parte conjuntiva se ven claramente, en cambio los elementos fibrosos de la dermis se entremezclan con los de la hipodermis y no hay una separación clara, ver figura 4 [7].



**Figura 4. Estructura de la Hipodermis.** Se puede observar la estructura de la hipodermis y el tejido adiposo que es su principal constituyente [4].

#### **Células dérmicas y epidérmicas de interés en la reparación de heridas:**

**Queratinocitos:** son las células que forman la mayor parte de la epidermis, en humanos representan en torno al 95 % de las células epidérmicas. Tienen un origen ectodérmico y se organizan formando un epitelio estratificado plano queratinizado, aunque también forman los folículos pilosos. Son células que liberan muy poca matriz extracelular por lo que las membranas celulares de queratinocitos adyacentes suelen estar muy próximas [2].

**Morfología:** La morfología de los queratinocitos no es constante a lo largo de su vida, que es nucleado y viable desde la capa basal hasta la capa granular. Los queratinocitos sintetizan y expresan diversas proteínas y lípidos estructurales durante su maduración. Los pasos finales en la diferenciación de queratinocitos están asociados con cambios profundos en su estructura, lo que resulta en una transformación en células escamosas planas y anucleadas del estrato córneo, actuando principalmente con filamentos de queratina y rodeados por una envoltura celular compuesta de proteínas reticuladas (envoltura cornificada proteínas), así como una envoltura lipídica unida covalentemente. Además, los desmosomas, que interconectan los queratinocitos adyacentes, son importantes para la cohesión célula-célula en las capas nucleadas y se desprenden durante el proceso de descamación [8].

Constituyen la epidermis estratificada y el estrato córneo. Los queratinocitos crecen y se estratifican para formar una capa epitelial continua sobre la superficie de las membranas dérmicas [9].

Funciones: Las principales funciones de los queratinocitos son las de actuar como una barrera frente a la desecación y patógenos, participan en la reparación de heridas. La capa más externa de la epidermis, el estrato córneo, proporciona una barrera de permeabilidad que evita la desecación. El espacio intercelular del estrato córneo está compuesto por una mezcla única de lípidos. Su función es contrarrestar la pérdida de agua y sales de la piel y la penetración de sustancias solubles en agua; Por lo tanto, son importantes en la función protectora de la piel [10, 11].

Además de los queratinocitos, se pueden encontrar otros tipos de células importantes en la epidermis como poblaciones residentes o en respuesta a condiciones transitorias: células de Langerhans, células de Merkel, melanocitos y linfocitos [12].

Las células de Langerhans son elementos inmunocompetentes derivados de la médula ósea cruciales para la barrera inmune de la epidermis y participan principalmente en la dermatitis alérgica de contacto [13]. Las células de Merkel forman parte del componente nervioso sensorial de la piel. Los melanocitos se originan en la cresta neural y se encuentran en la capa basal de la epidermis. Producen los gránulos de pigmento llamados melanosomas que contienen melanina. Los melanocitos tienen la función importante de proteger la piel de la radiación ultravioleta y darle a la piel su color [14, 15].

Fibroblastos: Son el tipo celular más abundante dentro de todos los tejidos conectivos del cuerpo, y su función principal es la secreción de los componentes de la matriz extracelular (MEC). En el caso de la piel, la capa de queratinocitos epidérmicos está apuntalada y conectada íntimamente a la dermis, que contiene los fibroblastos dérmicos, así como las células inmunes, los vasos sanguíneos, las fibras nerviosas, los folículos capilares y las glándulas secretoras [16].

Este tipo celular presenta morfología muy variable en forma y tamaño dependiendo del órgano donde se encuentren y su estado de actividad. En general, son células fusiformes o estrelladas con prolongaciones citoplasmáticas que pueden ser relativamente cortas y anchas, o bien largas, delgadas y muy ramificadas. En este último caso, los fibroblastos pueden estar en contacto unos con otros por uniones tipo nexo o por contactos físicos simples [17].

Los fibroblastos desempeñan multitud de funciones. La primera y más conocida es la capacidad de sintetizar y mantener todos los precursores de los componentes de la matriz extracelular, tanto fibras de colágeno, reticulares y elásticas, como la sustancia fundamental: glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas. En adultos contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de la piel. Otra función característica está relacionada con la organización estructural del tejido al que pertenece [18, 19].

## **Matriz extracelular de las células epidérmicas**

La matriz extracelular (MEC) es una red estructural compleja e intrincada que rodea y sostiene las células del tejido conjuntivo. Contiene fibras de colágeno y elásticas que se componen de proteínas estructurales específicas. Dicha matriz contiene proteoglicanos, glucoproteínas como la fibronectina y glucosaminoglicanos [20]. Así pues, las células intervienen en la formación de la MEC y, a su vez, reciben información acerca de su microambiente a través de uniones de la membrana plasmática a la matriz. Por lo tanto, la matriz además de dar soporte a las células, ejerce un efecto determinante sobre diversas funciones celulares como la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte celular [21].

Específicamente las células dérmicas y epidérmicas secretan diferentes proteínas como MEC, las cuales se describen a continuación:

**Queratinocitos:** Las queratinas son las principales proteínas estructurales sintetizadas por los queratinocitos. Se ensamblan en un patrón similar a una red de filamentos intermedios que emanan de un anillo perinuclear, se extienden por todo el citoplasma y terminan en desmosomas y hemidesmosomas de unión. Durante las etapas finales de la diferenciación normal, las queratinas se alinean en matrices altamente ordenadas y condensadas a través de interacciones con filagrina, una proteína matriz sintetizada como profilagrina en los gránulos de queratohialina de la capa granular. La filagrina agrega los filamentos de queratina en haces apretados. Esto promueve el colapso de la célula en una forma aplanada, que es característica de los corneocitos en el estrato córneo. Juntas, las queratinas y la filagrina constituyen del 80% al 90% de la masa proteica de la epidermis de los mamíferos [22, 23]. Otras proteínas estructurales, como involucrina, loricrina y queratolinina, están contenidas en la célula de la capa espinosa superior. La clase de pequeñas proteínas ricas en prolina se sintetiza y posteriormente se retícula mediante transglutaminasas para reforzar la envoltura cornificada debajo de la membrana plasmática [8, 23].

**Fibroblastos:** Se encargan de sintetizar y mantener todos los precursores de los componentes de la MEC, tanto fibras de colágeno, reticulares y elásticas, como la sustancia fundamental: glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas [17, 19].

### **Cicatrización de heridas: Proceso normal y en personas diabéticas.**

La cicatrización de heridas es un proceso biológico dinámico y complejo que se puede dividir en cuatro fases que se solapan parcialmente: hemostasia, inflamación, proliferación y migración y remodelación. Estas fases implican un gran número de tipos de células, componentes extracelulares, factores de crecimiento y citocinas ver figura 5 [24].

## **Hemostasia**

La primera etapa del proceso de reparación celular implica la activación plaquetaria, la agregación y la adhesión al endotelio dañado para mantener la hemostasia, un fenómeno conocido como coagulación. Una vez que se inicia este proceso, el fibrinógeno se convierte en fibrina, formando el trombo y la MEC. Ver figura 5a. También participan otras células como las plaquetas activadas, los neutrófilos y los monocitos que liberan algunas proteínas y diversos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [25]. En comparación con sujetos normales, la hipercoagulabilidad y una disminución de la fibrinólisis son algunos de los cambios en la fase de hemostasia que se han observado en pacientes con DM [26].

## **Inflamación**

Se produce un proceso inflamatorio cuando se produce una lesión tisular, siendo los neutrófilos, los macrófagos y los mastocitos los responsables de producir citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y varios factores de crecimiento como PDGF, EGF, IGF, que son fundamentales en el proceso de reparación de heridas [27, 28]. En las personas con DM, existe un desequilibrio de estas citocinas que se liberan de forma no secuencial [29]. Esto lleva a una modificación de la reparación de heridas. Los neutrófilos son células que presentan un patrón de liberación de citocinas alterado y muestran una disminución en su funcionalidad y, por lo tanto, contribuyen a la susceptibilidad a infecciones de heridas [30].

## **Proliferación y migración**

Cuando la inflamación disminuye, varios procesos comienzan en el sitio de la lesión: se produce la contracción de la herida, se produce angiogénesis para restablecer el suministro de oxígeno y se forman proteínas de la MEC, incluidos colágenos, fibronectina y vitronectina, que son necesarios para el movimiento celular, además de la migración de los queratinocitos. Todos estos procesos son necesarios para que el tejido recupere su integridad y funcionalidad [31].

Debido a la hiperglucemia, la migración de fibroblastos y queratinocitos disminuye en pacientes con DM, así como su capacidad proliferativa. La migración celular anormal provoca una reepitelización deficiente de la herida diabética, que afecta el proceso de curación, ver figura 5b [25, 32]. Además, en pacientes con DM, también se ha informado una disminución en la angiogénesis y, por lo tanto, una disminución en el flujo sanguíneo [33].

## **Remodelación**

Esta fase comienza aproximadamente una semana después de la cicatrización de la herida y puede durar más de 6 meses. Aquí, el colágeno que se sintetiza es mayor que el que se degrada y reemplaza la MEC provisional que inicialmente se formó por la fibrina y la fibronectina. Este tejido de granulación se convierte en tejido cicatricial maduro y también aumenta la resistencia de la herida, y esto termina en la formación de una cicatriz [34].

Los fibroblastos de pacientes con DM están alterados en su función, lo que contribuye al cierre defectuoso de la herida; aunque el mecanismo no se conoce bien, se cree que se debe al hecho de que no responden a la acción del TGF- $\beta$  y también a la producción aberrante de la MEC [35].

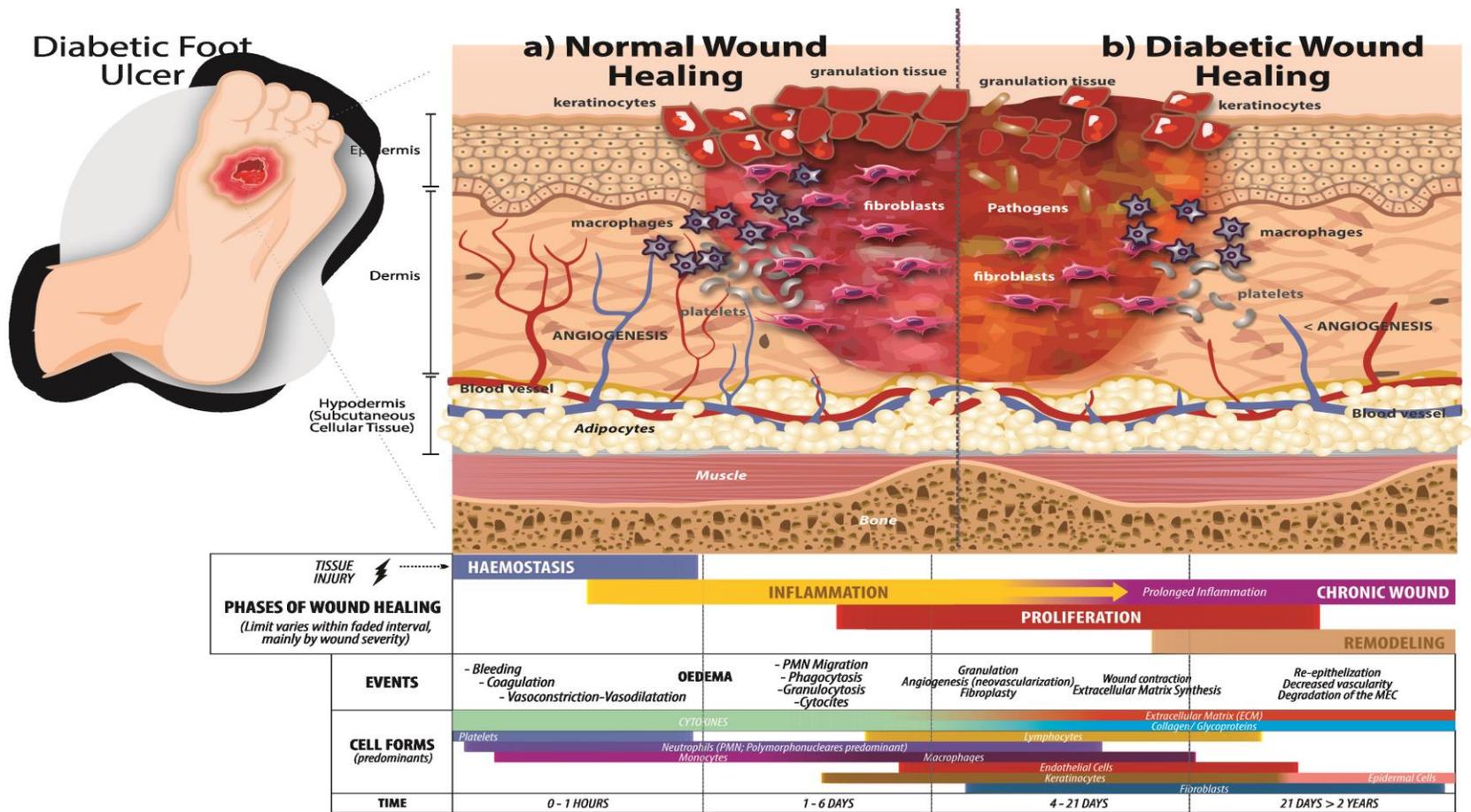


Figura 5. Esquemización de una herida. 5a. Cicatrización de una herida normal. 5b. Cicatrización de una herida diabética [36].

## **Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico crónico del sistema endocrino caracterizado por el aumento de hiperglucemia, esto debido a una deficiencia en la secreción de la insulina o resistencia a la insulina [37, 38].

### **Epidemiología**

La Federación Internacional de la Diabetes (IDF) reportó que para el año 2017 había 425 millones de personas en el mundo con DM, lo que equivale a una prevalencia de 8.8% en personas de 20 - 79 años [39]. La prevalencia de la enfermedad a nivel mundial va en aumento, algunas cifras estiman que para el año 2035 aproximadamente un total de 471 millones de individuos la padecerán [37]. En México la prevalencia de la enfermedad según cifras de ENSANUT 2016 se incrementó del 9.2% en el año 2012 a 9.4% para el año 2016 [40]. Mientras que en el estado de Zacatecas la prevalencia se incrementó de 7% en el año 2006 a 9.4% en el año 2012. En el año 2017 la Secretaría de Salud de Zacatecas contaba con 21,160 pacientes diagnosticados con DM de los cuales el 70.9% correspondía al sexo femenino y 29.1% al sexo masculino [41]. La IDF calculó que en el 2017 la DM causó la muerte de 4 millones de personas de una edad entre 20 y 79 años, mientras que la Organización Mundial de la Salud reporta para el año 2015 que la DM fue la causa directa de 1.6 millones de muertes y 2.2 millones de muertes se le atribuyen a la hiperglucemia en el año 2012. En México las cifras de mortalidad la reportan como la segunda causa de mortalidad con el 15.4% de muertes en el año 2016 [42].

### **Costos de la DM y sus complicaciones**

El costo por esta enfermedad en los Estados Unidos de América se estimó en 174 billones de dólares totales en el año 2007, repartiéndose en 116 billones en costos directos y 58 billones en costos indirectos [43]. Mientras que en México la carga económica de la DM en el 2013 fue de 362,860 millones de pesos, lo cual representa cerca de 2.25% del PIB. Los costos directos de la enfermedad se estimaron en 179,495 millones de pesos de los cuales el 87% se destina a las principales complicaciones de la DM [44].

### **Clasificación de la DM**

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) incluye 4 casos clínicos diferentes:

La DM tipo I, diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) es el resultado de la destrucción de las células  $\beta$ , por lo general lleva a la deficiencia absoluta de insulina [45]. La primera subclase de la DM por lo general se caracteriza clínicamente por la aparición repentina de los síntomas, insulinopenia y la dependencia de la insulina inyectada para mantener la vida, este tipo de

enfermedad se produce en los jóvenes, por lo que se le llamaba antiguamente DM juvenil [46].

La DM tipo 2, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, por sus siglas en inglés non-insulin-dependent diabetes), resultado de un defecto progresivo de la secreción de insulina progresiva en el fondo de resistencia a la insulina [45]. Este tipo es la más común comprende alrededor del 85% de los casos [46].

La diabetes mellitus gestacional (DMG) (diabetes diagnosticada durante el embarazo) es un tipo de diabetes que suele afectar a las mujeres embarazadas durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, aunque puede darse en cualquier momento del mismo [39].

Otros tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, los defectos genéticos en la función de las células  $\beta$ , defectos genéticos en la acción de insulina, enfermedades exocrinas del páncreas (por ejemplo, fibrosis quística), y fármacos o toxicidad química (como en el inducido por productos químicos para el tratamiento del VIH / SIDA o después de un trasplante de órganos) [46].

### **Diagnóstico de la DM**

Durante décadas, el diagnóstico de la DM se basa en criterios de glucosa en plasma, ya sea el nivel de glucosa en plasma en ayunas (FPG, por sus siglas en inglés fasting plasma glucose) o el valor de la prueba de tolerancia oral a la glucosa 75 g en 2 h (OGTT). Sin embargo en el 2009 un comité internacional de expertos que incluía representantes de la ADA, de la Federación Internacional de la Diabetes (IDF), y de la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD) recomendaron el uso de la prueba de A1C (hemoglobina glucosilada) para el diagnóstico de la DM, y la ADA adoptaron este criterio en 2010 [47].

Actualmente se acepta cualquiera de los criterios descritos a continuación para establecer el diagnóstico para la DM tipo 1, 2 y DM producida por otras causas:

A1C (hemoglobina glucosilada)  $\geq$  6.5%. El examen puede realizarse en un laboratorio usando un método certificado de los NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) y estandarizado para el ensayo DCCT (Diabetes Control and Complications Trial).

FPG (glucosa en plasma en ayunas  $\geq$  126 mg / dl (7.0 mmol / l). El ayuno se define como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 h.

Glucosa en plasma de 2 h  $\geq$  200 mg / dl (11.1 mmol / l) durante un OGTT. La prueba debe realizarse según lo descrito por la Organización Mundial de la Salud, utilizando una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.

En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o una crisis de hiperglucemia, una glucosa plasmática al azar  $\geq 200$  mg / dl (11.1 mmol / l) [45-47].

Mientras que para establecer el diagnóstico de DMG dos o más de los siguientes valores después de una carga oral de glucosa de 100 g se deben cumplir o superar:

Prueba rápida: plasma venoso 105 mg/dl (5.8 mmol/L), sangre venosa total 90 mg/dl (5.0 mmol/L), sangre capilar total 90 mg/dl (5.0 mmol/L).

OGTT 1 hora: plasma venoso 190 mg/dl (10.6 mmol/L), sangre venosa total 170 mg/dl (9.5 mmol/L), sangre capilar total 170 mg/dl (9.5 mmol/L).

OGTT 2 horas: plasma venoso 165 mg/dl (9.2 mmol/L), sangre venosa total 145 mg/dl (8.1 mmol/L), sangre capilar total 145 mg/dl (8.1 mmol/L) [45].

### **Complicaciones de la DM**

La DM es una enfermedad sistémica que afecta a varios órganos y sistemas del cuerpo, las complicaciones más importantes son las siguientes:

#### **Nefropatía**

La nefropatía diabética (ND), es una complicación crónica de la diabetes, se caracteriza por la hipertrofia glomerular, proteinuria, disminución de la filtración glomerular y la fibrosis renal dando como resultado la pérdida de la función renal [48]. Las complicaciones microvasculares de la diabetes, como la nefropatía diabética pueden desempeñar un papel significativo en la mortalidad de la diabetes. La DN como una enfermedad renal progresiva afecta a casi 35% de los pacientes diabéticos [49]. La nefropatía diabética es la causa principal de la enfermedad renal crónica en todo el mundo [50].

#### **Retinopatía**

Es consecuencia del daño a los vasos sanguíneos de la retina. Inicialmente se manifiesta como micro aneurismas oculares y pequeñas hemorragias (fase no proliferativa), para posteriormente presentarse un daño más severo que genera pérdida de visión (fase proliferativa) y puede desembocar en ceguera. Otros problemas, como el edema de mácula pueden presentarse en ambas fases y asociarse a otros trastornos tales como glaucoma, cataratas y desprendimiento de retina [46].

La retinopatía diabética es la primera causa de ceguera en pacientes diabéticos entre los 30 y los 69 años de edad. Su incidencia aumenta considerablemente con la edad. Se estima que casi el 100% de los diabéticos de más de 30 años de evolución muestran algún signo de retinopatía [51].

## **Neuropatía**

Las neuropatías periféricas son las lesiones del sistema nervioso periférico que se pueden dividir en mono-neuropatías multifocales, neuropatías, y polineuropatías. Los síntomas generalmente incluyen entumecimiento y parestesia. Estos síntomas suelen ir acompañados de debilidad y pueden ser dolorosos [52]. La neuropatía periférica es la forma más común de neuropatía diabética y afecta a los nervios distales de las extremidades, particularmente los de los pies. Además la neuropatía puede conducir a la disfunción eréctil, así como a desarrollar problemas digestivos y urinarios, y otros problemas como la disfunción autonómica cardíaca [39]. La Neuropatía Diabética Periférica (NDP) se presenta en más del 50% de las personas que padecen diabetes y es un factor de riesgo importante de daños en la piel, amputación y la reducción de la movilidad física [53]. Se estima que cerca del 40 a 60% de los pacientes con NDP van a desarrollar neuropatía diabética dolorosa (NDD) en sus extremidades inferiores. Al igual que en otros estados de dolor neuropático, la NDD parece progresar y es a menudo reportada por debajo de los datos reales y difícil de diagnosticar y tratar [54].

## **Síndrome del pie diabético (PD)**

Es la complicación más frecuente de la DM a nivel de las extremidades inferiores. Asimismo, es la complicación tardía más incapacitante de la enfermedad. La Organización Mundial de la Salud lo define como aquel síndrome en el que confluyen complicaciones de diversa etiología: neuropática, vascular e infecciosa derivadas de la DM y que predisponen al padecimiento de úlceras.

Se estima que aproximadamente el 15% - 25% de los pacientes diabéticos de todo el mundo presentarán al menos una úlcera plantar a lo largo del padecimiento de su enfermedad, calculándose una incidencia anual del 2.4 - 2.6%, con una prevalencia del 4 - 10% [55]. Aproximadamente el 85% de las amputaciones a pacientes diabéticos son precedidas por una úlcera plantar [56]. Es importante recordar que las tasas de recurrencia de las úlceras del pie son muy altas, siendo superior al 50% después de 3 años [57].

Con respecto a la etiología de la ulceración del pie, tradicionalmente se afirma que 45% a 60% son puramente neuropáticas, aproximadamente el 10% puramente isquémica, y del 25% al 45% de origen neuroisquémica. Sin embargo en un estudio más reciente se encontró un ligero aumento en la incidencia de la neuroisquémica (52,3%) y las úlceras isquémicas (11,7%) del pie con una reducción en las úlceras neuropáticas (36%) [56].

## **Costos por complicaciones del PD**

Los gastos promedios de hospitalización en pacientes con complicaciones del PD son: úlceras en los pies, \$ 16,580 dólares; dedo del pie y otras amputaciones distales, \$ 25,241 dólares; amputaciones mayores, \$ 31,436.33 dólares. El costo promedio para un episodio de úlcera del PD se ha estimado en 28,000 dólares

durante un período de 2 años [56]. En Estados Unidos de América en el 2008 se reportó que 18 millones de dólares se gastan en el cuidado de las úlceras del PD y 11.7 millones de dólares en amputaciones de extremidades inferiores [58]. En México las estimaciones existentes son muy variables con cálculos de costos de atención por paciente que van desde 700 hasta 3,200 dólares anuales, lo que se traduce en 5 a 14% del gasto en salud destinado a la atención de la DM y sus complicaciones [59].

### **Fisiopatología del PD**

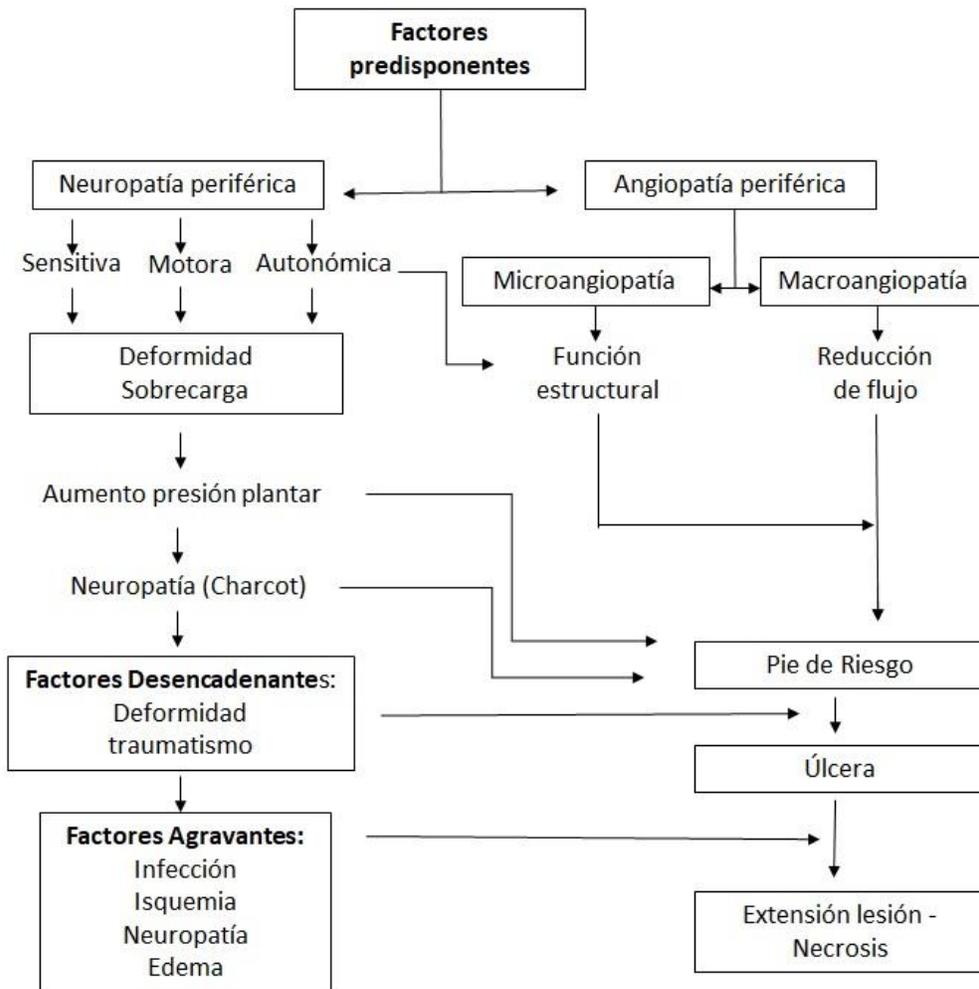
La DM provoca alteración de la cicatrización de la herida al afectar uno o más mecanismos biológicos de estos procesos. Muy a menudo, se desencadena por la hiperglucemia, la inflamación crónica, micro y macro-disfunción circulatoria, la hipoxia, la neuropatía autonómica y sensorial, y alteración de la señalización de neuropéptidos [24].

Las úlceras del PD rara vez son el resultado de un solo factor patológico; por lo general requieren de un gran número de posibles factores contribuyentes que podrían resultar en la ruptura del pie. El desarrollo del PD se considera tradicionalmente como resultado de una interacción entre la insuficiencia vascular periférica, polineuropatía simétrica distal, y la infección, ver figura 6 [60].

**Insuficiencia vascular periférica (IVP):** La IVP en la DM afecta vasos sanguíneos pequeños y grandes. La macroangiopatía de la DM no es muy diferente a la de enfermos no diabéticos. Los cambios en las capas media e íntima de la pared del vaso se generan, en ambos casos, por depósitos de lípidos, colesterol y calcio, pero éstos se acumulan en mayor cantidad en los diabéticos. Además, son más extensos entre los pequeños vasos arteriales situados por debajo de la rodilla. La oclusión de estas pequeñas arterias explica la localización de las áreas de necrosis en los diabéticos. La angiopatía de vasos de mayor calibre no progresa al mismo tiempo que la de pequeños vasos. La microangiopatía de la piel (dermopatía) o granuloma anular localizado es un marcador de DM. Los procesos responsables de los cambios en los vasos cutáneos son la fragmentación de la capa basal, la laminación del material homogéneo y la aparición de tejido conectivo en la periferia de los vasos [61].

**Neuropatía:** La neuropatía diabética es un tipo de daño en los nervios que puede producirse si tienes diabetes. Un nivel alto de glucosa en sangre puede dañar los nervios en todo el cuerpo. La neuropatía diabética afecta, con mayor frecuencia, los nervios de las piernas y de los pies. Los investigadores creen que, con el tiempo, el nivel elevado de glucosa en la sangre sin controlar daña los nervios e interfiere con su capacidad para enviar señales, lo que genera la neuropatía diabética. El nivel elevado de glucosa en la sangre también debilita las paredes de los pequeños vasos sanguíneos (capilares), que les proporcionan oxígeno y nutrientes a los nervios. La afectación motora atrofia la musculatura intrínseca del pie a nivel cutáneo y subcutáneo, y debido a la glucosilación no enzimática de las proteínas del colágeno, las fibras se engrosan y aumentan su entrecruzamiento,

dando lugar a una piel gruesa y firme, y a una restricción en la movilidad articular [62].



**Figura 6. Posible vía de la ulceración en el pie diabético.** En la imagen se esquematiza la relación de los factores predisponentes, desencadenantes y los factores agravantes para que exista el desarrollo de una úlcera plantar. Modificado de [62].

**Infección:** Una infección de la herida es el resultado de una invasión microbiana en el tejido en cantidades adecuadas para provocar una respuesta del huésped, lo que resultará en una curación de la herida deteriorada [63]. Los principales factores predisponentes para su desarrollo son la macroangiopatía, la microangiopatía y los trastornos hemorrágicos, la neuropatía periférica y la respuesta inmunológica alterada del paciente diabético [64]. El nivel elevado de azúcar en la sangre, como se observa con la diabetes, incluso a corto plazo, puede alterar significativamente la función inmune innata, lo que aumenta la susceptibilidad. Mantener una herida en el pie es el principal factor de riesgo para el desarrollo de una infección del pie diabético [63]. Además, factores del huésped como la edad, la inmunosupresión, la medicación y las enfermedades concomitantes también pueden influir [65]. Aunque de una forma secundaria, la infección es determinante en el desarrollo de la úlcera, y adquiere un papel relevante en el mantenimiento de la misma. Las úlceras neuropáticas y neuroisquémicas suelen estar sobreinfectadas por microorganismos diversos, los principales Aerobios gram positivos (+): *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium species*, *Streptococcus group B*, *Streptococcus group A*. Gram negativos (-): *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus species*, *Acinetobacter species*, *Klebsiella species*, *Morganella species*. Anaerobios: *Peptostreptococcus magnus*, *Bacteroides species*, *Propionibacterium species*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Clostridium species*, *Bacteroides fragilis* [62, 64, 65]. Micóticas por candidiasis, dermatofitosis, cromoblastomycosis b [62].

## Úlceras

La úlcera de pie diabético (DFU) es una complicación generada a partir de la DM y se caracteriza por lesiones profundas en la piel y tejidos [66]. Dicha complicación tiene un 15-25% de riesgo de ser desarrollada en los pacientes con DM y aunque no es un indicador severo de ablación, el 80% de las personas con úlceras presentan infección, lo cual es el principal motivo de amputación de la extremidad [67].

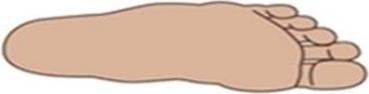
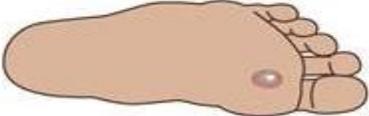
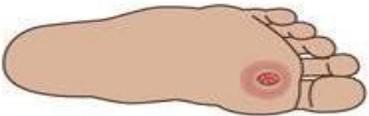
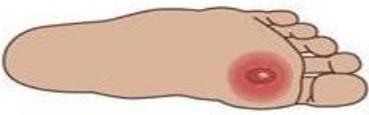
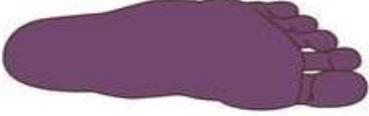
Las úlceras se forman debido a una combinación de factores, como la falta de sensibilidad en el pie, la mala circulación, deformaciones en el pie, irritación (a causa de fricción o presión) y traumatismos, así como también el tiempo que lleva padeciendo DM. También se presenta neuropatía, la disminución o pérdida total de la sensibilidad en los pies como consecuencia de un daño nervioso provocado por la hiperglucemia a lo largo de los años [68].

## Clasificación de úlceras

Las úlceras más frecuentes son las neuropáticas, entre un 45 y un 60% del total, las neuroisquémicas entre un 25 y un 45% y las puramente isquémicas entre un 10 y un 15%. Las causas para que se desarrolle una DFU son diversas, así como

también su forma de presentación y evolución clínica, por tanto, es importante contar con un sistema de clasificación de las lesiones del PD que estandarice las diversas definiciones, permita evaluar el curso clínico y los resultados de distintos tratamientos. Para ello se han propuesto diversas clasificaciones que son aceptadas, dentro de las cuales se incluye la de Wagner, Texas, PEDIS, la de San Elián. La clasificación de Wagner se basa en la profundidad, presencia de osteomielitis o gangrena y la extensión de la necrosis tisular, sin embargo, esta clasificación no toma en cuenta dos parámetros de importancia crítica como la isquemia y la infección (ver tabla 1). Es por eso que la clasificación más completa es la de San Elián que es un sistema diagnóstico-terapéutico que permite evaluar la evolución de las úlceras y el impacto del tratamiento de acuerdo a la gravedad de la herida. Se toman en cuenta 10 factores que contribuyen a la gravedad y progreso de curación de la herida del PD como se muestra en la tabla 2 [69].

**Tabla 1.** Clasificación de Wagner

Grado 0	Ausencia de úlcera. Pie en riesgo (deformidad, hiperqueratosis)	
Grado 1	Úlcera superficial	
Grado 2	Úlcera profunda que incluye tendón y cápsula articular	
Grado 3	Úlcera profunda con abscesos, osteomielitis o sepsis articular	
Grado 4	Gangrena localizada (antepié o talón)	
Grado 5	Gangrena extensa	

**Tabla 2.** Clasificación topográfica y grados de gravedad del pie diabético de San Elián [69].

Factores Anatómicos Topográficos	Localización o zona de la herida inicial	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Falángica o digital con o sin extensión al resto del pie.</li> <li>2. Metatarsal con o sin extensión al resto del pie.</li> <li>3. Tarsal en talón y medio pie, con o sin extensión a todo el pie.</li> </ol>
	Aspecto Topográfico	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dorsal o plantar</li> <li>2. Lateral</li> <li>3. Más de 2 aspectos</li> </ol>
	Nº de zonas afectadas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Una</li> <li>2. Dos</li> <li>3. Todo el pie (heridas múltiples)</li> </ol>
Factores agravantes	Isquemia (índice Tobillo/Brazo)	<ol style="list-style-type: none"> <li>0. No isquemia: 0.91 – 1.21</li> <li>1. Leve: 0.7 – 0.9</li> <li>2. Moderada: 0.51 – 0.69</li> <li>3. Grave o crítica: &lt; 0.5</li> </ol>
	Infección	<ol style="list-style-type: none"> <li>0. No infección</li> <li>1. Leve: Eritema &lt; 2cm, induración, calor, dolor y secreción purulenta.</li> <li>2. Moderada: Eritema &gt; 2cm. Afectación de músculo, tendón, hueso o articulación.</li> <li>3. Grave: Respuesta inflamatoria sistémica</li> </ol>
	Edema	<ol style="list-style-type: none"> <li>0. No edema</li> <li>1. Perilesional</li> <li>2. Sólo el pie y/o la extremidad afectada</li> <li>3. Bilateral secundario a enfermedad sistémica</li> </ol>
	Neuropatía	<ol style="list-style-type: none"> <li>0. No neuropatía</li> <li>1. Disminución de la sensibilidad protectora o vibratoria.</li> <li>2. Ausencia de la sensibilidad protectora o vibratoria.</li> <li>3. Neuro-osteopatía diabética (Artropatía de Charcot).</li> </ol>
Factores de afección tisular de la herida	Profundidad	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Superficial (Sólo piel)</li> <li>2. Úlcera profunda (Toda la dermis)</li> <li>3. Todas las capas (Incluye hueso y articulación)</li> </ol>
	Área en cm <sup>2</sup>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pequeña &lt; 10cm<sup>2</sup></li> <li>2. Mediana de 10 – 40cm<sup>2</sup></li> <li>3. Grande &gt; de 40cm<sup>2</sup></li> </ol>
	Fases de cicatrización	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Epitelización</li> <li>2. Granulación</li> <li>3. Inflamación</li> </ol>

Grado	Gravedad	Puntaje inicial	Pronóstico
I	Leve	<10	Probable curación exitosa de la herida
II	Moderado	11-20	Riesgo de pérdida del pie; la respuesta dependerá de la terapia utilizada y de la respuesta biológica del paciente
III	Severa	21-30	Condición con riesgo de pérdida de la extremidad y la vida, independientemente de la terapéutica empleada y la respuesta del paciente

## Tratamiento de las DFU

La intervención ideal para las complicaciones diabéticas de las extremidades inferiores debe ser la prevención. Hasta la fecha, la única intervención probada para detener o reducir todas las complicaciones relacionadas con la DM es el control estricto de la glucemia, como se informó en el ensayo “Diabetes Control and Complications” [70]. Las guías publicadas y documentos de consenso sobre el tratamiento de las DFU son consistentes y establecen que la atención más eficaz de DFU implica un enfoque integral y debe incluir el control óptimo de la DM, cuidado efectivo de la herida local, control de infecciones, las estrategias de alivio de la presión, y la optimización del flujo sanguíneo [71].

A pesar del apego a los principios de tratamiento anteriores, un estudio demostró que sólo el 24 por ciento de las úlceras sanaron después de 12 semanas y sólo el 31 por ciento de las úlceras sanaron después de 20 semanas [72].

Los principales procedimientos para el tratamiento de las DFU se pueden dividir en tres:

### 1.- No invasivo:

Incluye el control de la glucemia, medir la glucosa en la sangre es la principal manera que se tiene de asegurarse de controlar la diabetes. Esta medición permite conocer el nivel de glucosa en la sangre en cualquier momento, así como el control metabólico de los pacientes que incluye prestar atención a la alimentación y al nivel de ejercicio, de igual forma si el paciente usa insulina, debe cuidar cuánto usa y su horario de inyecciones.

### Presión negativa y terapia de oxígeno hiperbárico

Otras intervenciones avanzadas para promover la cicatrización de heridas incluyen la terapia con presión negativa sobre heridas (NWTP), también llamado cierre

asistido por vacío, y la terapia de oxígeno hiperbárico (HBOT). En el caso de la NWTP, se cree que la aplicación de presión negativa controlada a la superficie de una herida puede acelerar la curación mediante la reducción de edema, la eliminación de exudado, y mediante el aumento de la perfusión, la proliferación celular, y la formación de tejido de granulación [70].

## **2.- Invasivo:**

### **Desbridamiento**

El desbridamiento implica la eliminación de la epidermis de hiperqueratosis (callos), tejido dérmico necrótico, residuos extraños, y elementos de bacterias en el lecho de la herida; todos estos elementos inhiben la curación de heridas. El callo es conocido solo para actuar como un cuerpo extraño y aumentar la presión local; la eliminación de los callos y la promoción de la liberación de factores de crecimiento convierten un entorno de cicatrización de la herida crónica a un entorno de curación aguda [24].

### **Revascularización**

Para los pacientes con pérdida de tejido, el aumento de la gravedad de la isquemia se asocia con peores resultados, como la amputación y la muerte; en consecuencia, la restauración de la perfusión de la piel se considera que es un componente crítico del tratamiento. La revascularización se puede lograr por medios endovasculares con la angioplastia con balón y colocación de estent (endoprótesis vascular), o por técnicas de cirugía abierta, tales como endarterectomía y, a menudo un bypass alrededor del segmento enfermo del vaso [73].

## **3.- Medicina regenerativa**

Esta disciplina médica es la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería a los problemas de la biología celular y molecular tanto de naturaleza básica como aplicada para entender la relación estructura-función en los tejidos normales y patológicos de los mamíferos y desarrollar sustitutos biológicos para restaurar, mantener y mejorar sus funciones. Es decir, el uso de células vivas junto con componentes extracelulares para el desarrollo de partes o piezas que permitan restaurar o reemplazar la función del tejido [74].

### **Ingeniería de tejidos**

El término de ingeniería en tejidos tiene diferentes definiciones pero en un sentido amplio son métodos que, o bien promueven la reparación biológica o regeneración de tejidos u órganos, proporcionando la señalización, elementos estructurales o celulares (aparte de autoinjerto de tejido mínimamente manipulada), o sustituyen

el órgano o la función del tejido con los sistemas que contienen tejido vivo o células [75].

La ingeniería de órganos es una disciplina que integra el conocimiento biológico de desarrollo embriológico, la anatomía, la fisiología y las interacciones celulares con tecnologías de apoyo incluidos biomateriales biocompatibles y la biofabricación de plataformas tales como la bioimpresión tridimensional [76].

## **Biomateriales para la ingeniería de tejidos**

### **Características y funciones**

La selección de los materiales para aplicaciones de ingeniería de tejidos se basa en varios factores importantes, incluyendo la biocompatibilidad, degradabilidad, características de la superficie, capacidad de procesamiento, y propiedades mecánicas [77].

### **Hidrogeles**

Los hidrogeles son usados en ingeniería tisular y en el campo de los biomateriales debido a que estos contienen una alta funcionalidad con el sistema biológico, pues, gracias a su hidrofiliidad, el cual es un factor que determina su alta biocompatibilidad, genera un soporte en 3D mecánico alto y pueden proporcionar que las células en su interior tengan un entorno similar al de muchos tejidos naturales [78].

### **Tipos de biomateriales**

Existen una gran variedad de biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos algunos de los cuales se describen a continuación.

**Colágeno:** Es una de las proteínas más abundantes en la naturaleza y es el responsable de mantener la integridad estructural de los tejidos. En la piel están presentes principalmente los tipos de colágeno sintetizados por los fibroblastos y los miofibroblastos. Ha sido utilizado en el diseño de sustitutos de la piel. Los geles de colágeno hidratados presentan una alta ventaja en aplicaciones clínicas, dado que su alta producción de queratinocitos y fuerte anclaje permiten la producción de un área de superficie grande a ser injertada [79].

**Alginato:** Es un polisacárido natural que se deriva de las algas. Ha sido ampliamente usado en aplicaciones como medicina regenerativa debido a la facilidad de formar un hidrogel a través de un intercambio iónico instantáneo del calcio de sodio. Esto ha generado que el alginato sea un material de elección para hacer micro encapsulamientos de células [80].

**Fibrina:** Es un material de origen natural, compuesto por monómeros de fibrinógeno que se unen mediante entrecruzamiento químico. Los geles de fibrina

menos concentrados se han utilizado para aplicaciones de medicina regenerativa debido a su rápida reticulación y sus propiedades mecánicas robustas [78].

**Ácido hialurónico (HA):** Es un glucosaminoglucano (GAG) no sulfatado hidrófilo que consiste en unidades repetidas de disacáridos que está presente en tejidos como un componente importante de la MEC y ha mostrado un gran potencial en aplicaciones de la medicina regenerativa. El HA no modificado se ha utilizado en la clínica durante varias décadas, en aplicaciones tales como la terapia de alivio de la de las articulaciones dañadas y artritis. Sin embargo, mediante el empleo de la modificación química de HA, su facilidad de uso se ha extendido considerablemente, resultando en un biomaterial robusto que puede ser reticulado en un hidrogel o cargado con otros factores bioactivos [80].

### **Factores de crecimiento**

El término factor de crecimiento se utiliza para describir sustancias tales como proteínas, hormonas y neurotransmisores que tienen como función principal el estimular la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis, así como el mantener la supervivencia celular, estimular la migración celular, la comunicación intercelular, la diferenciación celular e incluso la apoptosis. La función de los factores de crecimiento está regulada por diferentes mecanismos que controlan la activación genética como:

- La transcripción y traducción del gen del factor de crecimiento.
- La modulación de emisión de señal por el receptor.
- El control de la respuesta celular por moléculas con acción opuesta a la respuesta inicial.
- Control extracelular por la disponibilidad del factor de crecimiento que es atrapado en la matriz extracelular [81].

Entre los factores de crecimiento más promisorios en la regeneración tisular se encuentran:

### **La familia de PDGFs**

La familia de PDGFs (por sus siglas en inglés *platelet derived growth factor*) es probablemente uno de los sistemas de factores de crecimiento mejor estudiados. La familia PDGF consta de cuatro miembros; los clásicos PDGF-A y PDGF-B, pero también los novedosos PDGF-C y PDGF-D.

PDGFA: Se encuentra ubicado en el cromosoma 7, con un tamaño promedio de 23,411 base y con un peso de 24043 Da. Juega un papel esencial en la regulación del desarrollo embrionario, la proliferación celular, la migración celular, la supervivencia y la quimiotaxis. Potencial mitógeno para células de origen mesenquimatoso. Se requiere para la formación normal del tabique alveolar pulmonar durante la embriogénesis, el desarrollo normal del tracto gastrointestinal, el desarrollo normal de las células de Leydig y la espermatogénesis. Requerido para el desarrollo normal de oligodendrocitos y la mielinización normal en la médula espinal y el cerebelo. Juega un papel importante en la curación de heridas [82].

PDGFB: Se encuentra ubicado en el cromosoma 22, con un tamaño promedio de 21,594 bases y con un peso de 27283 Da. Juega un papel esencial en la regulación del desarrollo embrionario, la proliferación celular, la migración celular, la supervivencia y la quimiotaxis. Mitógeno potente para células de origen mesenquimatoso. Se requiere para la proliferación y el reclutamiento normales de pericitos y células vasculares del músculo liso en el sistema nervioso central, la piel, los pulmones, el corazón y la placenta. Necesario para el desarrollo normal de los vasos sanguíneos y para el desarrollo normal de los glomérulos renales. Juega un papel importante en la curación de heridas [82, 83].

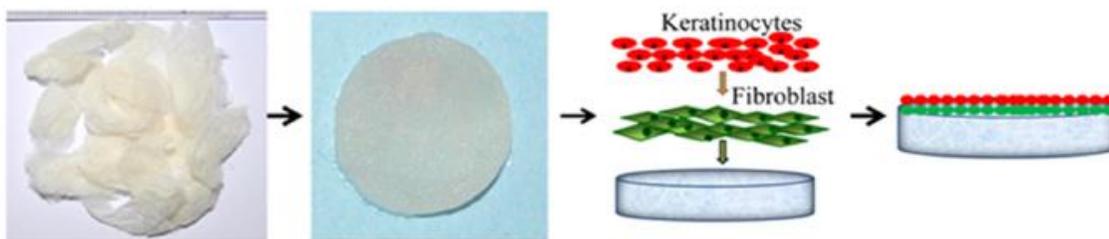
PDGFC: Se encuentra ubicado en el cromosoma 4, con un tamaño promedio de 210,941 bases y con un peso de 39029 Da. Juega un papel esencial en la regulación del desarrollo embrionario, la proliferación celular, la migración celular, la supervivencia y la quimiotaxis. Potencial mitógeno y quimioatrayente para células de origen mesenquimatoso. Requerido para la formación normal del esqueleto durante el desarrollo embrionario, especialmente para el desarrollo normal del esqueleto craneofacial y para el desarrollo normal del paladar. Requerido para la morfogénesis normal de la piel durante el desarrollo embrionario. Desempeña un papel importante en la curación de heridas, donde parece estar involucrado en tres etapas: inflamación, proliferación y remodelación. Desempeña un papel importante en la angiogénesis y el desarrollo de vasos sanguíneos. Participa en procesos fibróticos, en los que se produce la transformación de fibroblastos intersticiales en miofibroblastos más depósito de colágeno [82, 84-87].

PDGFD: Se encuentra ubicado en el cromosoma 11, con un tamaño promedio de 257,194 bases y con un peso de 42848 Da. Juega un papel esencial en la regulación del desarrollo embrionario, la proliferación celular, la migración celular, la supervivencia y la quimiotaxis. Potencial mitógeno para células de origen mesenquimatoso. Juega un papel importante en la curación de heridas. Induce el reclutamiento de macrófagos, aumento de la presión intersticial y maduración de los vasos sanguíneos durante la angiogénesis. Puede iniciar eventos que conducen a una glomerulonefritis proliferativa mesangial, incluida la afluencia de monocitos y macrófagos y la producción de matriz extracelular [82, 87, 88].

El PDGF se ha utilizado para mejorar la cicatrización de heridas, como es el caso del PDGF-BB humano recombinante administrado en un hidrogel (becaplermina; comercializado como RegranexR por Johnson & Johnson) además es el factor de crecimiento tópico disponible en el mercado aprobado en 1997 por la FDA para su uso en la curación de heridas cutáneas [89]. En modelos animales de curación de heridas incisionales, se ha demostrado que el PDGF induce la proliferación y diferenciación de fibroblastos, la deposición de colágeno y la angiogénesis. La cicatrización de heridas se acelera y las heridas cicatrizadas aparecen microscópicamente normales después del tratamiento [90].

### Sustitutos comerciales de piel humana como apósitos para las heridas

Un apósito es cualquier producto para cubrir una herida. El desarrollo de apósitos para heridas eficientes para DFUs es un reto sustancial. Un apósito ideal para una herida debe ofrecer protección frente a infecciones secundarias, proporcionar un ambiente húmedo en la herida, eliminar los exudados, y promover la regeneración de tejidos. Los apósitos para heridas podrían estar compuestos de polímeros naturales, modificados o sintéticos, así como sus mezclas o combinaciones, y se pueden procesar en forma de películas, espumas, hidrocoloides y los hidrogeles. Además, podrían entregar potenciadores de la curación y sustancias terapéuticas (fármacos, factores de crecimiento, péptidos, células madre y/o otras sustancias bioactivas), ver figura 7 [24].



**Figura 7. Ejemplo de un apósito para DFU.** Se muestra un apósito compuesto de dos diferentes tipos celulares, queratinocitos y fibroblastos dispuestos en una matriz de sercina [91].

Algunos de estos apósitos desarrollados con esta tecnología se describen a continuación:

**Apligraf:** Consiste en cuatro componentes: la matriz extracelular, fibroblastos dérmicos alogénicos viables, queratinocitos epidérmicos alogénicos, y un estrato córneo. La matriz extracelular promueve el crecimiento en las células, proporciona el andamiaje para la estructura tridimensional de Apligraf, y proporciona la estabilidad mecánica y la flexibilidad para el producto terminado. Los fibroblastos dérmicos producen factores de crecimiento para estimular la cicatrización de heridas, contribuir a la formación de nuevo tejido dérmico, y a mantener la epidermis suprayacente. Los queratinocitos epidérmicos forman la epidermis, ellos

producen factores de crecimiento para estimular la cicatrización de heridas y lograr el cierre de la herida biológica. El estrato córneo proporciona una barrera natural al daño mecánico, infección, y la desecación de la herida [72].

**Dermagraf:** Es un sustituto humano criopreservado estéril, derivado de fibroblastos dérmicos generado por el cultivo de fibroblastos dérmicos neonatales en un andamio de malla de poliglactina bioabsorbible. Dermagraft sólo contiene fibroblastos dérmicos humanos y sus productos secretados y está desprovista de otros tipos de células que se encuentran en la piel (por ejemplo, macrófagos, linfocitos, células endoteliales, o queratinocitos). Los fibroblastos son de un banco de células cualificado y han sido ampliamente examinados por agentes infecciosos. La malla de poliglactina que soporta los fibroblastos ha sido probada y aprobada para su uso en seres humanos y es un material de sutura utilizado comúnmente [92].

**Transcyte:** es similar a Dermagraft en el diseño, ya que contiene los fibroblastos humanos del donante que han crecido en un andamio de poliglactina bioabsorbible recubierta de colágeno porcino, pero posee una membrana de silicona adjunta para actuar como una barrera temporal. A pesar de que su uso es recomendado para quemaduras, proporciona una alternativa dérmica y una barrera epidérmica temporal con utilidad en el tratamiento de DFU [79].

**OrCel:** es una bicapa de vestir se asemeja a la piel normal. El producto se compone de colágeno tipo I bovino en el que los queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos, derivadas de tejido de prepucio neonatal de un donante se cultivan en 2 capas. Los fibroblastos se colocan dentro de la esponja porosa, mientras que los queratinocitos se siembran en el lado no porosa de la matriz [75].

**AlloDerm, GraftJacket, SureDerm:** los tres son muy similares, consisten en una matriz dérmica humana liofilizada, con membrana basal conservada. Se incorporan fácilmente en la herida y no provocan respuesta inmunógena, ni rechazo. el AlloDerm es reconocido como reemplazo dérmico y elemento reconstructor de hernias de pared abdominal, mastectomía subcutánea, rinoplastia y revascularización. El GraftJacket es utilizado para tendones y reparación de heridas de extremidades. El SureDerm permite la sustitución o reparación de los tejidos blandos dañados incluyendo heridas por quemadura y revisión de cicatriz hipertrófica [79]. A pesar de que los tres difieren en el uso, tienen el potencial de ser aplicados al tratamiento de DFU.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los tratamientos actuales existentes para tratar las DFU no son del todo efectivos, por lo cual los pacientes no responden de forma satisfactoria a ellos, esto debido a la coexistencia de diferentes factores como el neuropático, isquémico e infeccioso, los cuales se presentan en una combinación de ellos en los pacientes y es ahí donde el tratamiento debe actuar y tener efectos benéficos en todos esos factores, sin embargo en muchos de los casos esto falla, sumando además que la DM provoca alteraciones en las fases de cicatrización normal de una herida y el tratamiento debe redirigirla a un proceso de cicatrización adecuado, representa un gran desafío por lo que sigue generando que las complicaciones de este padecimiento se sigan presentando como es el caso de las amputaciones de los miembros inferiores, con el riesgo latente que después de la primera amputación se vuelva a presentar otro episodio similar, lo que se traduce en una muy mala calidad de vida para los pacientes diabéticos y para sus familiares, mientras que para la sociedad también representa un impacto económico debido a que gran parte del presupuesto económico es destinado para tratar la DM y sus complicaciones. Por eso es de gran importancia proponer un tratamiento novedoso ayudado de la tecnología y la ingeniería de tejidos.

## JUSTIFICACIÓN

La DM es un grave problema de salud a nivel mundial afectando a más de 425 millones de personas en el mundo. Teniendo en cuenta que de estos pacientes diabéticos aproximadamente el 15 – 25% presentarán al menos una úlcera plantar a lo largo del padecimiento de su enfermedad, derivado de esto el 85 % de las amputaciones que se realizan son precedidas por una úlcera diabética, lo que implica un riesgo constante de amputaciones de los miembros inferiores o un desenlace más trágico como es la muerte. En México la prevalencia de la enfermedad según cifras de ENSANUT 2016 se incrementó del 9.2% en el año 2012 a 9.4% para el año 2016. Mientras que en el estado de Zacatecas la DM tiene una prevalencia de 9.4%.

Tomando en consideración el impacto económico que genera esta enfermedad sólo en México se destinan 362,860 millones de pesos, lo cual representa cerca de 2.25% del PIB. Los costos directos de la enfermedad se estimaron en 179,495 millones de pesos de los cuales el 87% se destina a las principales complicaciones de la diabetes.

La cicatrización y reparación de las heridas es un proceso dinámico de 4 etapas donde participan células como los queratinocitos y diversos factores de crecimiento, teniendo presente que estas etapas se ven alteradas en pacientes diabéticos y adicionado que los tratamientos actuales para combatir las úlceras del pie diabético no son del todo efectivos, hace necesario desarrollar nuevos tratamientos más eficaces contra este padecimiento y mejorar la calidad de vida de los pacientes con este padecimiento ayudados de las nuevas tecnologías y de la ingeniería de tejidos.

## **HIPÓTESIS**

La utilización de un implante 3D construido por queratinocitos embebidos en una matriz extracelular, y adaptado al sitio de la lesión favorecerá la cicatrización y restablecimiento de las lesiones tisulares, representando así un potencial tratamiento contra el síndrome del pie diabético.

## OBJETIVOS

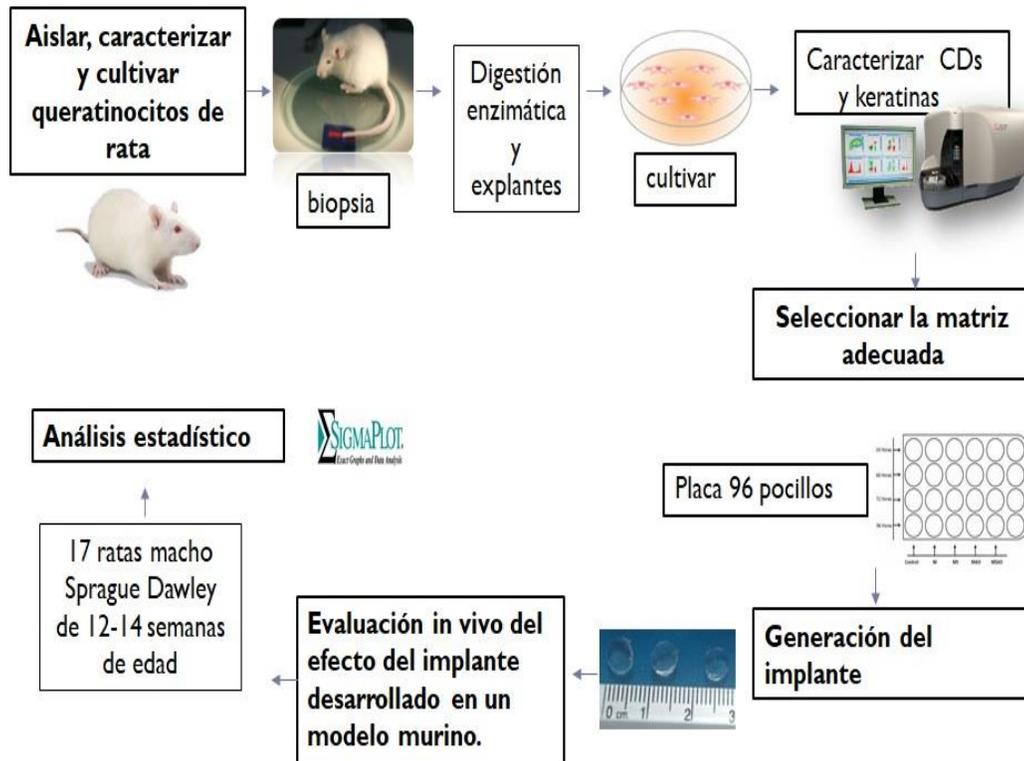
Objetivo general.

Desarrollar y evaluar un implante en 3D con utilidad potencial para el tratamiento de lesiones tisulares construido a partir de queratinocitos incluidos en un andamio de biomateriales que le brinde soporte, protección y le facilite la adhesión al sitio de la lesión tisular y permita la reparación de tejidos.

Objetivos específicos.

- 1.- Aislar, caracterizar y cultivar queratinocitos de rata.
- 2.- Seleccionar la matriz adecuada para utilizar en el implante.
- 3.- Evaluación *in vivo* del efecto del implante desarrollado en un modelo murino.
- 4.- Evaluación funcional del implante desarrollado.

## ESTRATEGIA GENERAL



**Figura 8. Estrategia general.** se muestra la estrategia general, etapas principales y técnicas empleadas durante el estudio.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Obtención de las muestras de tejido animal**

Las muestras recolectadas de animales fueron tomadas de ratas macho de la cepa Sprague Dawley provenientes del Bioterio de ENVIGO (Harlan), de 12-14 semanas de edad y con un peso promedio de 320 gramos. Las biopsias tomadas correspondieron a piel de espesor completo del cuadrante superior derecho de la oreja de aproximadamente 3 x 9.5 mm, estas se tomaron mediante unas pinzas especiales (Pinzas para biopsia Tischler) para la toma de biopsias. Una vez obtenidas las biopsias se colocaron en tubos de 2 ml que contenía buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) y se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su uso, no mayor a 24h posteriores a su obtención.

### **Preparación de Medios de Cultivo e Insumos**

#### **Preparación de suero fetal bovino quelado sin Calcio (Ca<sup>2+</sup>).**

Para un volumen de 100 ml. Se utilizó la resina Chelex-100 (Bio-Rad, Cat. No. 142-1253) al 20% para su preparación. Se pesaron 20g de la resina y se adicionó a 100mL de agua destilada. Luego de esto, se dejó agitar durante 1 hora en plancha agitadora donde se iba ajustando a pH 7.4 con HCl concentrado. Pasado el tiempo, se llevó a filtración por gravedad con papel filtro Whatman No. 1. Se eliminó el filtrado y la suspensión de resina se adicionó a 100mL de suero fetal bovino y se dejó agitar suavemente durante toda la noche a 4°C. Después, se filtró primero a gravedad con papel filtro Whatman No. 1 estéril. Aquí, se descartó la suspensión de la resina sobrante en el papel filtro. Luego, se realizó una segunda filtración con un embudo de polisulfona (previamente esterilizado) con una membrana estéril con tamaño de poro de 0.22 µm y se alicuotó en tubos Falcon estériles de 15mL y se almacenaron a -20°C.

#### **Preparación de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) sin Ca<sup>2+</sup>**

Se utiliza un sobre de DPBS (Cat. No. D5773 Sigma-Aldrich) para preparar 1 L de solución. Este DPBS está formulado para contener 9.6 gramos de polvo por litro de medio. Se disolvió el sobre de DPBS en 1 litro de agua des ionizada, una vez disuelto se esterilizo, se dejó enfriar y se almaceno a 4°C.

#### **Preparación del medio Lonza (Cat. No 00195130) KBM Gold Keratinocyte Growth Basal Medium, Calcium and Phenol Red Free**

Para la preparación de una alícuota de 20 ml de medio Lonza, se le agregaron:

Hidrocortisona: 20 µl  
Transferrina: 20 µl  
Epinefrina: 10 µl

GA: 20  $\mu$ l  
BPE: 80  $\mu$ l  
hEGF: 20  $\mu$ l  
Insulina: 20  $\mu$ l

Se mezclaron en 20 ml de medio KBM Gold Keratinocyte Growth Basal Medium, Calcium and Phenol Red Free, y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

### **Solución de Tripsina 0.25% EDTA 0.53mM**

Para preparar una alícuota de solución de Tripsina 0.25% EDTA 0.53mM. Se pesaron 37.5 mg de tripsina, se le adicionó 15 mg de glucosa y 79.5  $\mu$ l de EDTA al 100 mM, se mezclaron y se filtraron en un acrodisco de 0.22  $\mu$ M y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

### **Cajas de Cultivo con solución de Colágeno**

Para preparar una solución de 5 ml de colágeno, se pesaron 0.5 mg de colágeno (Cat. No C7661 Sigma-Adrich®) y se disolvieron en 5 ml de ácido acético al 0.1M, luego se cubrieron las cajas de cultivo, se dejaron secar por 1 hora a temperatura ambiente y se retiró el excedente.

### **Cajas de Cultivo con solución de Fibronectina**

Para la preparación de una solución de 1 ml de fibronectina (Cat. No. F2518 Sigma-Adrich®), se disolvió 50  $\mu$ l de fibronectina en 950  $\mu$ l de PBS estéril, luego se cubrió la superficie de la caja de cultivo y se dejaron secar durante 45 min a temperatura ambiente, y se removió el exceso de fibronectina.

### **Aislamiento y cultivo de queratinocitos**

El procedimiento para el aislamiento y cultivo de queratinocitos epidérmicos se llevó a cabo dentro de una cabina de flujo laminar nivel II, mediante una técnica de digestión enzimática y explantes, se procedió a lavar la biopsia con Iodopovidona (Iodopovidona) durante 1 minuto, alcohol etílico al 70% durante 1 minuto y finalmente un lavado con buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4), para eliminar la contaminación microbiana (hongos y bacterias). Después a las biopsias se les retiró parte de la hipodermis y pelo con la ayuda de pinzas de disección y bisturí. Una vez realizado este procedimiento los tejidos se colocaron en una solución de medio KBM-Gold™ Keratinocyte Basal Medium - Gold without Ca (Lonza) y dispasa II (Sigma Aldrich) a una concentración de 4mg/ml, durante una hora a 37°C en una incubadora. Al cabo de este tiempo en una caja de Petri previamente esterilizada se separó la dermis de la epidermis con ayuda de pinzas de disección estériles, luego la epidermis se cortó en trozos pequeños de aproximadamente 3x3 mm y se pasaron a tubos de 2 ml con una solución de tripsina 0.25% (Sigma Aldrich) con EDTA 0.53mM durante 15 min en agitación constante mediante un agitador a 75 rpm. Transcurrido este tiempo los tejidos se lavaron con suero fetal

bovino (Gibco®, Grand Island, NY, USA) y DMEM al 10% para inactivar la acción de las enzimas y se procedió a dejar los explantes en placas de cultivo de 96 pozos (Corning™), ahí se mantuvieron por un tiempo de 10 min, tiempo necesario para que el explante se adhiriera a la placa de cultivo, después se le agregó 100uL de medio de queratinocitos KBM-Gold™ Keratinocyte Basal Medium - Gold without Ca (Lonza) suplementado con antibiótico Penicilina/Estreptomina (Gibco®, Grand Island, NY, USA). Los queratinocitos se dejan en cultivo hasta el día que se van a utilizar en condiciones de cultivo, 5% CO<sub>2</sub>, 95% de humedad y una temperatura de 37°C.

### Aislamiento y cultivo de Fibroblastos

Para el aislamiento de fibroblastos se utilizó el método de explantes. Se hicieron cortes del tejido conectivo aislado de la oreja, de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>, se colocaron en cajas de cultivo de 35 mm, a una distancia de 0.5 cm entre ellos, se dejaron secar por 10 minutos y una vez adheridos al plato se añadió 1 ml de medio DMEM. Se incubó a 37°C en las condiciones establecidas hasta obtener una monocapa de células. El medio se cambió 2 veces por semana. Para los subcultivos o pasajes se pasaron las células a frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> una vez confluentes se congelaron 2 viales y se almacenaron en nitrógeno líquido.

### Caracterización de las células aisladas

Para la caracterización de las células aisladas se diseñaron primers para queratinocitos, quienes expresan diferentes marcadores llamados queratinas, se utilizó PCR convencional y PCR cuantitativa en tiempo real, los primers utilizados son los siguientes:

**Tabla 3.** Lista de primers utilizados.

Gen	Primer	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Tamaño del amplicon
KRT14rn	Forward	GGATGCTCACCTTTCATCTGC	61	88 pb
	Reverse	GTTGGTGGAGGTCACATCTCT	61	
KRT1rn	Forward	TTCATCGACAAGGTGCGCTT	60	149 pb
	Reverse	TCCAATTGCCTCCTGAGGTT	60	
KRT15rn	Forward	GGCCAGGATGCTAAGATGGC	60	114 pb
	Reverse	TTTTCCGTCGACCGATTCCCTCCA	60	
KRT5rn	Forward	AGGGCACCAAGACCATAAAGC	60	149 pb
	Reverse	CTTGTAGTCCTCCACCAGATCC	60	
GAPDHrn	Forward	TGCAGTGCCAGCCTCGTCCC	60	63 pb
	Reverse	TACGGCCAAATCCGTTTACA	60	
Actβrn	Forward	TCGTGCGGGATGTCAAAGAA	60	158 pb
	Reverse	GGCTTCTGGGCATCGAAAAC	60	
B2mrn	Forward	GTGCTTAGCAGCCTAGCAGT	60	184 pb

	Reverse	GATGAAAACCGCACACAGGC	60	
CD34rn	Forward	GGGAGCCACCAGAGCTATTC	60	147 pb
	Reverse	ATAAGGGTCTTCACCCAGCC	60	
CD37rn	Forward	CCCATATATACCGTGAGGGC	60	109 pb
	Reverse	AAGCCGAGCTCAAGAAGACC	60	
CD63rn	Forward	ACATCACTGTGGGCTGTGGA	60	138 pb
	Reverse	CCTCCACAAAAGCAATGCCC	60	

### PCR convencional

Para la caracterización por PCR convencional se utilizaron las siguientes condiciones de termociclado: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 15 segundos, durante 35 ciclos. De los reactivos se utilizaron: Master Mix (2X) (Promega®), Primer Forward 5uM, Primer Reverse 5uM, cDNA 50ng/uL y H<sub>2</sub>O, en un volumen final de 10uL.

### PCR cuantitativa en tiempo real

Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) para medir la expresión génica mediante cuantificación relativa por el método Sybr Green, para ello se utilizaron los siguientes reactivos: Sybr Green 2X, Primer Forward 0.2uM, Primer Reverse 0.2uM, cDNA (100 ng totales) y H<sub>2</sub>O, en un volumen final de 20uL. Todos los ensayos se hicieron por duplicado..

### Preparación de las matrices

Se evaluaron 6 matrices, las cuales fueron: Gelatin methacrylate (GelMA Sigma-Adrich®) al 5 y 10%, Poli (D, L-láctido-co-glicólido) (PLGA Sigma-Adrich®.) al 10%, Gelatin 5% Sigma-Adrich®, Pluronic F127 Sigma-Adrich®, Alginato al 2% Sigma-Adrich®. La forma en la que se prepararon se describe a continuación:

#### Preparación de Gelatin methacrylate (GelMA) al 5%

- 1.- Se preparó Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) al 0.5% p/v, manteniéndolo en agitación en PBS a 60 °C, hasta que todo el LAP se disolvió.
- 2.- Se preparó GelMA al 5% p / v y se agregó a la solución del paso 1. Se mezcló a 60 °C hasta que se disolvió GelMA.
- 3.- Se calentó la solución del paso 2 a 60 °C y se filtró con un filtro de jeringa de 0.45 µm en condiciones estériles.

4.- Se utilizó la solución en una mezcla con células, para ello se dejó enfriar la solución del paso 3 a 37 °C, luego se mezcló con la suspensión celular deseada en un recipiente estéril.

#### **Preparación de Gelatin methacrylate (GelMA) al 10%**

1.- Se preparó LAP al 0.5% p/v y se mezcló en PBS a 60 °C, hasta que todo el LAP se disolvió.

2.- Se preparó GelMA al 10% p/v y se agregó a la solución del paso 1. Se mezcló a 60 °C hasta que se disolvió GelMA.

3.- Se calentó la solución del paso 2 a 60 °C y se filtró con un filtro de jeringa de 0.45 µm en condiciones estériles.

4.- Se utilizó la solución en una mezcla con células, para ello se dejó enfriar la solución del paso 3 a 37 °C, luego se mezcló con la suspensión celular deseada en un recipiente estéril.

#### **Poli (D, L-láctido-co-glicólido) (PLGA) al 10%**

Se prepararon 0.5ml de PLGA al 10%, para ello se pesaron 50 mg de PLGA y se disolvió en cloroformo en constante agitación a 60°C por 1 hora para favorecer su disolución, luego se dejó evaporar el solvente para la formación del hidrogel.

#### **Gelatina 5%**

La gelatina se preparó en formulaciones de 5% (p/v), para ello se pesaron 0.25g de gelatina y se le agregaron 5 ml de agua destilada en agitación magnética constante, para favorecer su disolución la solución se calienta a 60°C, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró con un filtro de jeringa de 0.45 µm en condiciones estériles.

#### **Pluronic F127**

Este hidrogel ya viene preparado y listo para usarse, solo debe mantenerse a 4°C para preservarlo de forma líquida y calentarlo a 37°C cuando se va a utilizar con células.

#### **Alginato al 2%.**

Se preparó un hidrogel de alginato al 2% p/v, pesando 20 mg de alginato que se disolvieron en 1 ml de agua destilada, agitando magnéticamente durante 1 hora. El resultado es una solución homogénea, viscosa y amarillenta. Al mismo tiempo se preparó una solución de Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>) 50mM, pesando 275mg de CaCl<sub>2</sub> y se disolvieron en 50 ml de agua destilada. Para la reticulación de las

cadena de alginato de inyecta la solución de alginato al 2% en 25 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub> mediante una pipeta de plástico y se deja reticular durante 30 minutos.

Nota: la reticulación del alginato se da de manera instantánea en cuanto entra en contacto con la solución de CaCl<sub>2</sub>.

### **Evaluación de las propiedades físicas de las matrices**

Para observar el comportamiento de las matrices a diferentes condiciones se evaluaron las matrices preparadas a diferentes temperaturas y concentración.

Se prepararon las matrices de acuerdo a lo descrito anteriormente y se evaluaron a diferentes temperaturas, el gel preparado se pasó a tubos de 2 ml que contenía PBS, luego se le realizaron las siguientes evaluaciones:

Se evaluaron las matrices después de 24 h a 37°C

Se evaluaron las matrices después de 24 h a 4°C

Se evaluaron las matrices después de 24 h a temperatura ambiente (20-25°C).

### **Prueba de hinchazón**

El comportamiento de hinchamiento de las matrices secas se determinó sumergiendo completamente las muestras de matrices secas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH = 7,4) a  $4 \pm 1$  ° C durante 24 h. La relación de hinchamiento (SR) se calculó mediante la ecuación:

$$SR = \frac{W_w - W_d}{W_d}$$

Donde W<sub>w</sub> y W<sub>d</sub> son los pesos de las matrices en el estado de hinchamiento y en el estado seco, respectivamente. Se hicieron geles de 1 x 1 cm por triplicado, las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

### **Cultivo de Queratinocitos de rata en matrices**

Para observar la mejor forma de cultivar queratinocitos, se utilizaron 2 formas principales, la primera fue resuspender las células con la matriz y luego se retículo durante 80 segundos con una lámpara de luz UV, la segunda forma fue reticular la matriz en la placa de cultivo durante 80 segundos con una lámpara de luz UV y luego sembrar las células en la superficie de la matriz, esto se analizó mediante un

ensayo de viabilidad. La densidad celular utilizada fue de 50,000 células por pozo en una placa de 96 pozos.

### Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular se realizó de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante AlamarBlue® (invitrogen). El diseño del ensayo se describe a continuación:

Se preparan hidrogeles preparados en placas de 96 pocillos por triplicado, y se mide a los días 1, 4 y 8. La placa de 96 pozos se acomodó de la siguiente forma: columna 1, 3 pozos con la matriz GelMA al 5% reticulada con 50,000 fibroblastos humanos sembrados en la superficie, columna 2, 3 pozos con la matriz GelMA al 5% reticulada de control negativo (sin células), columna 3, 3 pozos de control positivo con 50,000 fibroblastos humanos sin la matriz GelMA, columna 4, 1 gel con 50,000 fibroblastos humanos resuspendidos en la matriz GelMA al 5%, 1 gel con 100,000 fibroblastos humanos resuspendidos en la matriz GelMA al 5%, 1 gel con 200,000 fibroblastos humanos resuspendidos en la matriz GelMA al 5% y reticulados.

	1	2	3	4
A	Gel de GelMA al 5% con 50,000 Fibroblastos humanos sembrados en la superficie	Gel de GelMA 5% sin células.	Fibroblastos humanos sembrados en la superficie sin Matriz.	50,000 Fibroblastos humanos resuspendidos en GelMA al 5%
B	Gel de GelMA al 5% con 50,000 Fibroblastos humanos sembrados en la superficie	Gel de GelMA 5% sin células.	Fibroblastos humanos sembrados en la superficie sin Matriz.	100,000 Fibroblastos humanos resuspendidos en GelMA al 5%
C	Gel de GelMA al 5% con 50,000 Fibroblastos humanos sembrados en la superficie	Gel de GelMA 5% sin células.	Fibroblastos humanos sembrados en la superficie sin Matriz.	200,000 Fibroblastos humanos resuspendidos en GelMA al 5%

**Figura 9. Diseño del ensayo de viabilidad en placa de 96 pozos.** Se muestra el diseño de una placa de 96 pozos para el ensayo de viabilidad en la matriz GelMA al 5%, en ella se evaluaron la técnica de sembrado en la superficie y la de resuspender junto con la matriz.

A los días 1, 4 y 8 se agregan 100 µl de medio + 10 µl de azul alamar, el sobrenadante se recupera y se mide la absorbancia (530nm) en lector de Elisa. La medición se realizó 4 horas después de haber colocado el reactivo de AlamarBlue®.

## **Viabilidad celular de células en monocapa**

Para la viabilidad celular de las células en monocapa se utilizó la técnica de azul tripán, para ello se resuspendieron las células en 1 ml de medio, se hizo una dilución 1:4 de la siguiente manera: células en suspensión 10  $\mu$ l, Azul tripán (Corning) 10  $\mu$ l y medio de cultivo solo 20  $\mu$ l, para un volumen total de 40  $\mu$ l, de estos se tomaron 10  $\mu$ l y se colocaron en la cámara de Neubauer y se contaron 4 cuadrantes, luego se sacó el promedio y se determinó la viabilidad de acuerdo a la fórmula:

Células/ml= (Número de células promedio)  $(1 \times 10^4)$  (Factor de Dilución)

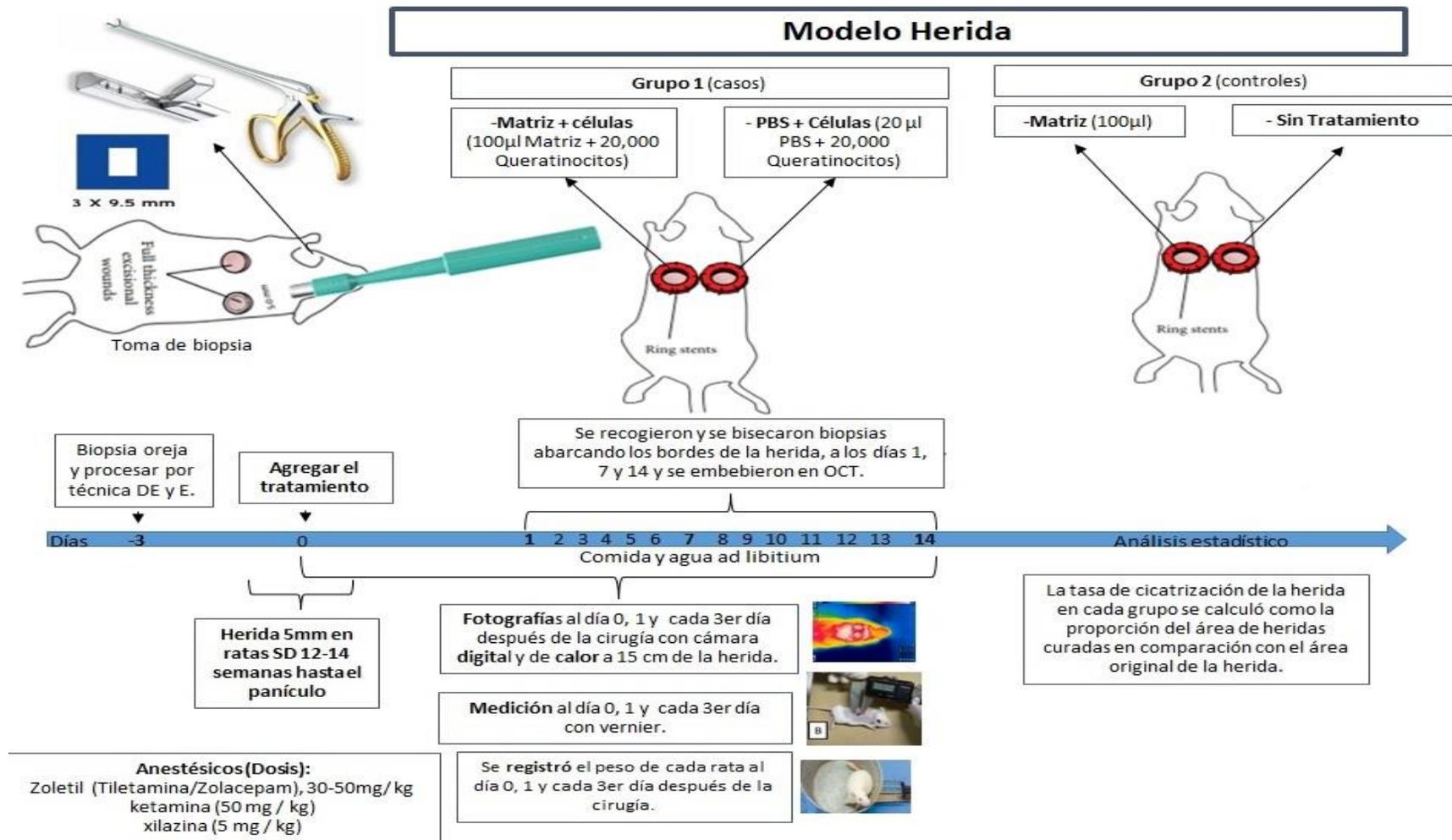
## **Desarrollo experimental del modelo de herida**

En el experimento se utilizaron 17 ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 12-14 semanas de edad aproximadamente, obtenidas del Bioterio de ENVIGO (Harlan). Las ratas se dejaron 1 semana para su aclimatación luego fueron alojadas en cajas individuales con agua y comida ad libitum, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y manteniendo un control de humedad y ventilación adecuadas. Después se asignaron a 2 grupos experimentales al azar clasificándose como grupo casos (n=9) y el grupo control (n=8).

El dorso de la rata se depiló antes del experimento, se anestesió a cada una de las ratas con Zoletil® 50, aplicándoles una dosis de 0.1 ml a una concentración de 50 mg/Kg antes de la cirugía. Después se desinfectó el dorso rasurado con Isodine en espuma (Iodopovidona). Posteriormente se fijó a la piel de cada animal un dispositivo que evita la contracción de la herida para que el cierre sea por el tratamiento y no por contracción, una vez fijado dicho dispositivo se procedió a realizar la herida de espesor total de 5 mm de diámetro hasta llegar al panículo mediante un biopsy punch (marca) desechable.

Las heridas de ratas en los grupos de casos se dividieron del lado derecho como matriz + células (100  $\mu$ l de la matriz GelMA + 20,000 queratinocitos) y del lado derecho PBS + células (20  $\mu$ l de PBS + 20,000 queratinocitos), mientras que para el grupo control las heridas se dividieron del lado izquierdo como Matriz (100  $\mu$ l de la matriz GelMA) y del lado derecho en sin tratamiento como se muestra en la figura 3. Los animales se sometieron a eutanasia en los tiempos indicados (después de la cirugía al día 1, 7 y 14) y se obtuvieron biopsias de la lesión abarcando la herida total para su posterior análisis histológico.

Para tomar las mediciones y fotografías, los animales fueron anestesiados con Ketamina a una dosis de 50 mg/kg y Xilazina a una dosis de 5 mg/kg, tanto para las fotos con cámara normal, cámara infrarroja y microscopio digital.



**Figura 10. Modelo de la herida.** Se esquematiza el procedimiento seguido para la realización de la herida en el dorso de las ratas, así como los tratamientos administrados a cada grupo de animales, de igual forma se muestran los parámetros analizados como la medición de la herida al día 0, día 1 y cada 3er día después de la cirugía al igual que la toma de imágenes con cámara infrarroja y normal a los mismos días ya mencionados, de igual forma se llevó un registro del peso de cada animal a los días señalados.

## **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el software Sigma plot v11.0, se realizaron pruebas t de student para comparar los 4 grupos de tratamiento.

## RESULTADOS

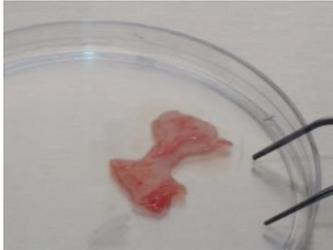
### Objetivo 1. Aislar, caracterizar y cultivar queratinocitos de rata.

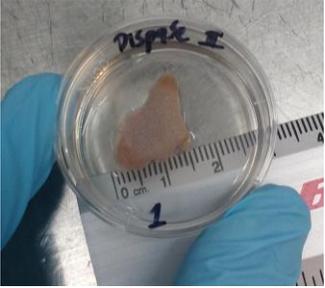
Los animales utilizados en este protocolo, así como los procedimientos realizados fueron manejados conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM – 062 – ZOO – 1999. El protocolo se sometió al comité de ética (número de aprobación pendiente)

Se logró obtener biopsias de piel de rata y ratón, provenientes de oreja, cola y lomo, de igual forma se obtuvieron biopsias de piel de humano, provenientes de prepucio, las cuales fueron donadas al laboratorio de medicina molecular, las características de las biopsias obtenidas se describen a continuación en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Biopsias obtenidas.

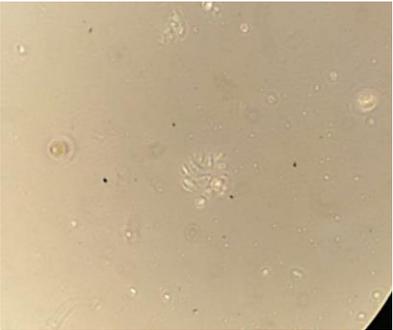
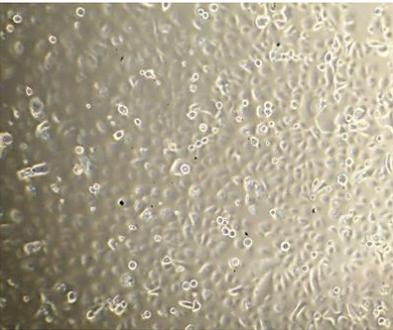
Especie	Origen de la biopsia	Imagen de la biopsia	Tamaño final
RATÓN ( <i>Mus musculus</i> )	Oreja		Cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 mm 
	Cola		Cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 mm

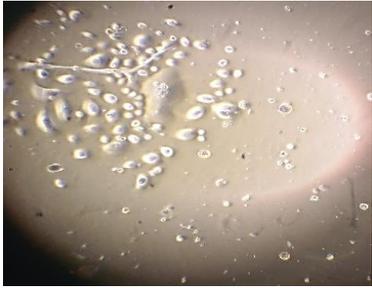
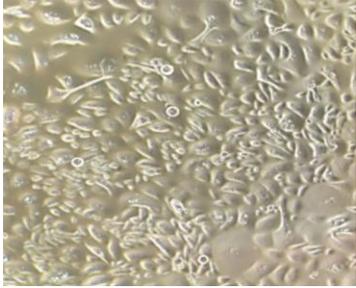
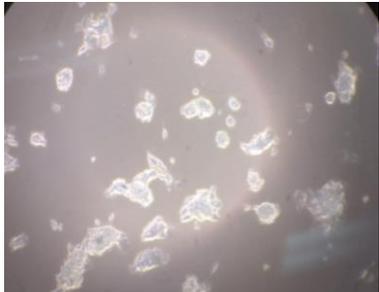
	Dorso		Cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 mm
RATA ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Oreja		Cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 mm
	Cola		Cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 mm
	Dorso		Cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 mm
RATA RECIEN NACIDA	Dorso		Cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 mm

<p>HUMANO (<i>Homo sapiens</i>)</p>	<p>Prepucio</p>		<p>Cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 mm</p>
-----------------------------------------	-----------------	------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------

Para el aislamiento de queratinocitos, se tuvo que estandarizar la técnica, para ello se evaluaron diferentes tipos de células, los cuales se describen a continuación en la siguiente tabla: se usaron queratinocitos humanos como control de la técnica, los cuales lograron proliferar, sin embargo los pasajes no fueron eficientes, por lo cual se decidió a descongelar el vial 2 y 3 de ATCC para ver el problema de los pasajes, el resultado fue el mismo las células crecen sin embargo al hacerles el pasaje no resulta eficiente. Por tal motivo se decidieron evaluar 2 líneas celulares del banco de células del laboratorio de medicina molecular para ver si había problemas con las células guardadas. Las células Hep-G2 (Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB-8065)) y Fibroblastos (Primary Dermal Fibroblast Normal; Human, Neonatal (HDFn) (ATCC® PCS-201-010)) crecieron con normalidad y se lograron los pasajes, esto descartaba el problema relacionado con el banco de células.

**Tabla 5.** Experimentos control.

<p><b>Experimento</b></p>	<p><b>Resultado</b></p>	
<p>Cultivo de queratinocitos humanos como control.  Vial 1 de ATCC</p>	 <p>Día 7, Microscopio optico, 10X</p>	 <p>Día 20, MO 10X</p>

<p>Cultivo de queratinocitos humanos como control. Vial 2 y 3 de ATCC</p>	 <p>Día 7, Microscopio optico, 10X</p>	 <p>Día 200, MO 10X</p>
<p>Cultivo de Fibroblastos para verificar la viabilidad del banco de células del laboratorio.</p>	 <p>Día 5. MO, objetivo 10X</p>	 <p>Día 14. MO, objetivo 10X</p>
<p>Cultivo de Hep G2 para verificar la viabilidad del banco de células del laboratorio.</p>	 <p>Día 4. MO, objetivo 10X</p>	 <p>Día 14. MO, objetivo 10X</p>

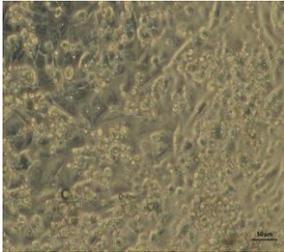
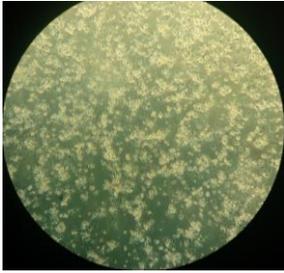
Una vez descartado el problema con el banco de células, se procedió a realizar diferentes experimentos con biopsias de oreja, cola y dorso de rata, ratón y una biopsia de prepucio humano, al igual que se probaron diferentes condiciones tanto de medios de cultivo diferentes, así como cajas de cultivo cubiertas con proteínas de la matriz extracelular como fibronectina y colágeno, de igual forma se evaluaron la técnica con explantes y la de digestión enzimática. Los resultados obtenidos se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 6.** Experimentos con diferentes condiciones de cultivo.

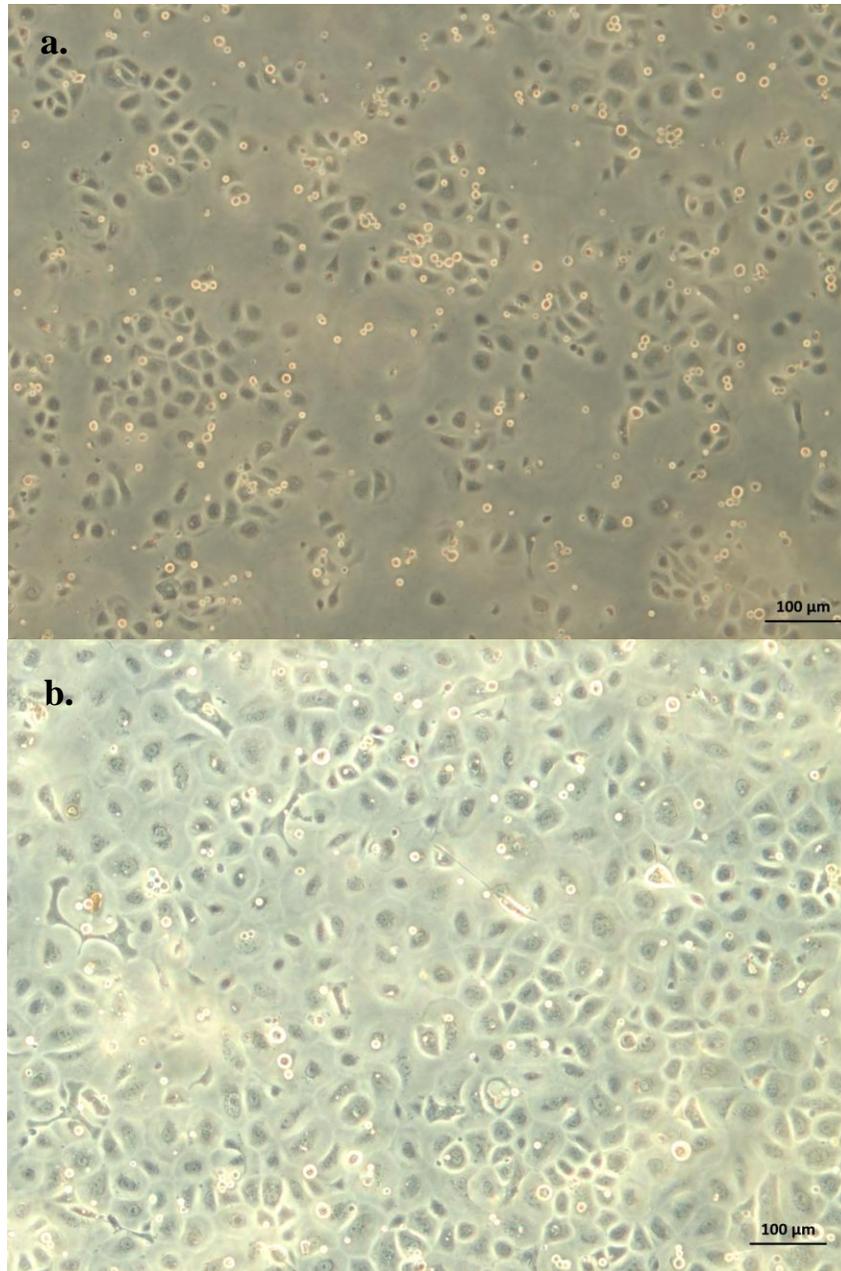
<b>Técnica</b>	<b>Recubrimiento</b>	<b>Medio de cultivo y suplementos</b>	<b>Confluencia</b>	<b>Observaciones</b>
Explantos (E) cola	-----	Keratinocyte Growth Kit (ATCC*)	10-15%	No prolifero
Explantos cola	Fibronectina	Keratinocyte Growth Kit (ATCC*)	15%	No prolifero
Digestión enzimática (DE) cola	-----	Keratinocyte Growth Kit (ATCC*)	15%	No prolifero
Digestión enzimática cola	Fibronectina	Keratinocyte Growth Kit (ATCC*)	15-20%	No prolifero
Digestión enzimática cola	Colágeno	Keratinocytes Growth kit (ATCC*) + SBF 10% sin Ca <sup>2+</sup>	-----	No prolifero
Digestión enzimática cola	Colágeno	Keratinocytes Growth kit (ATCC*) + SBF 10% sin Ca <sup>2+</sup> +EGF	-----	No prolifero
Digestión enzimática cola	Colágeno	DMEM SIN Ca + BPE + EGF + SBF10%	-----	No prolifero
Digestión enzimática cola	Fibronectina	Keratinocytes Growth Kit (ATCC*) + SBF 10% sin	-----	No prolifero

		Ca <sup>2+</sup> +EGF		
Digestión enzimática cola	Fibronectina	Keratinocytes Growth kit (ATCC*) + SBF 10% sin Ca <sup>2+</sup> +EGF	-----	No prolifero
Digestión enzimática cola	Colágeno y Fibronectina	DMEM SIN Ca + BPE + EGF + SBF10%	-----	No prolifero
Oreja Ratón en caja de 35 mm. DE	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
Oreja dorso Ratón en caja de 35 mm. D.	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
Oreja, cola y dorso en caja de 35 mm. DE	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
Oreja y dorso de ratón sin grasa. DE.	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
8 ratones 1 día de nacidos. DE.	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
Prepucio caja de 12 pozos. E	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero

2 orejas de rata, caja de 35 mm. E.	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	10%	 <p>Día 3, 10 X, se observan queratinocitos.</p>
Oreja y lomo ratón DE, para estandarizar la dispasa.	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
Oreja y lomo de ratón. E, para estandarizar la dispasa.	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
Lomo de ratón en tripsina 24 h	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
Oreja de ratón en tripsina 24 h	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	-----	No prolifero
10 orejas de rata en. E. placa de 96 pozos	-----	KBM-Gold <sup>TM</sup>	20%	 <p>Día 3, 10 X</p>

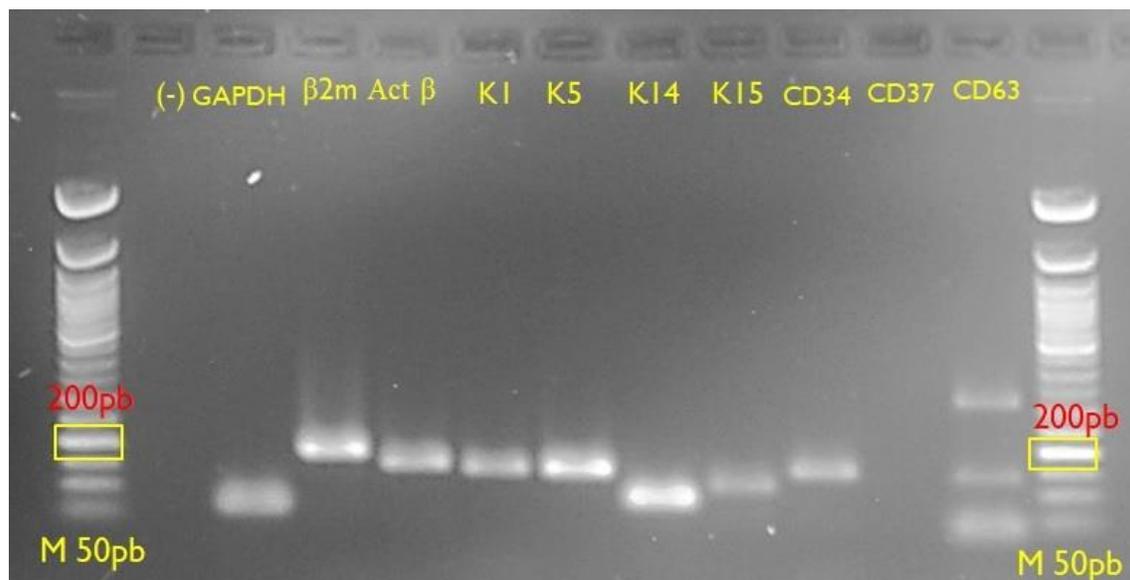
Oreja de rata placa de 96 pozos. Explante	-----	KBM-Gold™	20%	
Oreja de ratón Explante placa de 96 pozos.	-----	KBM-Gold™	20%	

Se logró la estandarización de la técnica para el aislamiento de cultivo de queratinocitos, usando dispasa II (Sigma Aldrich) y tripsina 0.25% (Sigma Aldrich) con EDTA 0.53mM combinada con el método de explantes, se estableció el tiempo necesario para que la dispasa II actué sobre el tejido que fue de 1 hora, mientras que para la tripsina 0.25% el tiempo estandarizado fue de 15 minutos en agitación a 75 rpm, de igual forma el tiempo en que el explante se adhiere a la placa de cultivo fue estandarizada dando un tiempo de 10 minutos. Todo en medio KBM-Gold™ (Keratinocyte Basal Medium - Gold without Ca de Lonza). Los queratinocitos obtenidos mediante esta técnica se pudieron mantener durante 4 días en monocapa. En la Figura 11 se muestran el resultado de los queratinocitos de rata obtenidos.



**Figura 11. Cultivo de queratinocitos.** **11 a.** Se muestran queratinocitos obtenidos de oreja de rata en medio KBM-Gold™ Keratinocyte Basal Medium - Gold without Ca (Lonza). Día 3 de cultivo, se observan las colonias características de los queratinocitos vistos bajo el microscopio de campo claro a un objetivo de 5 X. **Figura 11b. Imagen de abajo. Cultivo de queratinocitos.** Se muestran queratinocitos obtenidos de oreja de rata en medio KBM-Gold™ Keratinocyte Basal Medium - Gold without Ca (Lonza). Día 5 de cultivo, se observan las colonias de queratinocitos confluentes tras 5 días de crecimiento, vistos bajo el microscopio de campo claro a un objetivo de 5 X.

Para la caracterización de queratinocitos se realizó una PCR convencional, obteniendo los resultados de la figura 12.



**Figura 12. Caracterización de queratinocitos.** Se caracterizaron mediante una PCR convencional en un gel de agarosa al 2%, con un marcador de 50 pb.

Los resultados de la PCR de los diferentes genes se expresan en la siguiente tabla:

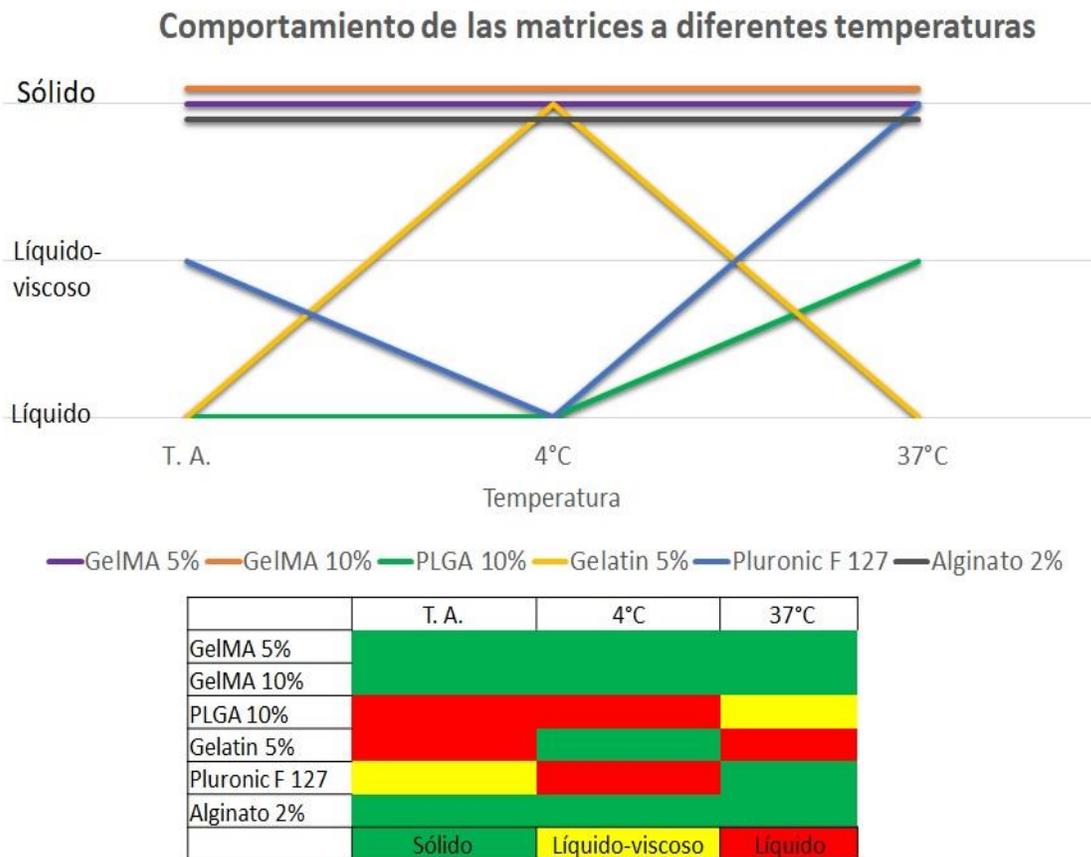
**Tabla 7.** Resultados de la caracterización de queratinocitos de acuerdo a la literatura y a lo experimental.

GEN	GAPDH	β2m	Act β	K1	K5	K14	K15	CD34	CD37	CD63
Resultado literatura	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Resultado experimental	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

## Objetivo 2. Seleccionar la matriz adecuada para utilizar en el implante.

Se logró seleccionar la matriz adecuada para generar el implante, la cual fue GelMA al 10%. Se trabajó con 6 matrices diferentes, de las cuales se buscaban ciertas características especiales para poder ser utilizadas en el implante entre ellas se buscaba que la matriz sea biocompatible con las células, que se pueda manipular y no se degrade antes de que cumpla su función la cual es darle soporte, protección y hacer que los queratinocitos se adhieran al sitio de la lesión.

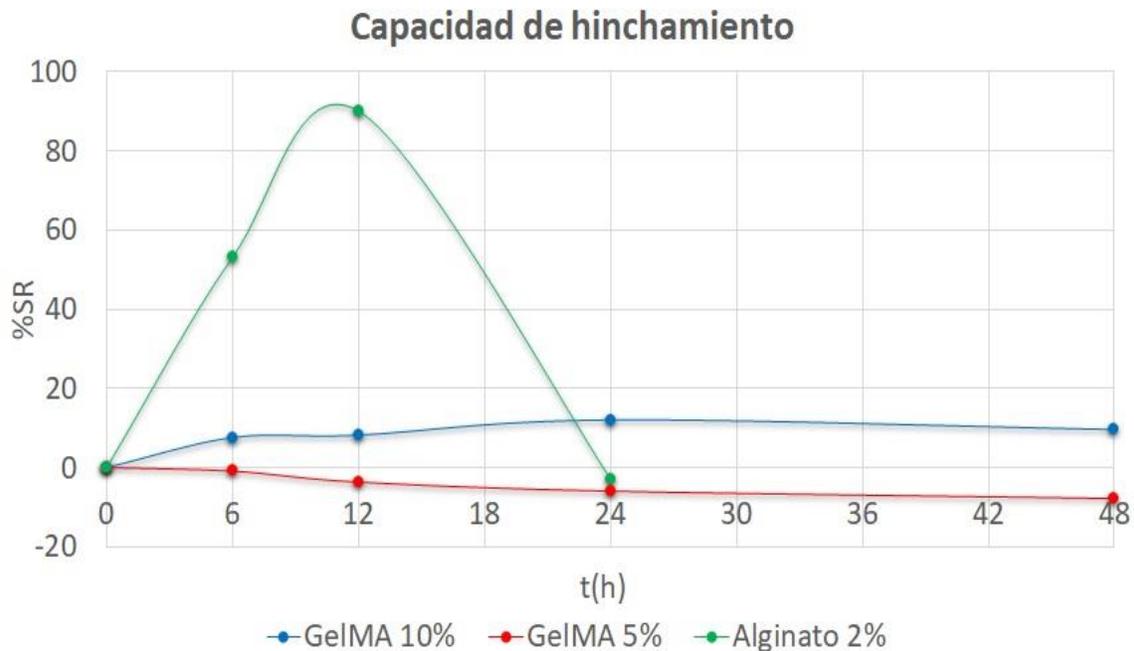
Para ello primero se prepararon las matrices y se evaluaron a diferentes condiciones de temperatura entre las cuales se incluyeron 4°C, temperatura ambiente (20-25°C) y a 37°C, los resultados obtenidos fueron que las matrices GelMA al 5% y GelMA al 10% así como alginato al 2% se mantuvieron en estado sólido a las tres temperaturas evaluadas, mientras que las matrices PLGA 10% se mantuvo líquido a temperatura ambiente y a 4°C y a 37°C cambio a ser un líquido más viscoso, la gelatina al 5% a temperatura ambiente se encuentra en estado líquido cambiando a solido a 4°C y volviendo a ser líquido a 37°C y por último el pluronic F127 pasa de ser un líquido viscoso a temperatura ambiente a ser completamente líquido a 4°C y convirtiéndose en solido a 37°C, dichos resultados se muestran en la figura 13.



**Figura 13. Comportamiento de las matrices a diferentes temperaturas.** Se muestra una gráfica donde en el eje de las X se ven las diferentes temperaturas a las cuales fueron evaluadas las matrices y en el eje de las Y se encuentra el estado que presentan las matrices, en el cuadro de colores se representa lo mismo de la gráfica, pero de manera visual con distintos colores.

Hubo 3 matrices que se mantuvieron sólidas, estas fueron con las que se continuó realizando pruebas, las demás matrices que variaron su estado físico con el

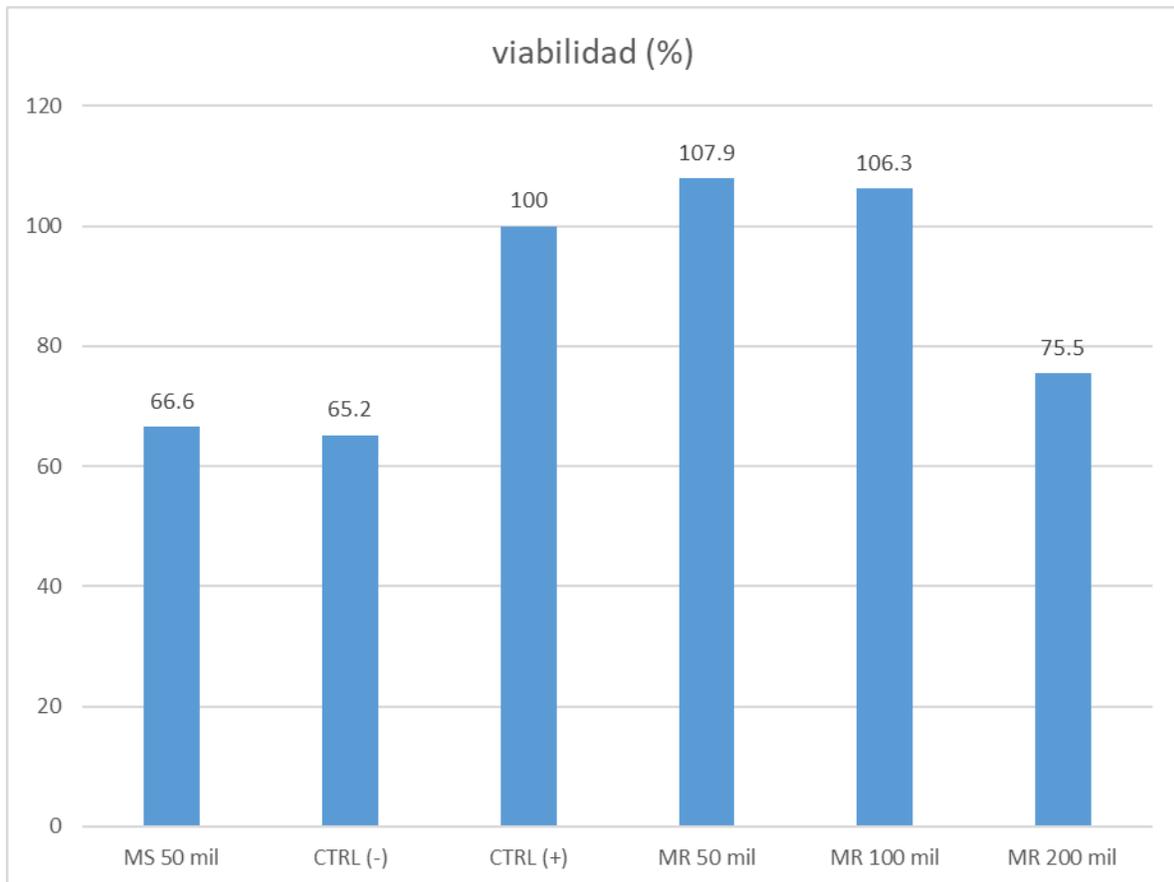
cambio de temperaturas PLGA 10%, Gelatina 5% y Pluronic F127 se descartaron. De las 3 matrices que se seleccionaron GelMA al 5% y GelMA al 10% así como alginato al 2% se prepararon 3 geles de cada matriz en un molde de metal de dimensiones 7x7 mm con 200  $\mu$ l de matriz, una vez solidificado el gel se colocaron en tubos de 2 ml y se le agrego 1.5 ml de buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4), se almacenaron a 4°C y las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, se les realizo la prueba de hinchamiento, este resultado se muestra en la figura 14. La matriz que mostro mejor resultado fue la GelMA al 10%, por lo tanto, fue la matriz ideal para generar el implante.



**Figura 14. Capacidad de hinchamiento.** Se observa una gráfica donde el eje de las X es el tiempo en el que se evaluaron las matrices seleccionadas a las 0h, 6h, 12h, 18h, 24h y 48 h, el eje de las Y muestra el porcentaje de hinchamiento de cada matriz, se ve que el alginato al 2% absorbe el líquido en las primeras 12 horas luego a las 24 horas su capacidad de absorber líquidos es nula pasando a desintegrarse antes de las 48 horas, por otro lado, la GelMA al 5% no tiene capacidad de hinchamiento y comienza a desintegrarse desde las primeras horas continuando así durante las 48 horas, la matriz que mejores resultados fue la GelMA al 10% empezando a absorber líquido a partir de las 6 horas y comenzando a perder esa capacidad hasta las 48 horas, por lo cual es la matriz seleccionada para utilizar en el implante.

Después de seleccionar la matriz GelMA al 10%, se le realizó un ensayo de viabilidad con azul alamar para ver si dicha matriz es biocompatible con la vida celular, también se utilizó este ensayo para determinar la forma en que los queratinocitos se van a agregar al implante, se probaron 2 métodos, el primero fue sembrar las células en la superficie del gel, el segundo método fue resuspender

las células junto con el gel y después llevar a cabo la reticulación, el resultado que arrojó mejor viabilidad fue resuspender las células (50,000 células/ 0.32cm<sup>2</sup>) junto con la matriz y luego reticular, los resultados se muestran en la figura 15.



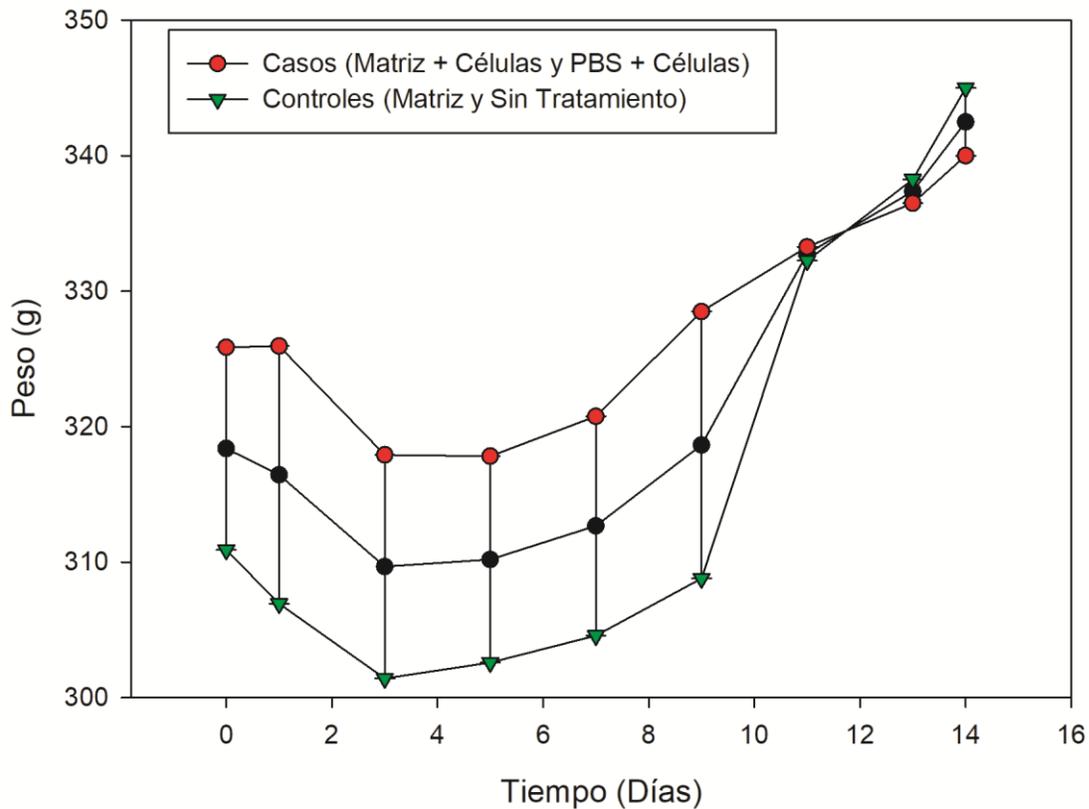
**Figura 15. Ensayo de Viabilidad celular.** Se utilizaron Fibroblastos humanos para este ensayo, se preparó en una placa de 96 pozos, una vez que llegó a la confluencia adecuada se agregó el azul alamar y se determinó la absorbancia, usando una fórmula se saca el porcentaje de viabilidad donde se observa que las muestras resuspendidas con la matriz arrojan porcentajes de viabilidad más altos comparados con las muestras sembradas en la superficie. MS= muestra sembrada en la superficie del gel, MR= muestra resuspendida en el gel.

### **Objetivo 3. Evaluación *in vivo* del efecto del implante desarrollado en un modelo murino.**

Una vez estandarizado el cultivo de queratinocitos y haber seleccionado la matriz adecuada para generar el implante el siguiente objetivo era probar el implante en un modelo murino de herida de piel, en el cual se utilizaron 17 ratas Sprague Dawley, uno de los parámetros evaluados fue el peso de las ratas, se comprobó mediante un análisis estadístico que no hay diferencias significativas en los pesos

de los animales, arrojando así una similitud en ambos grupos de tratamiento. Los resultados se muestran en la figura 16 y tabla 3.

Pesos de las ratas a través del tiempo

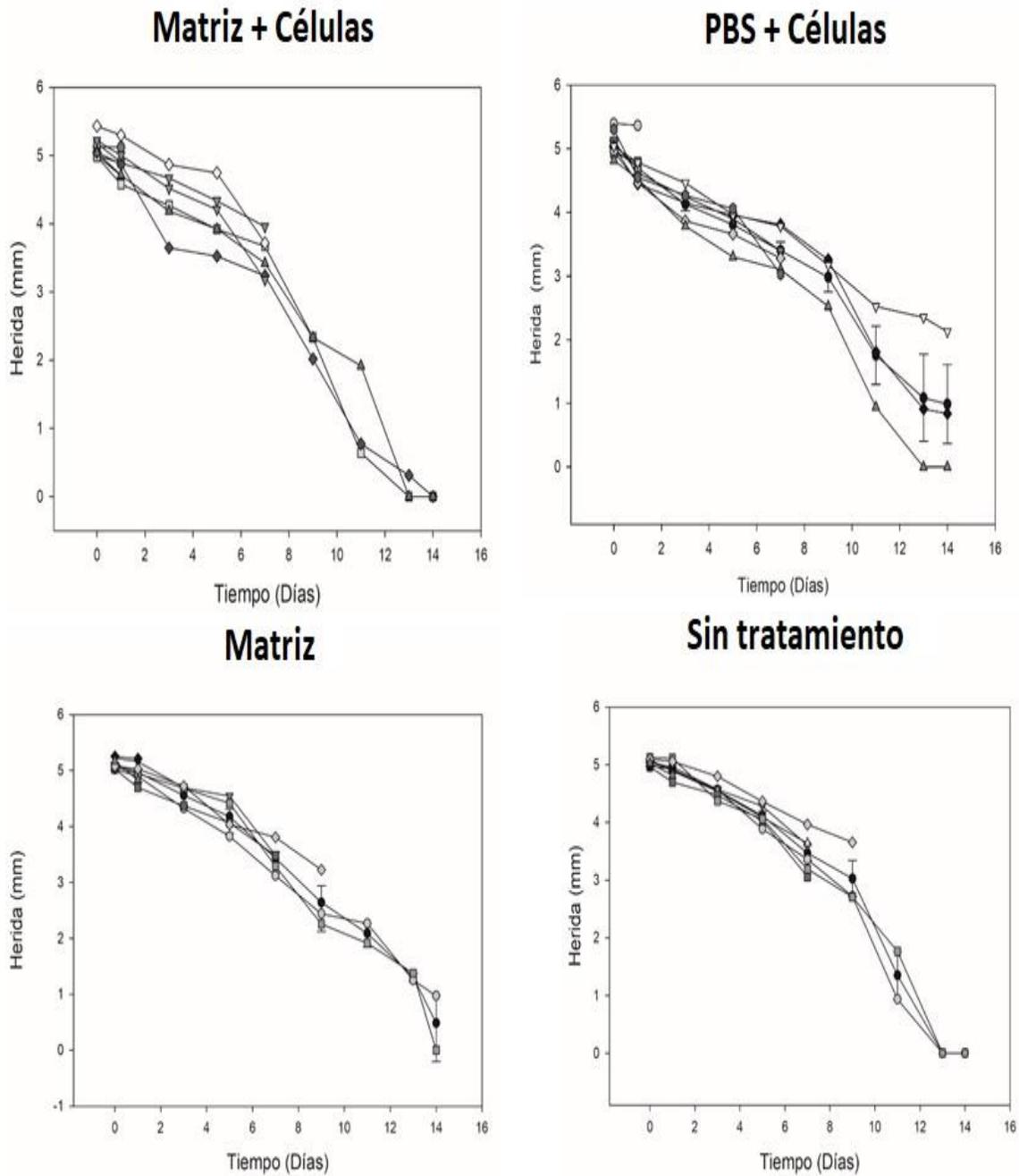


**Figura 16. Pesos de las ratas a través del tiempo.** Se muestra el comportamiento del peso de los animales a través del tiempo que dura el experimento, se observa que el grupo de los casos pesa al inicio 325 g aproximadamente luego al día 3 hay una disminución del peso por debajo de los 320 g y a partir de ahí empiezan a ganar peso los animales llegando a los 345 g aproximadamente. El grupo de los controles muestra en patrón idéntico al grupo de los casos. En el eje de las X se grafica el tiempo en días y en el eje de las Y el peso en gramos.

**Tabla 8.** Comparación de los pesos de las ratas a través del tiempo.

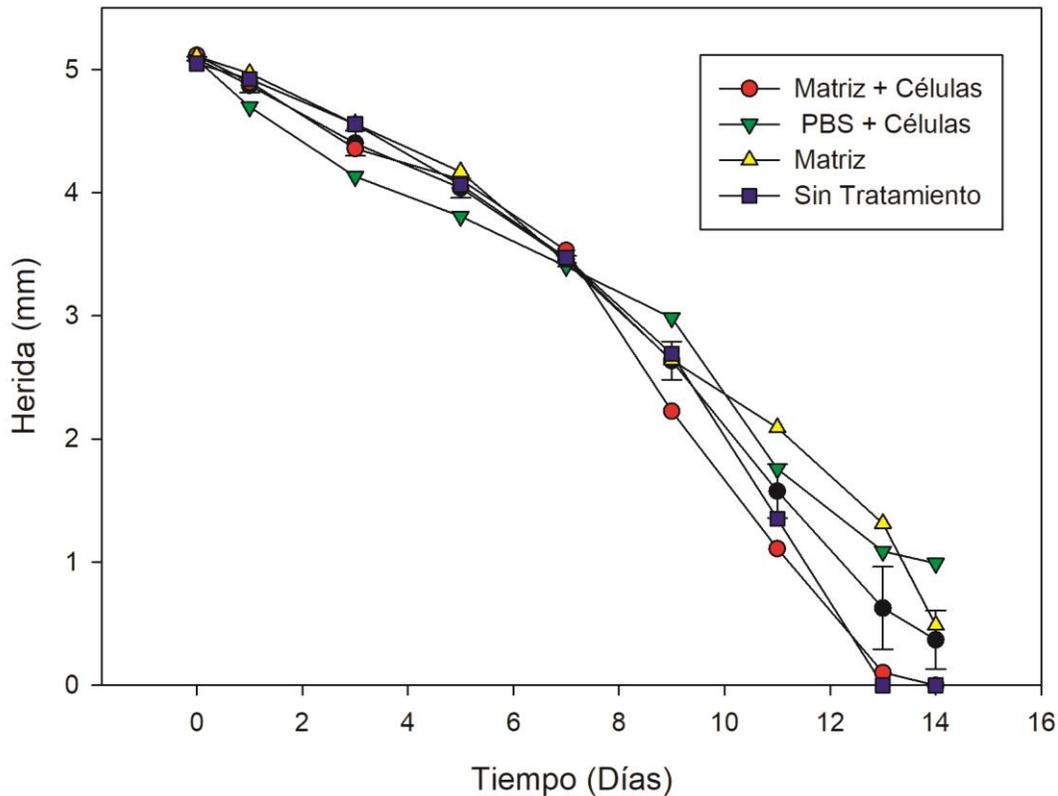
DÍA	Comparación de pesos de las ratas (g)		
	Casos (n=9)	Controles (n=8)	<i>P value</i>
0	325.856 ± 23.749	310.9 ± 30.213	0.271
1	325.944 ± 22.689	306.938 ± 30.193	0.160
3	317.917 ± 29.083 *	301.417 ± 37.242 *	0.412
5	317.817 ± 28.228 *	302.583 ± 35.142 *	0.427
7	320.767 ± 30.056 *	304.583 ± 39.350 *	0.442
9	328.500 **	308.800 **	1.000
11	333.267 ± 26.670 **	332.250 ± 32.880 ***	0.972
13	336.500 ± 26.043 **	338.250 ± 30.052 ***	0.949
14	340.000 ± 31.193 **	345.000 ± 33.941 ***	0.876
n		*= 6 **= 3 ***=2	

Se graficó el cierre de heridas a través del tiempo para ver el comportamiento de cada uno de los grupos evaluados, se encontró que el tratamiento matriz + células tiene un comportamiento muy parecido con el grupo sin tratamiento con el cierre total de la herida a los días 13 y 14, mientras que para el resto de los tratamientos matriz sola y PBS + células a los 14 días aún no ha sanado la herida, indicando que el tratamiento matriz + células ayuda a la cicatrización de heridas. Los resultados se muestran en las figuras 17 y 18.



**Figura 17. Cierre de heridas a través del tiempo de los 4 tratamientos.** Se observa el comportamiento de cada uno de los tratamientos evaluados en las ratas, Matriz + células, PBS + células, Matriz y sin tratamiento, a lo largo de los días de evaluación.

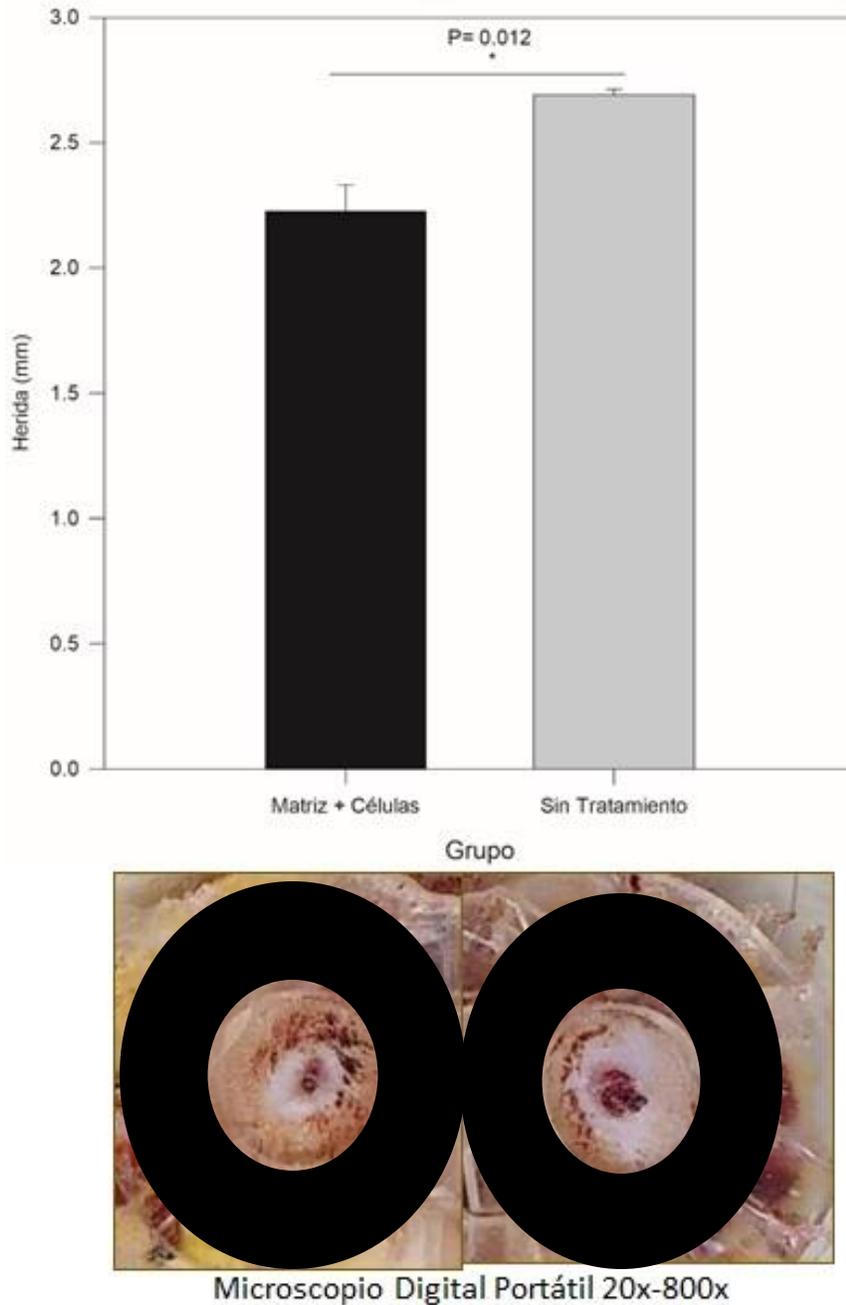
## Cierre de herida de los grupos



**Figura 18. Cierre de herida de los grupos de tratamiento a través del tiempo.** Se observa en conjunto los tratamientos observándose que el grupo de matriz + células tiene un mejor cierre de heridas a partir del día 7.

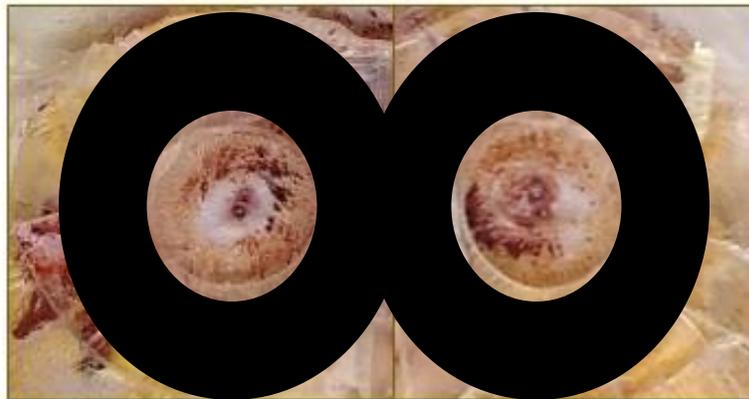
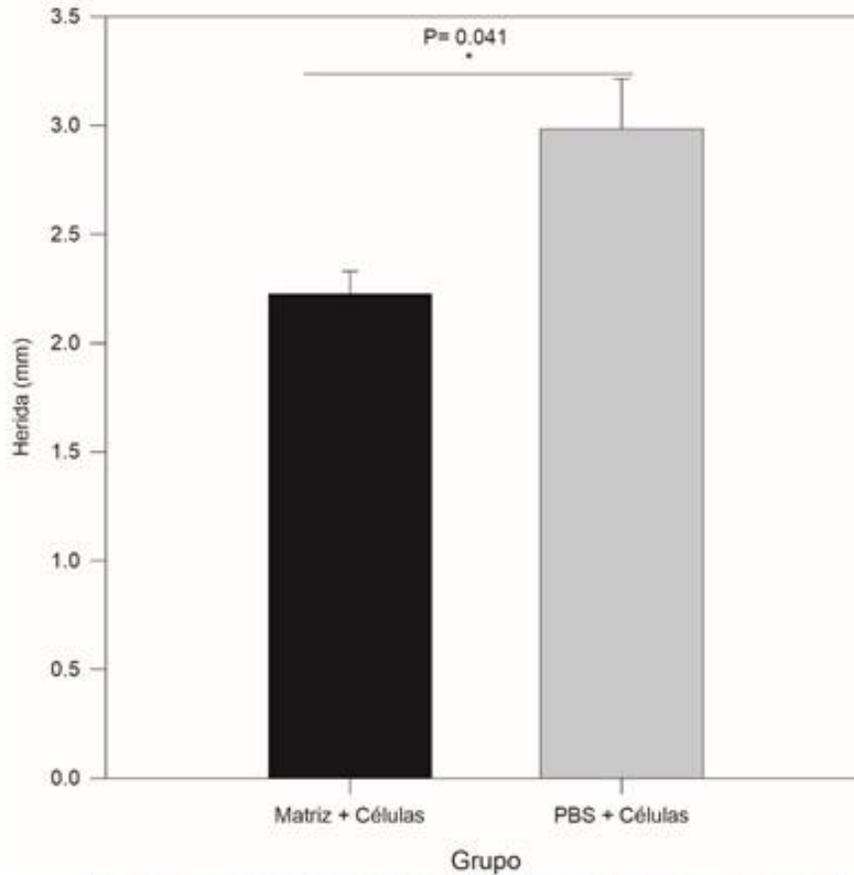
Se realizó un análisis estadístico de pruebas t comparando cada grupo contra los demás, se encontró diferencias significativas en los grupos matriz + células vs sin tratamiento al día 9 con un valor de  $P= 0.012$ , así como entre el grupo matriz + células vs PBS + células al día 9 con un valor de  $P= 0.041$ , también hubo diferencias significativas entre los grupos matriz + células vs matriz al día 13 con un valor de  $P= 0.003$ , de igual forma se encontró diferencias significativas entre los grupos PBS + células vs sin tratamiento a los días 1 y 3 con un valor de  $P= 0.021$  y  $P= 0.005$  respectivamente, finalmente hubo diferencias significativas entre los grupos PBS + células vs matriz a los días 1 y 3 con un valor de  $P= 0.029$  y  $P= 0.014$  respectivamente, los resultados se muestran en las figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

### Matriz + Células VS Sin Tratamiento. Día 9



**Figura 19. Gráfica de matriz + células vs sin tratamiento día 9.** Se observa la gráfica de barras de los grupos matriz + células vs sin tratamiento día 9 donde se ve una diferencia significativa con un valor de  $P= 0.012$ , así mismo se observa una imagen digital del tamaño de la herida para ver de forma visual lo que se presenta en la gráfica.

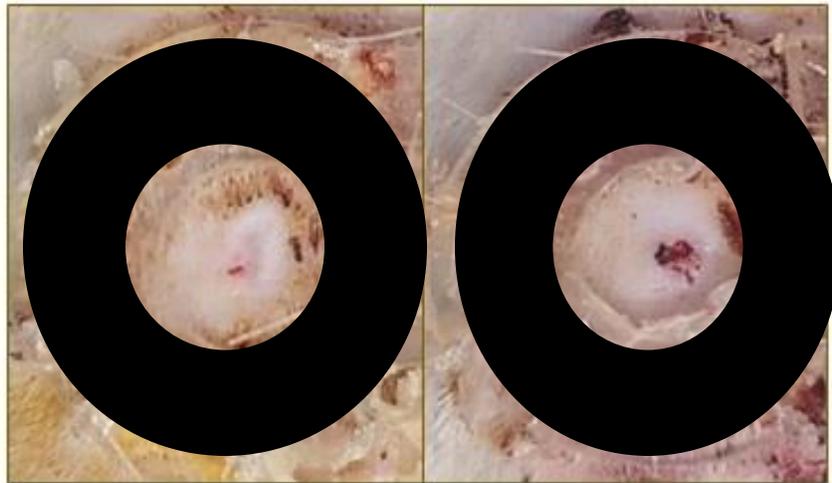
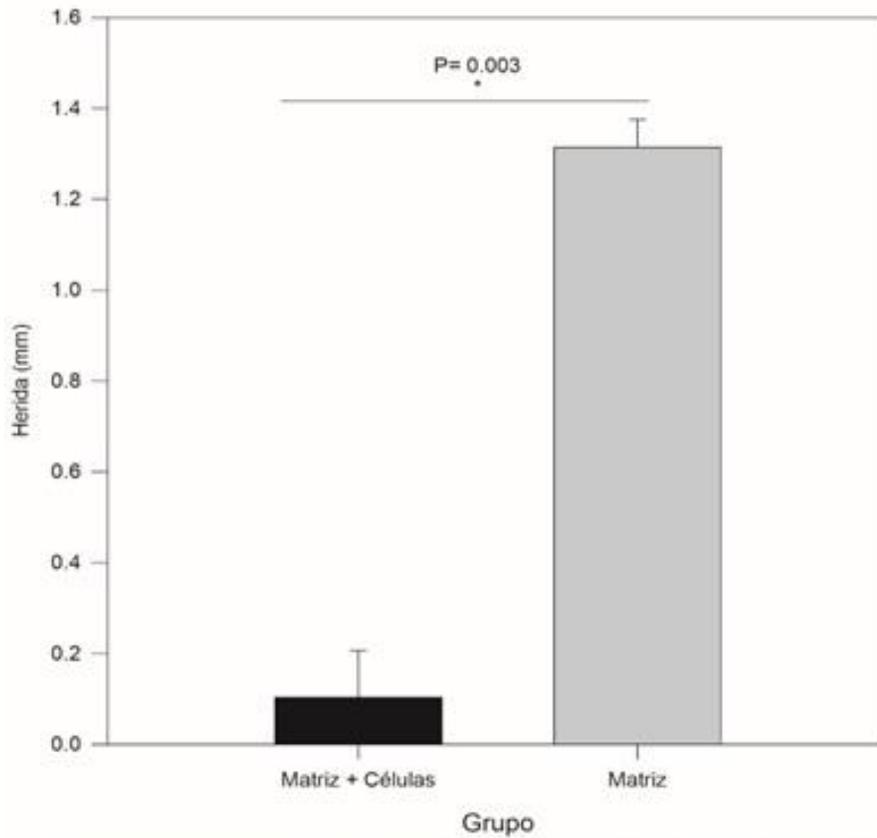
## Matriz + Células VS PBS + Células. Día 9



Microscopio Digital Portátil 20x-800x

**Figura 20. Gráfica de matriz + células vs PBS + células día 9.** Se observa la gráfica de barras de los grupos matriz + células vs PBS + células día 9 donde se ve una diferencia significativa con un valor de  $P= 0.041$ , así mismo se observa una imagen digital del tamaño de la herida para ver de forma visual lo que se presenta en la gráfica.

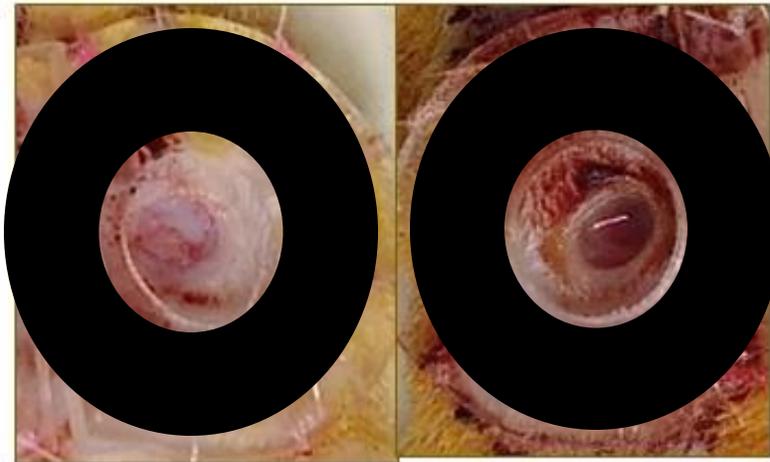
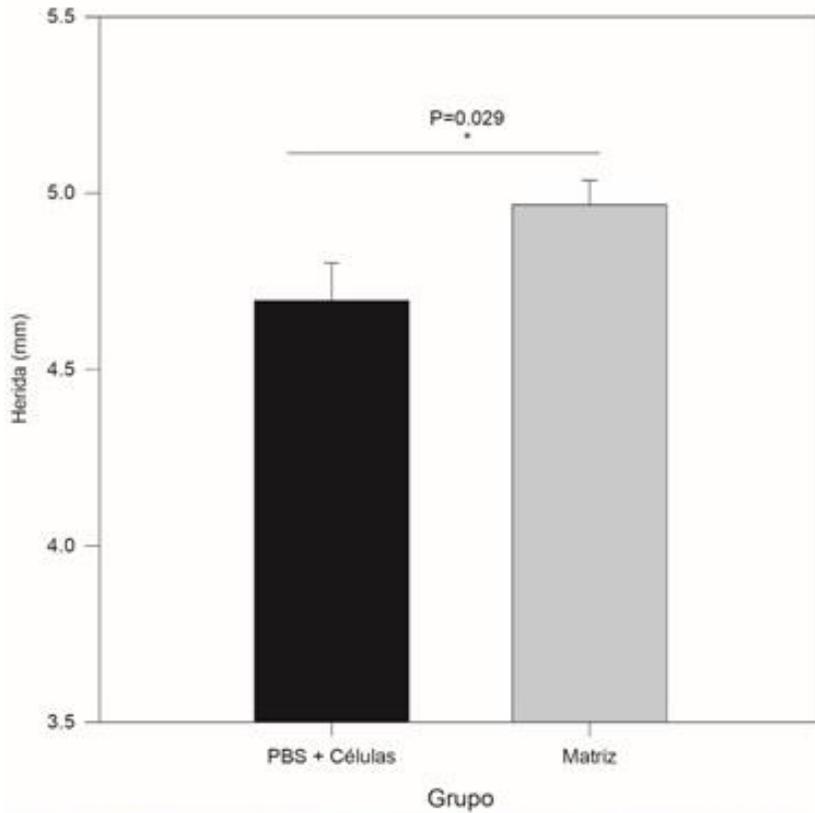
### Matriz + Células VS Matriz. Día 13



Microscopio Digital Portátil 20x-800x

**Figura 21. Gráfica de matriz + células vs matriz día 13.** Se observa la gráfica de barras de los grupos matriz + células vs matriz día 13 donde se ve una diferencia significativa con un valor de  $P= 0.003$ , así mismo se observa una imagen digital del tamaño de la herida para ver de forma visual lo que se presenta en la gráfica.

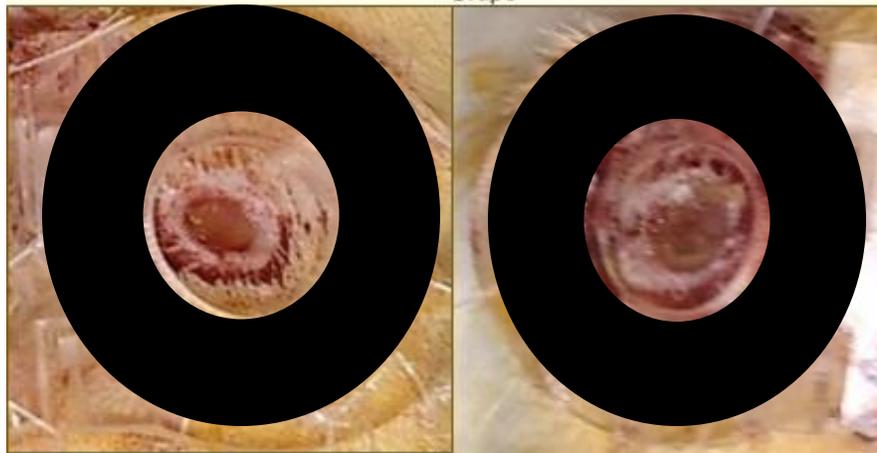
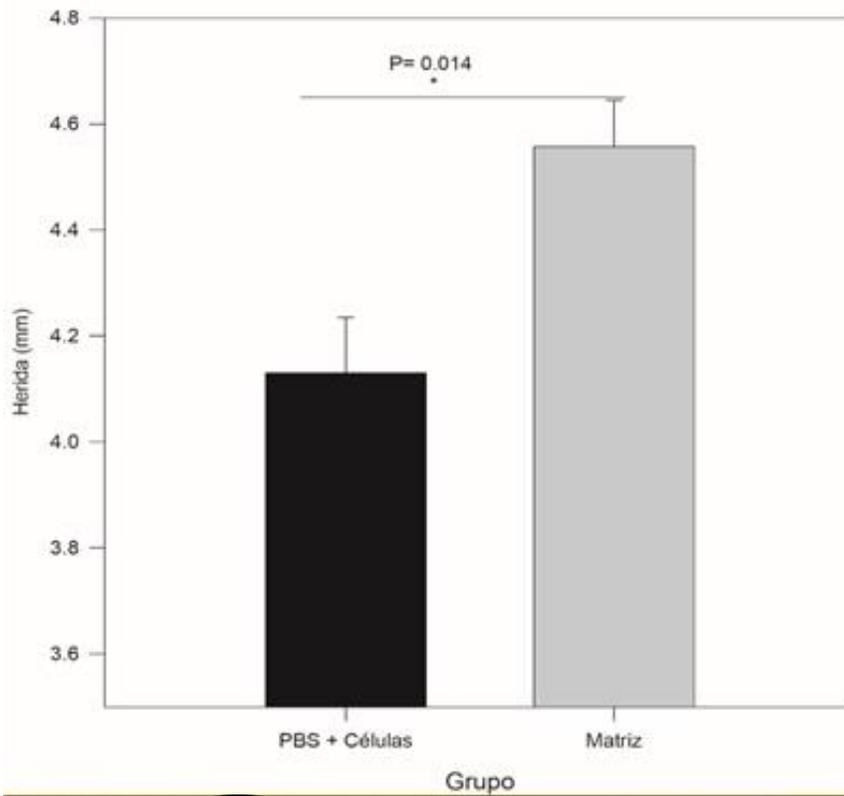
### PBS + Células VS Matriz. Día 1



Microscopio Digital Portátil 20x-800x

**Figura 22. Gráfica de PBS + células vs matriz día 1.** Se observa la gráfica de barras de los grupos PBS + células vs matriz día 1 donde se ve una diferencia significativa con un valor de  $P= 0.029$ , así mismo se observa una imagen digital del tamaño de la herida para ver de forma visual lo que se presenta en la gráfica.

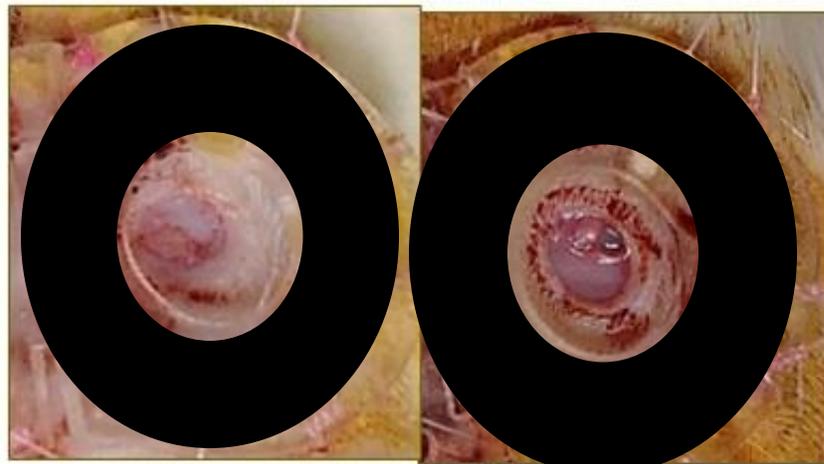
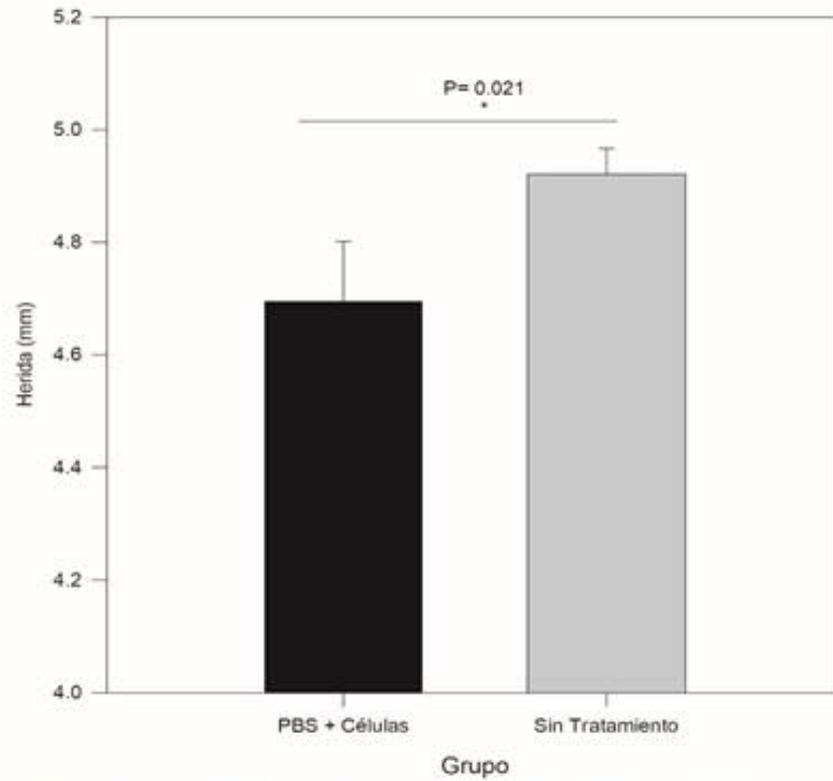
### PBS + Células VS Matriz. Día 3



Microscopio Digital Portátil 20x-800x

**Figura 23. Gráfica de PBS + células vs matriz día 3.** Se observa la gráfica de barras de los grupos PBS + células vs matriz día 3 donde se ve una diferencia significativa con un valor de  $P= 0.014$ , así mismo se observa una imagen digital del tamaño de la herida para ver de forma visual lo que se presenta en la gráfica.

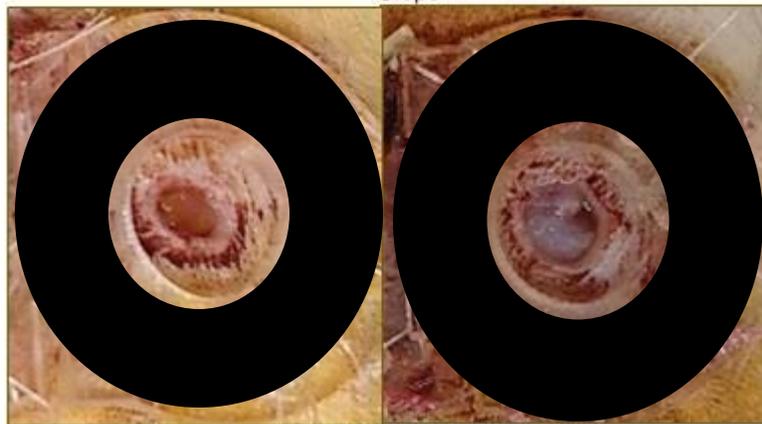
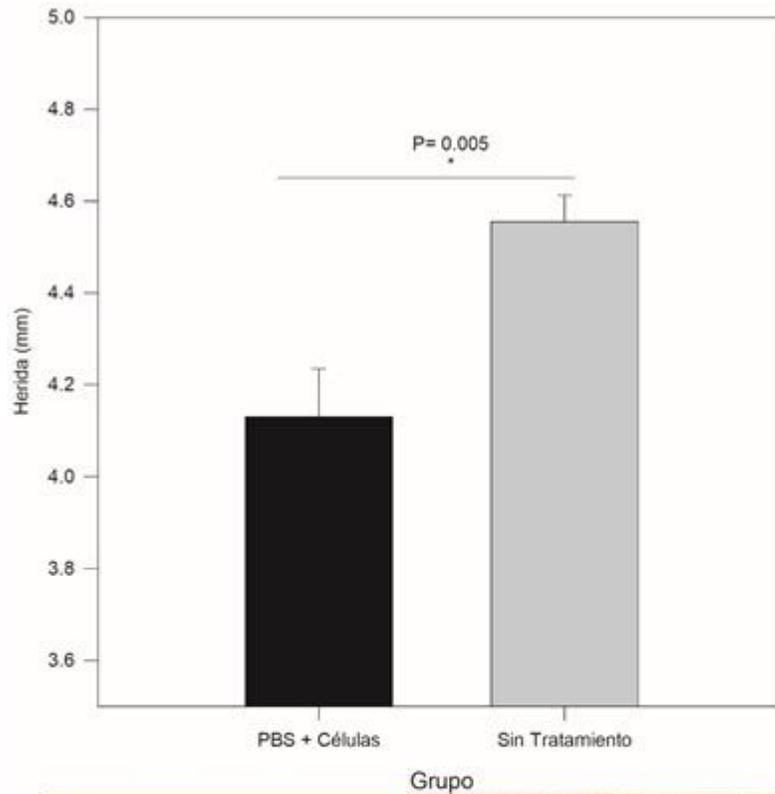
### PBS + Células VS Sin Tratamiento. Día 1



Microscopio Digital Portátil 20x-800x

**Figura 24. Gráfica de PBS + células vs sin tratamiento día 1.** Se observa la gráfica de barras de los grupos PBS + células vs sin tratamiento día 1 donde se ve una diferencia significativa con un valor de  $P= 0.021$ , así mismo se observa una imagen digital del tamaño de la herida para ver de forma visual lo que se presenta en la gráfica.

### PBS + Células VS Sin Tratamiento. Día 3

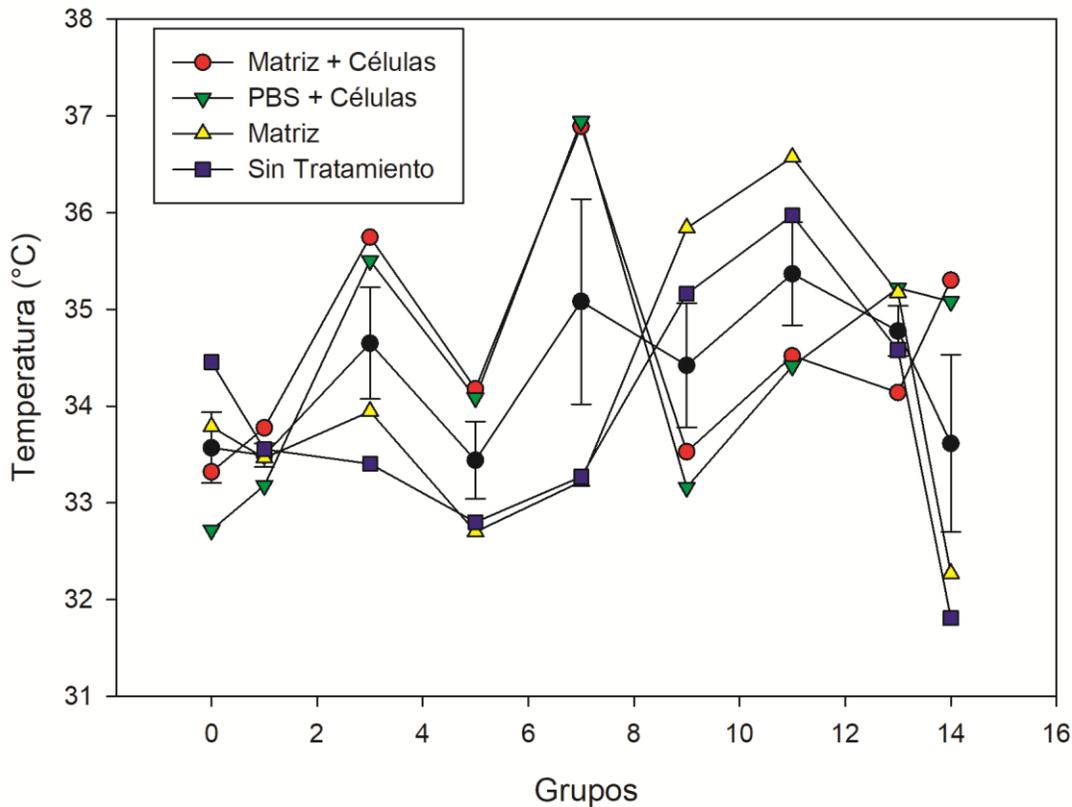


Microscopio Digital Portátil 20x-800x

**Figura 25. Gráfica de PBS + células vs sin tratamiento día 3.** Se observa la gráfica de barras de los grupos PBS + células vs sin tratamiento día 3 donde se ve una diferencia significativa con un valor de  $P= 0.005$ , así mismo se observa una imagen digital del tamaño de la herida para ver de forma visual lo que se presenta en la gráfica.

También se midió la temperatura mediante una cámara térmica infrarroja, al comparar las temperaturas de los grupos se observa un comportamiento muy variado de la temperatura a través de los días como se muestra en la figura 26.

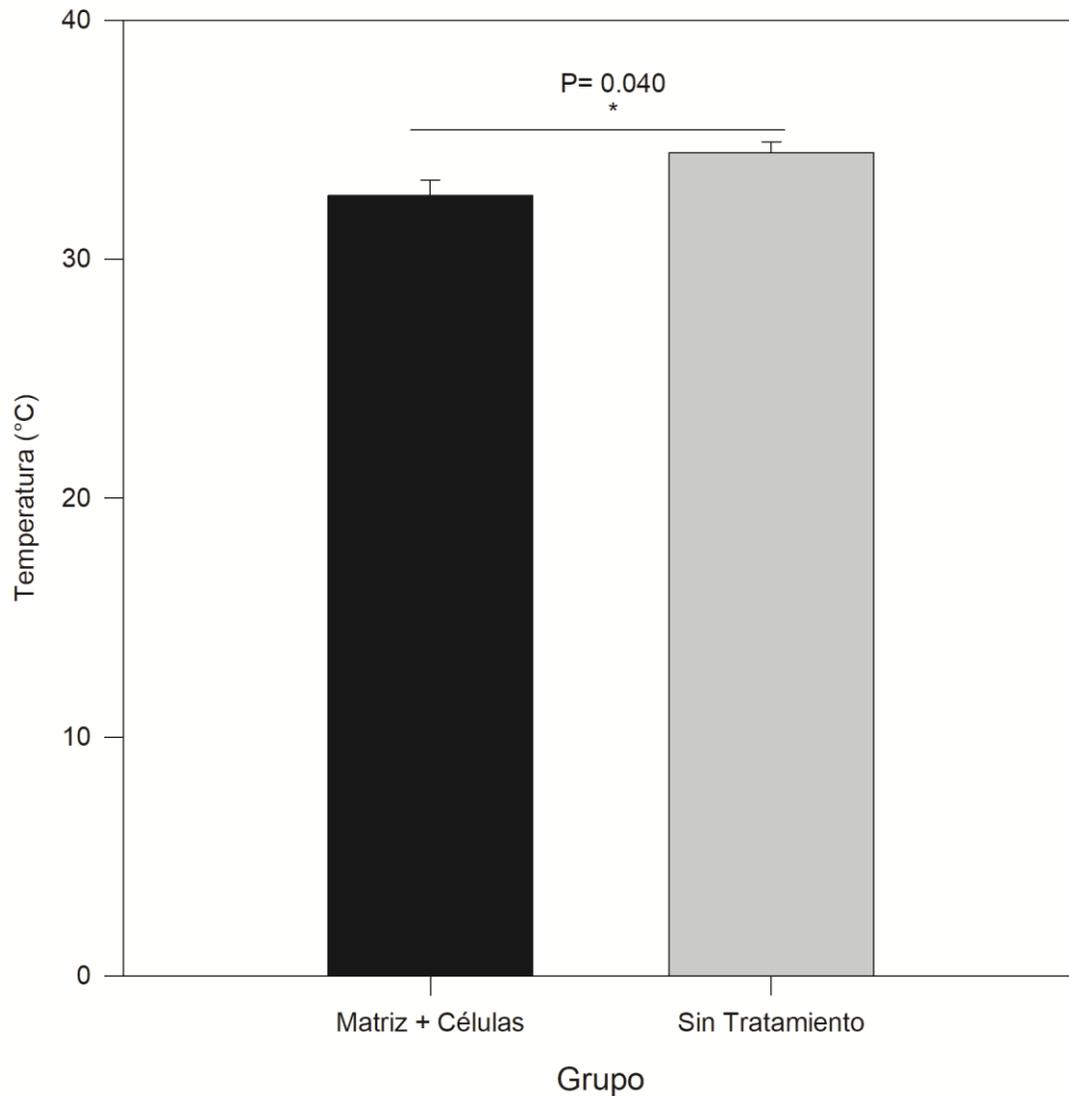
### Temperatura de los grupos de ratas



**Figura 26. Gráfica de la temperatura de todos los grupos de tratamiento.** Se observa una variación en todos los días del experimento, sin embargo se ve un patrón similar entre los grupos de matriz + células y PBS + células y otro patrón similar entre los grupos matriz y sin tratamiento.

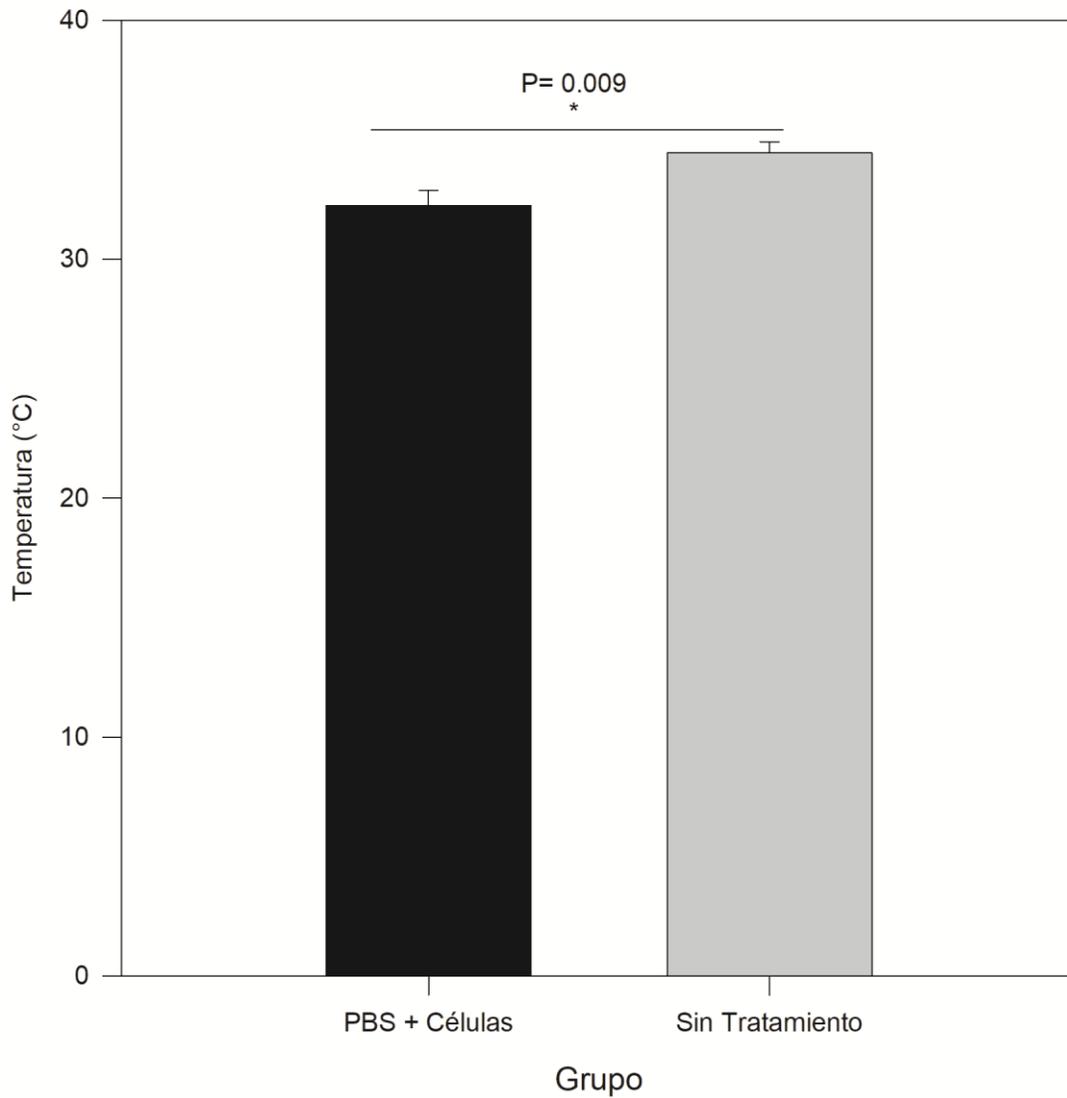
Mediante un análisis estadístico se encontró que hubo diferencias significativas entre los grupos matriz + células vs sin tratamiento al día 0 con un valor de  $P=0.040$  y otra diferencia significativa entre los grupos PBS + células vs sin tratamiento al día 0 con un valor de  $P=0.009$ . Estos resultados se muestran en las figuras 27 y 28.

## Matriz + Células vs Sin Tratamiento. Día 0



**Figura 27. Gráfica de temperatura de los grupos matriz + células vs sin tratamiento día 0.** Se observa una diferencia significativa entre ambos grupos con un valor de  $P=0.040$ .

## PBS + Células vs Sin Tratamiento. Día 0



**Figura 28. Gráfica de temperatura de los grupos PBS + células vs sin tratamiento día 0.** Se observa una diferencia significativa entre ambos grupos con un valor de  $P=0.009$ .

## DISCUSIÓN

Según la OMS, la DM es una enfermedad caracterizada por la incapacidad del cuerpo para metabolizar eficazmente la insulina, esta enfermedad se diagnostica cuando ya tiene tiempo de evolución y han aparecido complicaciones. Entre las principales complicaciones de esta enfermedad se encuentra la retinopatía diabética, neuropatía diabética, cetoacidosis diabética y pie diabético [93]. El pie diabético se define como una alteración clínica de base etiopatogénica neuropática e inducida por la hiperglucemia mantenida en la que, con o sin coexistencia de isquemia, y previo desencadenante traumático, produce lesión y/o ulceración del pie. Su desarrollo suele estar determinada por anomalías neurológicas y/o diversos grados de enfermedad vascular periférica, que le confiere una mayor susceptibilidad a presentar infección, ulceración y/o destrucción de tejidos profundos. Las úlceras del pie diabético es el principal factor de riesgo para las amputaciones no traumática en personas con diabetes [27].

Los queratinocitos, son las células más abundantes en la piel y son capaces de secretar diferentes sustancias como queratinas, y otras que estimulan el crecimiento de las células y la cicatrización. Nuestros resultados en el protocolo de aislamiento de los queratinocitos de piel, al igual que diversos estudios presentan resultados positivos de obtención de queratinocitos al utilizar bajas concentración de calcio en los medios utilizados [94, 95]. Por otro lado, los queratinocitos se obtuvieron a partir de una rata adulta, al contrario de Fengwu et al, el cual en su estudio del 2017 solo los lograron obtener a partir de ratones recién nacidos. Otro resultado interesante obtenido en la estandarización del cultivo de queratinocitos, fue la modificación en el tratamiento de los explantes previos al cultivo, mismo que no se encuentra reportado. Nuestros resultados sugieren que la técnica combinada de explantes y digestión enzimática es efectiva produciendo colonias de queratinocitos, a diferencia de Fengwu Li, quien solo utiliza el método enzimático usando la dispasa II a una concentración de 4mg/ml [96], sin embargo en la parte de la concentración enzimática nuestros resultados son similares usando la misma concentración de dispasa, lo que varía es el tiempo mientras

Fengwu Li incubó toda la noche a 4°C, nosotros lo hacemos durante 1 hora a 37°C. Por otro lado, la parte de la técnica de explantes es muy similar a la utilizada por Dragúňová J, quien reutiliza los sobrantes de la digestión enzimática con tripsina para el cultivo de queratinocitos sobre una base de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina [97], la diferencia con el nuestro es que se usa primero la dispasa para separar la dermis de la epidermis y después se utiliza la tripsina para liberar las células, después de eso se colocan los explantes en placas de 96 pozos con Keratinocyte Basal Medium sin calcio y sin ningún tipo de cubierta. A diferencia de Ling-Juan Zhang que utiliza medio KC basal medium con 0.06 mM CaCl<sub>2</sub> [98]. Y también diferente [99] a otro autor que utiliza keratinocyte serum-free medium (KSFM) [100]. Sin embargo, se asemeja a los trabajos de varios autores donde usan el mismo medio que nosotros [101-104].

Las condiciones de cultivo son muy similares entre nuestras condiciones y lo reportado por varios autores, las cuales son 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y medios bajos en calcio [105-109].

Los queratinocitos expresan diferentes queratinas a través de sus diferentes estratos, en la capa basal se pueden encontrar K5, K14 y K15, y en los estratos más superficiales se pueden encontrar K1 y K10 [110]. A lo cual nuestros resultados concuerdan con el autor anterior dando positivos en los genes mencionados. La caracterización de queratinocitos se ha realizado con éxito mediante la técnica de qPCR o PCR cuantitativa en tiempo real, resultando una forma más económica en cuanto a equipo, reactivos y material utilizado para llevar a cabo esta técnica en comparación con la citometría de flujo, sin embargo esta última es más específica [111]. Por lo tanto, nuestros resultados son válidos para la caracterización de los queratinocitos obtenidos en este trabajo y se puede afirmar que efectivamente corresponden a células de queratinocitos.

Las matrices evaluadas en este trabajo se eligieron debido a sus propiedades y usos que se le han dado en la literatura, se fueron descartando aquellas que son recomendadas para implantes de hueso como el Diacrilato de poli (etilenglicol) o aquellas matrices de sacrificio como es el caso de PCL, hasta llegar a aquellas

que han sido utilizadas en la curación de heridas, como Gelatin [112, 113], Alginato [114, 115], Chitosan [116, 117], Poli (D, L-láctido-co-glicólido. (PLGA) [118], GelMA [119-121].

Para la selección de una matriz, es de vital importancia que sean biocompatibles con las células, degradables, propiedades que los autores Li, Xiaoming et. al, mencionan son indispensables para poder ser utilizadas en distintas terapias acompañadas con células [77]. Además, los autores Xin Zhao y colaboradores, comentan que dichas matrices deben apoyar la adhesión, proliferación y diferenciación de queratinocitos y poseer propiedades mecánicas y de degradación apropiadas [122]. Lo cual concuerda con nuestros resultados obtenidos donde se evaluaron 6 matrices y la matriz ideal para el desarrollo del implante fue GelMA al 5% quien se comportó de una manera estable a los cambios de temperatura, manteniéndose siempre sólida lo cual es importante para brindar adhesión y protección a los queratinocitos. Nuestra matriz GelMA al 5% es una matriz rígida y no se degrada tan fácilmente, lo que le da tiempo a que los queratinocitos proliferen. Esto se comprobó mediante un ensayo de viabilidad el cual arrojó resultados de viabilidad por arriba de 90% lo cual concuerda con otros estudios publicados [121, 123]. Por otro lado, la capacidad de hinchamiento juega un papel importante en la regeneración tisular, ya que facilita no solo la unión, sino que también promueve la migración de las células dentro de las matrices, mientras que el poro se hincha y aumenta de diámetro. Esto ayuda a las células a crecer en un entorno tridimensional durante el cultivo in vitro, nuestra matriz obtuvo su máxima capacidad de hinchamiento a las 24 horas, alcanzando el equilibrio a las 48 horas a diferencia de Lukas Kessler, donde la combinación de matrices alcanzó el equilibrio a los 20 minutos [124].

La forma de seleccionar la técnica para cultivar las células (queratinocitos) fue gracias al estudio de viabilidad celular donde se evaluaron 2 formas de cultivar células, el primer método fue sembrándolas en la superficie de un gel de GelMA al 5% ya reticulado mediante luz UV, el cual ya ha sido utilizado exitosamente en un gel de GelMA a la misma concentración que el nuestro [122], y el otro método fue

resuspendiendo las células en la matriz GelMA al 5%, el cual también ya ha sido evaluado con las concentración de GelMA igual que nuestro trabajo [120, 124], y después proceder a reticular con luz UV. Para nuestro caso en particular se seleccionó el método que involucra resuspender y luego reticular con luz UV, debido a que se obtuvo mejor resultado de viabilidad y también gracias a las ventajas adicionales que adquiere el implante como adaptarse a la forma de la lesión y además es un método más efectivo de asegurarse que las células se distribuyen en todo el implante y no únicamente en la superficie.

Existen diferentes modelos *in vivo* para evaluar la cicatrización de heridas, por lo tanto, diferentes especies animales han sido utilizadas como cerdos, conejos, ratones y ratas, los roedores son más utilizados, debido a su costo relativamente bajo, su fácil manejo, se requiere poco espacio para mantenerlos en óptimas condiciones y además de que tienen procesos muy acelerados de cicatrización comparados con los humanos [125-127].

El modelo utilizado de ratas *Sprague Dawley* para la cicatrización de heridas en este trabajo ya ha sido utilizado en otros estudios por diferentes científicos [123, 128-130].

Todos los modelos escisionales de heridas en los roedores cicatrizan por contracción [131]. Sin embargo, en nuestro trabajo se redujo al mínimo este proceso mediante la utilización de un dispositivo diseñado por nuestro grupo de trabajo. En cuanto al modelo de cicatrización de herida, se obtuvieron diferentes resultados en comparación con otros métodos utilizados por otros grupos de trabajo como el uso de catgut para evitar el cierre de la herida [132]. Esto fue posible en gran medida, debido a un dispositivo plástico diseñado por nuestro grupo de trabajo el cual no permitía el cierre por contracción de la herida generada en el dorso de los animales [133]. Al igual que el estudio de Gal et. al. en el 2008, en el cual utilizo corticosteroides en un modelo de herida con ratas diabéticas, entre 13 y 14 días fue el tiempo que transcurrió para que se cicatrizara y cerrara completamente la herida de las ratas de nuestro modelo [134]. Nuestro dispositivo utilizado para evitar el cierre por contracción es más confiable debido a que está

unido al cuerpo del animal mediante suturas quirúrgicas y es de un material rígido, caso contrario con otros autores donde utilizan un tipo de parche de un material suave y moldeable con la misma finalidad que la nuestra, pero menos confiable debido al diseño del dispositivo y a las características ya mencionadas [127].

La mayoría de los autores que realizan las heridas en modelos murinos utilizan un biopsy punch o sacabocado para realizar la herida de manera uniforme, con un diámetro hecho a la medida deseada por el investigador y además resulta en un método sencillo y eficaz, lo único que difiere es el diámetro, algunos lo hacen de 2 mm, 4mm, 5 mm y 6 mm [125, 127, 131]. Para nuestro estudio se seleccionó un biopsy punch con un diámetro de 5 mm.

Los resultados obtenidos en esta investigación son muy favorables en la cicatrización de lesiones tisulares, al comprobar el efecto que tiene la matriz con queratinocitos en comparación con la matriz sola y sin tratamiento, sin embargo, unas de sus principales limitaciones sería la falta de la evaluación del implante generado en un modelo establecido de ratas diabéticas con un número representativo de animales bajo las mismas condiciones experimentales que esta investigación, esto para ver su comportamiento en heridas diabéticas. Con esto se comprobaría que el implante generado tendría un potencial uso en lesiones tisulares causadas por pie diabético.

## **CONCLUSIÓN**

- 1.- Se obtuvo eficientemente un cultivo primario de queratinocitos a partir de biopsias de oreja de rata adulta.
- 2.- La matriz GelMA cuenta con las características biológicas favorables para el adecuado crecimiento y supervivencia de los queratinocitos obtenidos de oreja de rata.
- 3.- El implante de GelMA suplementado con queratinocitos favorece la regeneración y cicatrización de lesiones tisulares en un modelo murino de herida.

## **PERSPECTIVAS**

- 1.- Analizar los resultados de las tinciones histológicas realizadas al implante en los grupos de estudio evaluados.
2. Evaluar el implante generado en ratas jóvenes con DM, en las cuales se desarrolle el modelo de herida, para evaluar su efecto en condiciones similares a las causadas por la enfermedad objeto de estudio.
- 3.- Realizar la evaluación del implante suplementado con factores de crecimiento.

## Referencias

1. Saavedra, J.S., *Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular*, in *Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular* McGRAW-HILL, Editor. 2014.
2. Manuel Megías, P.M., Manuel A. Pombal, *Tipos celulares QUERATINOCITO*, in *Atlas de Histología Vegetal y Animal*. 2018.
3. Gerard J. Tortora, B.D., *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11 ed. 2006.
4. Meditip. *Análisis de las tres capas de la piel: estructura, función y trastornos*. 2019; Available from: <https://www.meditip.lat/el-cuerpo-humano/tres-capas-de-la-piel/>.
5. Peña, D.A., *Atlas de dermatología del pie*. 2007.
6. M<sup>a</sup> PILAR RODRÍGUEZ GARCÍA, R.A.C.D.P. 2013.
7. C. Guyton, J.E.H., *Tratado de fisiología médica*. 11 ed. 2006.
8. Baroni, A., et al., *Structure and function of the epidermis related to barrier properties*. Clin Dermatol, 2012. **30**(3): p. 257-62.
9. Pajoum Shariati, S.R., et al., *In vitro co-culture of human skin keratinocytes and fibroblasts on a biocompatible and biodegradable scaffold*. Iran Biomed J, 2009. **13**(3): p. 169-77.
10. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(2): p. 231-41.
11. Bouwstra, J.A., et al., *Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(1): p. 1-36.
12. Wickett, R.R. and M.O. Visscher, *Structure and function of the epidermal barrier*. American Journal of Infection Control, 2006. **34**(10): p. S98-S110.
13. Cumberbatch, M., et al., *Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens*. APMIS, 2003. **111**(7-8): p. 797-804.
14. Heck, D.E., et al., *Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **195**(3): p. 288-97.
15. Pieri, L., L. Domenici, and P. Romagnoli, *Langerhans cells differentiation: a three-act play*. Ital J Anat Embryol, 2001. **106**(1): p. 47-69.
16. Werner, S., T. Krieg, and H. Smola, *Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(5): p. 998-1008.
17. Sorrell, J.M. and A.I. Caplan, *Fibroblast heterogeneity: more than skin deep*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 5): p. 667-75.
18. Sorrell, J.M., M.A. Baber, and A.I. Caplan, *Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes*. J Cell Physiol, 2004. **200**(1): p. 134-45.
19. Sriram, G., P.L. Bigliardi, and M. Bigliardi-Qi, *Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro*. Eur J Cell Biol, 2015. **94**(11): p. 483-512.
20. Michael H. Ross, W.P., *Histología*. reimpressa ed. 2007.
21. Gutiérrez, R.R., *Conocimientos Fundamentales Debiología*. Vol. 1. 2006.
22. Roop, D., *Defects in the barrier*. Science, 1995. **267**(5197): p. 474-5.

23. Nemes, Z. and P.M. Steinert, *Bricks and mortar of the epidermal barrier*. Exp Mol Med, 1999. **31**(1): p. 5-19.
24. Baltzis, D., I. Eleftheriadou, and A. Veves, *Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights*. Adv Ther, 2014. **31**(8): p. 817-36.
25. Santoro, M.M. and G. Gaudino, *Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing*. Exp Cell Res, 2005. **304**(1): p. 274-86.
26. Erem, C., et al., *Coagulation and fibrinolysis parameters in type 2 diabetic patients with and without diabetic vascular complications*. Med Princ Pract, 2005. **14**(1): p. 22-30.
27. Chhabra, S., et al., *Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS*. J Maxillofac Oral Surg, 2017. **16**(4): p. 403-423.
28. Werner, S. and R. Grose, *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol Rev, 2003. **83**(3): p. 835-70.
29. Xiao, J., et al., *Cytokines and diabetes research*. J Diabetes Res, 2014. **2014**: p. 920613.
30. Pradhan, L., et al., *Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing*. Expert Rev Mol Med, 2009. **11**: p. e2.
31. Falanga, V., *Wound healing and its impairment in the diabetic foot*. Lancet, 2005. **366**(9498): p. 1736-43.
32. Lan, C.C., et al., *Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes*. Br J Dermatol, 2008. **159**(5): p. 1103-15.
33. Galiano, R.D., et al., *Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells*. Am J Pathol, 2004. **164**(6): p. 1935-47.
34. Lobmann, R., G. Schultz, and H. Lehnert, *Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications*. Diabetes Care, 2005. **28**(2): p. 461-71.
35. Maione, A.G., et al., *Altered ECM deposition by diabetic foot ulcer-derived fibroblasts implicates fibronectin in chronic wound repair*. Wound Repair Regen, 2016. **24**(4): p. 630-43.
36. Perez-Favila, A., et al., *Current Therapeutic Strategies in Diabetic Foot Ulcers*. Medicina (Kaunas), 2019. **55**(11).
37. Bi, X., J. Lim, and C.J. Henry, *Spices in the management of diabetes mellitus*. Food Chem, 2016. **217**: p. 281-93.
38. Association., A.D. *Diabetes Basics*. 2015 [cited 2018 14022018]; Available from: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/>.
39. Federation, I.D., *IDF Diabetes Atlas*. 2017, International Diabetes Federation: Brussels, Belgium. p. 150.
40. Salud, S.d., *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*. 2017: p. 151.
41. Salud, S.d., *DIAGNOSTICO ESTATAL SECTORIAL DE SALUD 2017*. 2017.
42. INEGI. 2016.

43. Driver, V.R., et al., *The costs of diabetic foot: the economic case for the limb salvage team*. J Vasc Surg, 2010. **52**(3 Suppl): p. 17S-22S.
44. Lugo-Palacios, D.G., J. Cairns, and C. Masetto, *Measuring the burden of preventable diabetic hospitalisations in the Mexican Institute of Social Security (IMSS)*. BMC Health Serv Res, 2016. **16**: p. 333.
45. *Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance*. National Diabetes Data Group. Diabetes, 1979. **28**(12): p. 1039-57.
46. Forbes, J.M. and M.E. Cooper, *Mechanisms of diabetic complications*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 137-88.
47. *Standards of medical care in diabetes--2011*. Diabetes Care, 2011. **34 Suppl 1**: p. S11-61.
48. Bhattacharjee, N., et al., *Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets: An update*. Eur J Pharmacol, 2016. **791**: p. 8-24.
49. Mehrabzadeh, M., et al., *Association between ELMO1 gene polymorphisms and diabetic nephropathy in an Iranian population*. J Diabetes Metab Disord, 2015. **15**: p. 43.
50. Yao, Y., et al., *Renal functional responses in diabetic nephropathy following chronic bilateral renal denervation*. Auton Neurosci, 2016.
51. Donnelly, R., et al., *ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes*. BMJ, 2000. **320**(7241): p. 1062-6.
52. Hanewinkel, R., M.A. Ikram, and P.A. Van Doorn, *Peripheral neuropathies*. Handb Clin Neurol, 2016. **138**: p. 263-82.
53. Kluding, P.M., et al., *Physical Training and Activity in People With Diabetic Peripheral Neuropathy: Paradigm Shift*. Phys Ther, 2016.
54. Jane, S.W., et al., *Prevalence, discomfort and self-relief behaviours of painful diabetic neuropathy in Taiwan: a cross-sectional study*. BMJ Open, 2016. **6**(10): p. e011897.
55. Lozano-Platonoff, A., et al., *[The gold standard in diabetic foot treatment: total contact cast]*. Gac Med Mex, 2014. **150**(1): p. 58-64.
56. Rathur, H.M. and A.J. Boulton, *The diabetic foot*. Clin Dermatol, 2007. **25**(1): p. 109-20.
57. Boulton, A.J., et al., *The global burden of diabetic foot disease*. Lancet, 2005. **366**(9498): p. 1719-24.
58. Boulton, A.J., *Diabetic neuropathy and foot complications*. Handb Clin Neurol, 2014. **126**: p. 97-107.
59. Hernández-Ávila, M., J.P. Gutiérrez, and N. Reynoso-Noverón, *Diabetes mellitus en México: El estado de la epidemia*. Salud Publica Mex, 2013. **55**: p. s129-s136.
60. Boulton, A.J., *The pathway to foot ulceration in diabetes*. Med Clin North Am, 2013. **97**(5): p. 775-90.
61. López-Antuñano, S. and F.J. López-Antuñano, *Diabetes mellitus y lesiones del pie*. Salud Pública de México, 1998. **40**: p. 281-292.
62. Blanes JI., L.I., Morillas C., Nogueira JM., Hernández A., *Fisiopatología, in Tratado de pie diabético*, J. editores, Editor. 2002. p. 19-32.

63. Hurlow, J.J., et al., *Diabetic foot infection: A critical complication*. Int Wound J, 2018. **15**(5): p. 814-821.
64. Diamantopoulos, E.J., et al., *Management and outcome of severe diabetic foot infections*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1998. **106**(4): p. 346-52.
65. Rahim, K., et al., *Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds*. Microb Ecol, 2017. **73**(3): p. 710-721.
66. Apelqvist, J., *Diagnostics and treatment of the diabetic foot*. Endocrine, 2012. **41**(3): p. 384-97.
67. Tantu, M.M., et al., *Diabetic foot - epidemiological and histopathological aspects*. Rom J Morphol Embryol, 2018. **59**(3): p. 895-902.
68. Garrido Calvo, A.M., P. Cía Blasco, and P.J. Pinós Laborda, *el pie diabético*. Medicina Integral.
69. Rincón, Y., et al., *Evaluación y tratamiento del pie diabético*. Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo, 2012. **10**: p. 176-187.
70. Markakis, K., F.L. Bowling, and A.J. Boulton, *The diabetic foot in 2015: an overview*. Diabetes Metab Res Rev, 2016. **32 Suppl 1**: p. 169-78.
71. Blakely, M., *The Use of Best Practice in the Treatment of a Complex Diabetic Foot Ulcer: A Case Report*. Healthcare (Basel), 2016. **4**(1).
72. Dinh, T.L. and A. Veves, *The efficacy of Apligraf in the treatment of diabetic foot ulcers*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(7 Suppl): p. 152S-157S; discussion 158S-159S.
73. Bowling, F.L., S.T. Rashid, and A.J. Boulton, *Preventing and treating foot complications associated with diabetes mellitus*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(10): p. 606-16.
74. RM, N., *Cellular engineering*. Springer 1991. **19**: p. 529-545.
75. Ehrenreich, M. and Z. Ruzszzak, *Update on tissue-engineered biological dressings*. Tissue Eng, 2006. **12**(9): p. 2407-24.
76. Kaushik, G., J. Leijten, and A. Khademhosseini, *Concise Review: Organ Engineering: Design, Technology, and Integration*. Stem Cells, 2016.
77. Li, X., et al., *3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application*. International Journal of Polymer Science, 2014. **2014**: p. 13.
78. García Villegas, C. and M.M. Vidarte Pastrana, *INFORME 1. ESTADO DEL ARTE DE LA BIOIMPRESIÓN 3D*.
79. Colorado, A.C., C.A. Agudelo, and M.E. Moncada A., *ANÁLISIS DE BIOMATERIALES PARA USO EN INGENIERÍA DE TEJIDO DE PIEL: REVISIÓN*. Revista Ingeniería Biomédica, 2013. **7**: p. 11-23.
80. Skardal, A. and A. Atala, *Biomaterials for integration with 3-D bioprinting*. Ann Biomed Eng, 2015. **43**(3): p. 730-46.
81. Rodak, B.F., *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. 2005.
82. GeneCards, *GeneCards*. 1997.
83. Vanlandewijck, M., et al., *Functional Characterization of Germline Mutations in PDGFB and PDGFRB in Primary Familial Brain Calcification*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0143407.
84. Boor, P., et al., *PDGF-C Mediates Glomerular Capillary Repair*. The American Journal of Pathology, 2010. **177**(1): p. 58-69.

85. Crawford, Y., et al., *PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(1): p. 21-34.
86. Li, X., et al., *Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(1): p. 118-27.
87. Karvinen, H., et al., *PDGF-C and -D and their receptors PDGFR-alpha and PDGFR-beta in atherosclerotic human arteries*. *Eur J Clin Invest*, 2009. **39**(4): p. 320-7.
88. Uutela, M., et al., *PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis*. *Blood*, 2004. **104**(10): p. 3198-204.
89. Bowen-Pope, D.F. and E.W. Raines, *History of discovery: platelet-derived growth factor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(11): p. 2397-401.
90. Bennett, S.P., et al., *Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers*. *Br J Surg*, 2003. **90**(2): p. 133-46.
91. Nayak, S., S. Dey, and S.C. Kundu, *Skin equivalent tissue-engineered construct: co-cultured fibroblasts/ keratinocytes on 3D matrices of sericin hope cocoons*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74779.
92. Hart, C.E., A. Loewen-Rodriguez, and J. Lessem, *Dermagraft: Use in the Treatment of Chronic Wounds*. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2012. **1**(3): p. 138-141.
93. Bravo, J.J., *Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento*. *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 2001(3).
94. Pirrone, A., B. Hager, and P. Fleckman, *Primary mouse keratinocyte culture*. *Methods Mol Biol*, 2005. **289**: p. 3-14.
95. Jones, J.C., *Isolation and culture of mouse keratinocytes*. *CSH Protoc*, 2008. **2008**: p. pdb prot4476.
96. Li, F., C.A. Adase, and L.J. Zhang, *Isolation and Culture of Primary Mouse Keratinocytes from Neonatal and Adult Mouse Skin*. *J Vis Exp*, 2017(125).
97. Dragunova, J., P. Kabat, and J. Koller, *Skin explant cultures as a source of keratinocytes for cultivation*. *Cell Tissue Bank*, 2013. **14**(2): p. 317-24.
98. Zhang, L.J., *Isolation, Culture, and Characterization of Primary Mouse Epidermal Keratinocytes*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1940**: p. 205-215.
99. Lee, J.H., et al., *Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model*. *Phytomedicine*, 2012. **19**(13): p. 1223-7.
100. Johansen, C., *Generation and Culturing of Primary Human Keratinocytes from Adult Skin*. *J Vis Exp*, 2017(130).
101. Lamb, R. and C.A. Ambler, *Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e52494.
102. Mollo, M.R., et al., *p63-dependent and independent mechanisms of nectin-1 and nectin-4 regulation in the epidermis*. *Exp Dermatol*, 2015. **24**(2): p. 114-9.

103. Ramirez, V.P., W. Krueger, and B.J. Aneskievich, *TNIP1 reduction of HSPA6 gene expression occurs in promoter regions lacking binding sites for known TNIP1-repressed transcription factors*. *Gene*, 2015. **555**(2): p. 430-7.
104. Kim, H.J., et al., *Transcriptome analysis of airborne PM2.5-induced detrimental effects on human keratinocytes*. *Toxicol Lett*, 2017. **273**: p. 26-35.
105. Lee, W., et al., *Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication*. *Biomaterials*, 2009. **30**(8): p. 1587-95.
106. Orazizadeh, M., et al., *Comparison of the enzymatic and explant methods for the culture of keratinocytes isolated from human foreskin*. *Biomed Rep*, 2015. **3**(3): p. 304-308.
107. Hawley-Nelson, P., et al., *Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture*. *J Invest Dermatol*, 1980. **75**(2): p. 176-82.
108. Yano, S. and H. Okochi, *Long-term culture of adult murine epidermal keratinocytes*. *Br J Dermatol*, 2005. **153**(6): p. 1101-4.
109. Hager, B., J.R. Bickenbach, and P. Fleckman, *Long-term culture of murine epidermal keratinocytes*. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(6): p. 971-6.
110. Pastar, I., et al., *Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review*. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2014. **3**(7): p. 445-464.
111. Borowiec, A.S., et al., *Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e77507.
112. Ogino, S., et al., *Efficacy of the dual controlled release of HGF and bFGF impregnated with a collagen/gelatin scaffold*. *J Surg Res*, 2018. **221**: p. 173-182.
113. Jang, H.J., et al., *Wound-healing effects of human dermal components with gelatin dressing*. *J Biomater Appl*, 2018. **32**(6): p. 716-724.
114. Summa, M., et al., *A biocompatible sodium alginate/povidone iodine film enhances wound healing*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018. **122**: p. 17-24.
115. Golafshan, N., et al., *Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material*. *Carbohydr Polym*, 2017. **176**: p. 392-401.
116. Campani, V., et al., *Chitosan Gel to Treat Pressure Ulcers: A Clinical Pilot Study*. *Pharmaceutics*, 2018. **10**(1).
117. Berce, C., et al., *Cutaneous wound healing using polymeric surgical dressings based on chitosan, sodium hyaluronate and resveratrol. A preclinical experimental study*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2018. **163**: p. 155-166.
118. Lee, P.Y., et al., *Thermosensitive hydrogel PEG-PLGA-PEG enhances engraftment of muscle-derived stem cells and promotes healing in diabetic wound*. *Mol Ther*, 2007. **15**(6): p. 1189-94.
119. Kim, J.W., et al., *Fabrication of bi-layer scaffold of keratin nanofiber and gelatin-methacrylate hydrogel: Implications for skin graft*. *Int J Biol Macromol*, 2017. **105**(Pt 1): p. 541-548.
120. Eke, G., et al., *Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering*. *Biomaterials*, 2017. **129**: p. 188-198.

121. Zhao, X., et al., *Cell infiltrative hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing*. Acta Biomater, 2017. **49**: p. 66-77.
122. Zhao, X., et al., *Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering*. Adv Healthc Mater, 2016. **5**(1): p. 108-18.
123. Zhang, X., et al., *Coculture of mesenchymal stem cells and endothelial cells enhances host tissue integration and epidermis maturation through AKT activation in gelatin methacryloyl hydrogel-based skin model*. Acta Biomater, 2017. **59**: p. 317-326.
124. Kessler, L., et al., *Methacrylated gelatin/hyaluronan-based hydrogels for soft tissue engineering*. J Tissue Eng, 2017. **8**: p. 2041731417744157.
125. Michaels, J.t., et al., *db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model*. Wound Repair Regen, 2007. **15**(5): p. 665-70.
126. Plum, L., et al., *Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 152-61.
127. Mendes, J.J., et al., *A rat model of diabetic wound infection for the evaluation of topical antimicrobial therapies*. Comp Med, 2012. **62**(1): p. 37-48.
128. Shi, R., et al., *Localization of human adipose-derived stem cells and their effect in repair of diabetic foot ulcers in rats*. Stem Cell Res Ther, 2016. **7**(1): p. 155.
129. McLaughlin, P.J., et al., *Topical Naltrexone Is a Safe and Effective Alternative to Standard Treatment of Diabetic Wounds*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2017. **6**(9): p. 279-288.
130. Li, X., et al., *Negative pressure wound therapy accelerates rats diabetic wound by promoting ageneses*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(3): p. 3506-13.
131. Galiano, R.D., et al., *Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing*. Wound Repair Regen, 2004. **12**(4): p. 485-92.
132. Molina Martínez, J.L.M.P., Vianka; Pérez Castillo, Olga; Castro Gutierrez,, O.J.C.C. Maribel; López Bernal, María Guadalupe; Batista, and N.E.H.R. Hernández, Danay *Implante de catgut para cicatrización de heridas inducidas (Modelo de cicatrización en la rata)*. 2016.
133. Grada, A., J. Mervis, and V. Falanga, *Research Techniques Made Simple: Animal Models of Wound Healing*. J Invest Dermatol, 2018. **138**(10): p. 2095-2105 e1.
134. P. Gal, K., R, M. Mokry, B. Vidinsky, T. Vasilenko, S. Mozes, N. Bobrov, Z. Tomori, J. Bober, L. Lenhardt, *Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments*. 2008.

## ANEXOS

### Artículos científicos publicados en revistas internacionales indexadas

1. Current Therapeutic Strategies in Diabetic Foot Ulcers. **Perez-Favila A**, Martinez-Fierro ML, Rodriguez-Lazalde JG, Cid-Baez MA, Zamudio-Osuna MJ, Martinez-Blanco MDR, Mollinedo-Montaña FE, Rodriguez-Sanchez IP, Castañeda-Miranda R, Garza-Veloz I. 2019.
2. Diabetic Foot Ulcers: Current Advances in Antimicrobial Therapies and Emerging Treatments. Ramirez-Acuña JM, Cardenas-Cadena SA, Marquez-Salas PA, Garza-Veloz I, **Perez-Favila A**, Cid-Baez MA, Flores-Morales V, Martinez-Fierro ML.
3. Matrix metalloproteinase multiplex screening identifies increased MMP-2 urine concentrations in women predicted to develop preeclampsia. Martinez-Fierro ML, **Perez-Favila A**, Garza-Veloz I, Espinoza-Juarez MA, Avila-Carrasco L, Delgado-Enciso I, Ortiz-Castro Y, Cardenas-Vargas E, Cid-Baez MA, Ramirez-Santoyo RM, Cervantes-Kardasch VH, Rodriguez-Sanchez IP, Badillo-Almaraz JI, Castañeda-Miranda R, Solis-Sanchez LO, Ortiz-Rodriguez JM.

### Presentación del trabajo en eventos científicos locales y nacionales

1. **Congreso:** XXIX Congreso Nacional de Investigación en Medicina, Facultad de Medicina UANL, “Evaluación urinaria y plasmática de 34 proteínas como predictores de riesgo de preeclampsia”.
2. **Congreso:** Jornadas médicas UAZ, Modelo in silico para la caracterización de queratinocitos aislados de ratón. 31 marzo 2017.
3. **Congreso:** Jornadas medicas UAZ: Identificación de variantes polimórficas funcionales de la región promotora del gen de la metaloproteasa 2 en mujeres con preeclampsia. 30 marzo 2017.

### Asistencia a cursos y talleres

**Curso:** Taller de Implementación de un Sistema de Calidad bajo la Norma ISO 9001:2015 en el Laboratorio de Medicina Molecular, UAMH y CS, junio 2017.

**Curso:** Taller de Metodología de 5´S de calidad en el Laboratorio de Medicina Molecular, UAMH y CS, junio 2017.

**Curso:** Curso en línea: Habilidades de escritura científica. Latindex, AuthorAID, 5 julio 2017.

**Curso:** Modelos animales para investigación en laboratorio, Laboratorio de Inmunología y Virología del departamento de Microbiología e Inmunología de la UANL. 3 octubre 2017.

**Curso-Taller:** Sistemas de Clasificación del Pie Diabético: Saint Elian Wound Scoring System (SEWSS) y Wounds, Ischemia and foot Infection (WIFI) (CONACyT-SALUD/FOSSIS-2016-02-273142) en modalidad taller. julio 2018. **Curso:** Generación de reportes de Investigación en el área biomédica, julio 2018.

**Taller:** Taller de Seguridad e Higiene en Laboratorio; Capacitación y Formación de Brigadas de Seguridad en el Laboratorio de Medicina Molecular, UAMH y CS, junio 2017.