



**INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA



**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

*Eficacia de las cubiertas cutáneas biológicas contra hidrofibra
con plata en el tratamiento de quemaduras de espesor parcial*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS
CIENCIAS DE LA SALUD**
Área Investigación Clínica

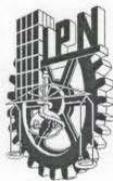
PRESENTA:

ROSA MARÍA SALGADO CURIEL

Director de Tesis INR: Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez

Director de Tesis IPN: Dr. Jesús Arrieta Valencia

Diciembre de 2011



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 13:00 horas del día 28 del mes de Octubre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

“Eficacia de las cubiertas cutáneas biológicas vs. Hidrofibra con plata en el tratamiento de quemaduras de espesor parcial”

Presentada por el alumno:

Salgado

Apellido paterno

Curiel

Apellido materno

Rosa María

Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	8	2	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias de la Salud

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

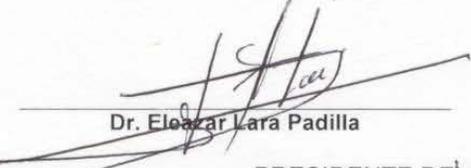
Directores de tesis


Dr. Jesús Arrieta Valencia

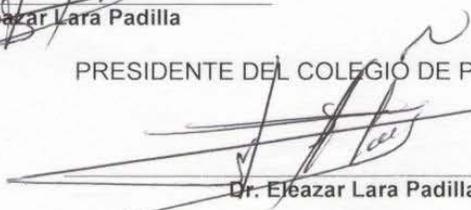

Dr. Fernando Edgar Krotzsch Gómez


Dr. Francisco Javier Flores Murrieta


Dr. Juan Rodríguez Silverio


Dr. Eleazar Lara Padilla

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **México** el día **05** del mes **Octubre** del año **2011**, el que suscribe **Rosa María Salgado Curiel** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias de la Salud** con número de registro **A100827** adscrito a **La Escuela Superior De Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Jesús Arrieta Valencia y el Dr. Fernando Edgar Krotzsch Gómez** y cede los derechos del trabajo intitulado "**Eficacia de las cubiertas cutáneas biológicas vs. Hidrofibra con plata en el tratamiento de quemaduras de espesor parcial**", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico **salgado_rm@yahoo.com.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rosa María Salgado Curiel', is written over a horizontal line.

Rosa María Salgado Curiel

Nombre y Firma

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Rehabilitación, Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados bajo la Dirección del Dr. Fernando Edgar Krötzsch Gómez.

INDICE

Glosario	6
Relación de figuras y tablas	7
Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción.....	10
2. Antecedentes	12
3. Justificación.....	24
4. Hipótesis.....	25
5. Objetivo	26
6. Materiales y Métodos	27
7. Resultados	37
8. Discusión.....	44
9. Conclusiones.....	47
10. Perspectivas.....	48
11. Bibliografía	49
12. Anexos	53
12.1. Anexo No. 1	53
12.2. Anexo No. 2	58
12.3. Anexo No. 3	68
12.4. Anexo No. 4.....	69
12.5. Anexo No. 5.....	71
12.5. Anexo No. 6.....	72

GLOSARIO

CMCNa	Carboximetilcelulosa sódica.
CMCNaAg	Carboximetilcelulosa sódica con plata iónica.
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico.
MEC	Matriz extracelular.
MMP's	Metaloproteinasas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
SCQ	Superficie Corporal Quemada.
SIS	Submucosa de Intestino de cerdo.
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1.
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial.

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1	37
Tabla 2	37
Figura 1	38
Figura 2	39
Figura 3	40
Figura 4	41
Figura 5	42
Figura 6	43
Figura 7	43

RESUMEN

Antecedentes: La adecuada cicatrización depende del uso de apósitos sintéticos o biológicos. Algunas matrices o células homólogas epiteliales contienen factores de crecimiento que proporcionan señales que promueven la remodelación dérmico-epidérmica. **Objetivo:** Evaluar la calidad del epitelio y matriz dérmica en la remodelación temprana mediante la comparación de tratamientos con apósitos sintéticos y biológicos en quemaduras parciales. **Métodos:** Se tuvieron 10 pacientes agudos, con quemadura parcial térmica de superficie corporal total o inferior al 10% pero al menos 300cm². En todos los pacientes, las lesiones se dividieron en dos áreas equivalentes una sección tratada con hidrofibra impregnado con plata (control) y en la otra sección con una suspensión de queratinocitos autólogos o submucosa intestinal de cerdo (experimental); se colocaron apósitos secundarios y después de 7 días, los pacientes fueron evaluados. Se tomaron dos biopsias de piel de espesor total al inicio y en el día 7 post-tratamiento. La evaluación clínica y histomorfológico se llevó a cabo para la arquitectura de la piel y la epitelización. **Resultados:** Clínicamente se observó la epitelización en todos los pacientes después de 7 días. Histomorfológicamente no encontramos ningún cambio en el infiltrado inflamatorio o vascularización entre los tratamientos. Sólo se observó un aumento en la colágena tipo I en los tejidos de los pacientes tratados con submucosa de intestino de cerdo. El índice de epitelización fue significativamente mayor después del tratamiento con los apósitos biológicos. En los tejidos de los pacientes tratados con hidrofibra fue evidente la hipertrofia del epitelio y la falta de papilas dérmicas. **Conclusión:** Los apósitos sintéticos o biológicos son importantes para el tratamiento de quemaduras de espesor parcial. Sin embargo, las estrategias biológicas proporcionan moléculas activas capaces de mejorar la epitelización, la arquitectura de la dermis y la calidad de la reparación. En base a estas características los apósitos biológicos son más efectivos para disminuir la estancia hospitalaria y los materiales necesarios para el tratamiento.

ABSTRACT

Background: Appropriate cutaneous wound healing depends on dressings, synthetic or biologic. Some extracellular matrices, as well as homologous epithelial cells have growth factors that provide the signals to promote epidermal and dermal remodeling. **Aim:** To evaluate the quality of the epithelium and dermal matrix after early remodeling by comparing the treatment with biological and synthetic dressings on partial thickness burns. **Methods:** Ten patients with partial thickness thermal and acute burns were recruited. Affected total body surface was less than 10%, but at least 300cm². On every patient, lesions were divided in two equivalent areas and they were treated in a section with cellulose hydrofiber impregnated with silver (control) and in the other section with a suspension of autologous keratinocytes or swine intestinal submucosa (experimental); regular dressings and bandages were placed. After 7 days, patients were evaluated and a new dressing was administered only whenever was considered. Two full thickness skin biopsies were taken at the beginning and at day 7 post-treatment. Clinical and histomorphological evaluation was performed for skin architecture and epithelialization. **Results:** Clinically we observed epithelialization in all patients after 7 days. Histomorphologically we did not find any change in inflammatory infiltrate or vascularity among the treatments. Only it was observed an increase in type I collagen in the tissues from the patients treated with swine intestinal submucosa. Epithelialization index was significant increased after the treatment with the biological dressings. In the tissues from patients treated with hydrofiber it was evident epithelial hypertrophy and lack of rete ridges. **Conclusion:** Synthetic or biological wound dressings are important for partial thickness burn treatment. Nevertheless the biological strategies are capable to supply stimulatory molecules capable to improve epithelialization, dermal architecture and quality of repair. Based on this characteristics the biological dressings are more effective to diminish hospital stay and materials needed for the treatment.

1. INTRODUCCIÓN

La piel es un órgano heterogéneo que se encuentra extendido por toda la superficie del cuerpo, es de estructura compleja y de funciones múltiples; no obstante a su resistencia, existen fenómenos físicos, químicos y biológicos que alteran su integridad, de manera que cuando se presenta una lesión de espesor parcial, caracterizada por la pérdida de epidermis y dermis papilar es necesario cubrir el área de la herida con un sustituto sintético o biológico mientras se lleva a cabo de manera propia la fase de reepitelización. Esta fase normalmente debe de iniciar unas cuantas horas después del daño, donde las células de las estructuras epiteliales residuales se mueven rápidamente a través del sitio dañado; esto es, los queratinocitos de la capa basal o los de los folículos pilosos se desplazan uno sobre el otro formando generaciones de células que a su vez se dividen, primero horizontalmente, con respecto al plano de la piel, y luego se estratifican perpendicularmente a éste. Para ello, es necesario volver a formar la lámina basal por parte de los queratinocitos donde otros grupos celulares, particularmente los del mesénquima, se involucran en el proceso por medio de la estimulación parácrina epitelial, además de la síntesis y degradación de matriz extracelular, ya que de ella depende la movilización de estirpes estimuladoras del epitelio.

Con base en lo anterior, la terapéutica actual ha considerado que la aplicación de cubiertas cutáneas de origen biológico son una opción avanzada para el tratamiento de quemaduras de espesor parcial, donde la administración de liofilizados de matriz extracelular, cultivos de queratinocitos homólogos estratificados o incluso células epiteliales autólogas en suspensión han demostrado ser eficientes. Por ejemplo, algunos liofilizados de matriz extracelular, ya sean derivados de componentes purificados de matriz o injertos heterólogos parcialmente modificados (acelulares) han demostrado tener actividad importante en el proceso de cicatrización, particularmente durante la epitelización, ya que

contienen factores de crecimiento estimuladores de la migración y proliferación epitelial a través de algunos de los fragmentos de la matriz extracelular de los cuales se obtiene una actividad semejante.

Por su parte, los epitelios autólogos u homólogos no sólo son la cubierta en sí, sino que proporcionan las señales necesarias para favorecer la remodelación epidérmica y dérmica propia.

No obstante la información existente al respecto, no existen comparaciones entre tratamientos para el manejo de quemaduras de espesor parcial que sustenten de manera contundente el efecto derivado de las diferentes estrategias biológicas y sintéticos, ya que al menos en México éstas son más accesibles en el sector salud. Asimismo, resulta fundamental conocer la calidad del epitelio y la matriz dérmica resultante de la remodelación durante las etapas tempranas del proceso, con lo que se puede aportar información que permita tomar decisiones a cerca de la estrategia terapéutica a seguir.

2. ANTECEDENTES

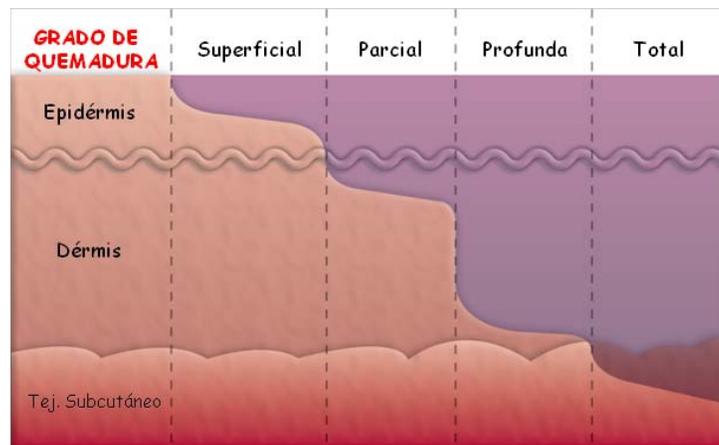
2.1 Definición de Quemadura.

Una quemadura es una lesión tisular donde se pierde la homeostasis y la integridad de la piel que puede ser provocada por varios factores como son las quemaduras térmicas (fuego directo), químicas (contacto, ingesta o inhalación de sustancias ácidas y álcalis), eléctricas (contacto con cables o líneas de alta tensión), fricción o abrasión y por radiación ultravioleta (1).

En todas las heridas por quemaduras hay muerte celular por necrosis isquémica o traumática, desnaturalización de proteínas, alteraciones de los componentes de la matriz extracelular, alteración en la presión osmótica e hidrostática del líquido intravascular al intersticio lo que provoca la extravasación y liberación de mediadores de la inflamación contribuyendo al aumento de la permeabilidad capilar y así, desencadenando el proceso de cicatrización, teniendo como objetivo reanudar la integridad y la homeostasis del tejido (2).

2.2 Clasificación de Quemaduras.

Las quemaduras se clasifican por el daño y la profundidad de la lesión en la piel afectada teniendo así quemaduras superficiales (primer grado), parciales y profundas (segundo grado) y de espesor total (tercer grado) (1,3).



Las quemaduras superficiales son lesiones que sólo afectan la epidermis y son causadas principalmente por la irradiación ultravioleta, clínicamente se observa un área eritematosa debido a la irritación del plexo vascular que se proyecta de la base de la dermis hacia la epidermis, la recuperación del tejido es por sí solo y tarda entre 3 a 5 días sin dejar algún tipo de cicatriz (3).

En cuanto a las quemaduras parciales son lesiones que se extienden a través de la epidermis hasta la dermis papilar o superficial, generalmente eritematosa debido a la inflamación presente y caracterizada por la presencia de ampollas que cuando se rompen quedan expuestas las terminaciones nerviosas generando dolor y permitiendo la infiltración de líquido intersticial en la superficie de la herida, presentando un edema moderado (2,3)

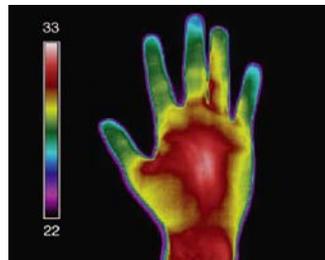
Las quemaduras profundas se extienden a diferencia de las parciales hasta la dermis reticular, generalmente eritematosa y en algunos casos puede haber ausencia de capilares. Finalmente, las quemaduras de espesor total afectan todos los sistemas y órganos del cuerpo dañando músculo e inclusive hueso. Inmediatamente después del daño se monta una respuesta metabólica e inmunológica (3).

2.3 Quemaduras térmicas.

Las quemaduras por fuego pueden causar diferentes niveles de destrucción en la piel, ya que son lesiones hipertérmicas producidas por un proceso dinámico, como en el caso de una quemadura por escaldadura (líquidos calientes), el daño ocasionado presenta lesiones de primer y segundo grado dependiendo del tiempo de exposición del agente causal originado de un derrame por líquido caliente o en el caso de niños, por la inmersión del cuerpo en agua caliente afectando regiones como los glúteos, pies, cabeza, tronco anterior y extremidades superiores (4).

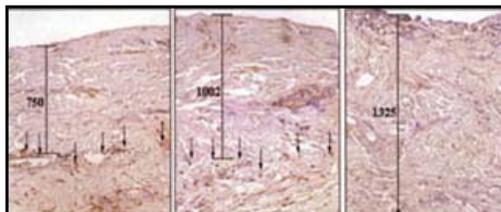
2.4 Valoración de la profundidad de las quemaduras.

La evaluación del grado de la quemadura es un factor importante a determinar ya que de ello depende el manejo terapéutico que se determine. Tradicionalmente la evaluación clínica sigue siendo la técnica más frecuente para medir la profundidad de una quemadura, sin embargo existen diferentes técnicas para conocer con más precisión del daño de la quemadura siendo estas la toma de biopsia para el procesamiento histológico, la termografía, la angiografía y técnicas de láser Doppler (5).



La técnica de toma de biopsia es considerada como el “estándar de oro” ya que permite analizar y evaluar la profundidad del daño y sirve de comparativo de otras modalidades de diagnóstico.

Esta evaluación se lleva a cabo a través de la observación del tejido teñido por hematoxilina-eosina valorando los cambios celulares y describiendo la profundidad de la quemadura al establecer el límite entre el tejido necrótico y el tejido sano presente en la muestra. Además, el conocimiento del número de vasos sanguíneos presentes nos sugiere un daño microvascular correlacionado a una quemadura parcial pero si el daño es de espesor profundo entonces se presenta la desnaturalización de las fibras de colágena (6).

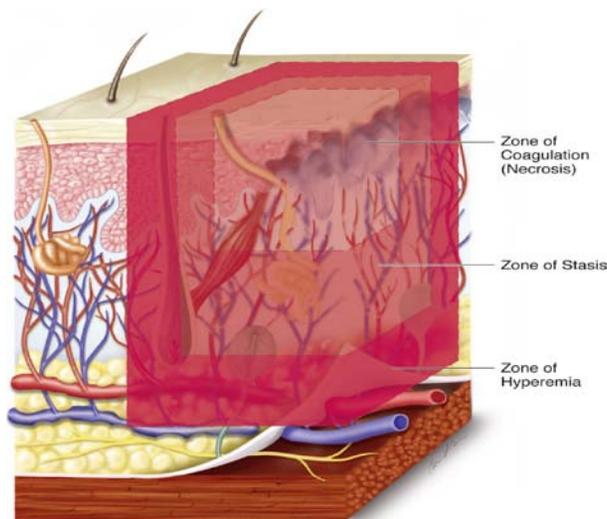


Por lo tanto aunque el análisis histológico es un buen método de evaluación no es completamente preciso por ser subjetivo además de existir error de muestreo y de no correlacionarse el daño estructural con pérdida funcional debido a la toma temprana de la biopsia.

Sin embargo, aunque la biopsia es un método de evaluación limitado es una buena opción en la investigación para la confirmación de la profundidad de una quemadura (6).

2.5 Fisiología de las quemaduras.

En 1953 se describió las tres zonas de una quemadura: la zona central de coagulación o necrosis, la zona intermedia de estasis y la zona periférica de hiperemia.

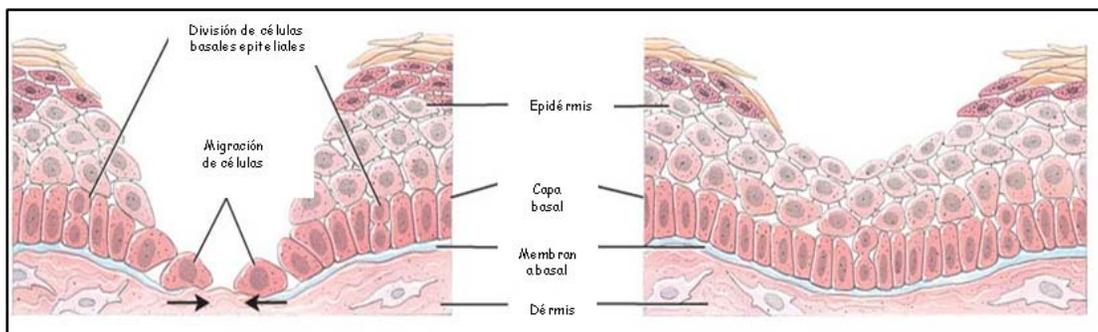


En una lesión por quemadura donde está presente la necrosis del tejido después del daño térmico, implica una inflamación con la acumulación de radicales libres junto con el depósito de neutrófilos, aumento de la permeabilidad vascular y aumento de la presión hidrostática intersticial lo que lleva al edema con congestión vascular (2).

Por lo tanto el proceso para que se lleve a cabo la cicatrización involucra tres fases, la fase de inflamación donde se presenta la formación del coagulo y liberación de citocinas proinflamatorias, la segunda fase de proliferación donde se presenta la migración de células epiteliales, proliferación de fibroblastos, aparición de miofibroblastos, depósito de matriz extracelular y angiogénesis y finalmente la fase de remodelación en donde disminuye el número celular y se presenta el recambio de las fibras de colágena (7).

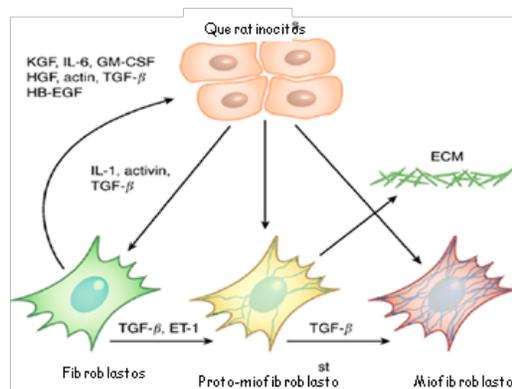
En la fase de reepitelización, los queratinocitos dependen de las señales recibidas por los fibroblastos dérmicos para restablecer la función epidérmica y esta comunicación es regulada por señales parácrinas de citocinas y otros factores.

En algunos estudios se ha demostrado que los factores derivados de la epidermis regulan la cicatrización de heridas a través de la estimulación, la migración y la proliferación de los queratinocitos de las glándulas sudoríparas, folículos pilosos y bordes de la herida así éstas células residuales se mueven rápidamente a través del sitio dañado, los queratinocitos de la capa basal o de los folículos se desplazan uno sobre otro formando generaciones de células que a su vez se dividen, primero horizontalmente a este. Para ello es necesario volver a formar la lámina basal donde otros grupos celulares, particularmente los del mesenquima, se involucran en el proceso por medio de la síntesis y degradación de matriz extracelular, ya que de ella depende la movilización de estirpes estimuladoras del epitelio (8,9).



Sin embargo cuando se presentan factores como la severidad de la lesión o presencia de infección el proceso de epitelización se ve retrasado aumentando las condiciones de desarrollar una fibrosis en un tiempo de 2-3 semanas o bien la ausencia de epitelización debido a que las células epiteliales disminuyen su proceso dinámico de cicatrización (7).

Por lo anterior, en las heridas dérmicas los queratinocitos entran en juego, proliferando y migrando a través de la herida y fagocitando restos celulares, por lo que se ha demostrado que cuando un apósito de queratinocitos cultivados se utiliza como cubierta temporal, ésta favorece la cicatrización y aumenta la epitelización. Esto debido a que en la fase de reepitelización de una herida, los queratinocitos dependen de las señales recibidas desde los fibroblastos dérmicos para restablecer el funcionamiento epidérmico en ausencia del contacto físico de la membrana basal que actúa como divisor entre la dermis y la epidermis. La comunicación queratinocitos-fibroblastos es regulada principalmente por citocinas, metaloproteinasas (MMPs) y otros factores a través de señales parácrinas entre células lo que contribuye a la reparación del tejido seguido de una herida. Sin embargo, como los queratinocitos y los fibroblastos se encuentran en capas distintas de la piel, las citocinas solubles y los factores de crecimiento son considerados mediadores de la interacción dérmica-epidérmica, así, el factor de crecimiento tumoral beta-1 ($TGF-\beta 1$) es una citocina multifuncional ya que participa en procesos tanto fisiológicos como patológicos, funciona como un quimiotáctico para los fibroblastos dérmicos, monocitos y macrófagos (10).



Como se mencionó anteriormente, la epidermis y la interacción con los fibroblastos juegan un papel importante en la cicatrización de una herida, tras la aplicación de injertos epiteliales se favorece la formación del tejido de granulación con algunas islas epidérmicas, sin embargo aún no se sabe si los factores expresados en monocapa son diferentes a los expresados en varias capas como los utilizados en algunas coberturas para heridas (11).

Por lo tanto, la pérdida de la piel va a requerir un tratamiento a corto y a largo plazo para garantizar la homeostasis, prevenir la pérdida electrolítica y evitar la infección, así, para el diseño de las cubiertas cutáneas se ha interesado en el estudio de las propiedades anatómicas y fisiológicas de la piel, con el fin de buscar posibles sustitutos.

2.6 Cubiertas cutáneas.

Es importante señalar que los autoinjertos se consideran como cubiertas cutáneas universales dada su biocompatibilidad e integración al tejido, además de que se puede hacer uso de ellos con seguridad. No obstante su disponibilidad es limitada, sobre todo en quemaduras extensas (11).

Por otra parte las cubiertas cutáneas biológicas se orientaron hacia la creación no sólo de una barrera, sino de una arquitectura similar a la dermis y epidermis que pudiera ser empleada de forma permanente y funcional, donde se permita la migración, proliferación celular y la cicatrización de una forma eficiente teniendo un tejido viable (11).

Por lo que, cuando se trata de quemaduras superficiales es suficiente el empleo de agentes tópicos antisépticos y alguna cubierta cutánea temporal que permita mantener la integridad del tejido expuesto. Entre los agentes tópicos se han usado agentes antimicrobianos como la plata nanocristalina, plata iónica, la sulfadiazina de plata, óxido de zinc impregnado en apósitos de hidrofibra e incluso compuestos

con yodo (12). Estos agentes tópicos deben cubrir la herida, evitar o controlar infecciones y proporcionar un ambiente húmedo, favoreciendo de manera indirecta la cicatrización aunque no son por sí mismos la estrategia para la epitelización y remodelación de la matriz extracelular (13).

En cuanto a las diferentes coberturas de carácter temporal caracterizadas por ser membranas o apósitos laminares o bilaminares de tipo sintético o biodegradable que sustituyen la pérdida de la epidermis y la dermis, éstas actúan como membranas transitoria favoreciendo una cicatrización fisiológica, evitando la pérdida del agua y una función de barrera física a las bacterias, además de mantener la herida limpia, con control del dolor, favoreciendo la epitelización (14).

Un grupo terapéutico ampliamente utilizado y de características simples es el conformado por los apósitos de origen sintético, son relativamente económicos, estables a diferentes condiciones climáticas y fáciles de aplicar, son permeables al vapor de agua y oxígeno, e impermeables a microorganismos, además, son hipoadérgicos. Tienen la característica de acelerar el proceso de epitelización por su ambiente húmedo y semipermeable y son frecuentemente utilizados en quemaduras parciales. Entre ellos se encuentran los alginatos, poliuretanos, otras espumas poliméricas, hidrocoloides, hidrogeles e hidrofibras, de estas últimas las de carboximetilcelulosa sódica (CMCNa) y las que además contienen plata iónica (CMCNaAg) todas ellas tienen gran capacidad de absorción, reteniendo los fluidos dentro de las estructuras de las fibras, manteniendo en condiciones óptimas la herida favoreciendo la cicatrización, además de que son fácilmente removidas sin dañar el nuevo tejido. Este tipo de cubiertas están indicadas en el manejo de heridas exudativas, heridas agudas y quemaduras de primer y segundo grado. Se han reportado estudios con la hidrofibra impregnada con plata iónica, donde se han evaluado su eficiencia antiséptica sobre diferentes microorganismos, así como la respuesta clínica de pacientes tratados con dicho apósito quienes respondieron de manera eficiente al tratamiento en un periodo de

dos semanas, incluso epitelizando completamente (15 - 17).

En cuanto a las cubiertas cutáneas acelulares de origen biológico, se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de quemaduras de espesor parcial y total al ser sustitutos dérmicos y estimular, en muchos casos, la migración y proliferación celular epitelial.

Estos materiales van desde la piel cadavérica liofilizada y radioesterilizada, tejidos heterólogos completos liofilizados y radioesterilizados, hasta componentes de la matriz extracelular purificados y en algunos casos combinados con diferentes sustancias y/o modificados fisicoquímicamente; todos ellos son utilizados como apósitos temporales que favorecen la reparación, en principio, la preparación del lecho de la herida y secundariamente la restauración dérmico-epitelial (18).

Por su parte, la matriz derivada del procesamiento de la submucosa de intestino delgado de cerdo es compatible con el tejido humano y funciona como andamiaje biológico natural que proporciona un entorno óptimo de uso temporal para una respuesta favorable al cierre de la herida. En su forma natural la submucosa de intestino de cerdo contiene varios tipos de colágena entre ellos el tipo I, III, IV, V y VI con pequeñas cantidades de glicosaminoglicanos (heparan sulfato, condroitin sulfato y ácido hialurónico), glicoproteínas, elastina y proteoglicanos, además se ha reportado que la matriz absorbe, conserva y protege moléculas bioactivas del microambiente de la herida como son la heparina y fibronectina donde se ha reportado que incrementa el índice de epitelización, proliferación celular y migración, todos ellos promoviendo la cicatrización de la zona dañada (19).

Por lo anterior, se ha reportado que estimula la reparación de úlceras venosas crónicas (20), en heridas de extremidades inferiores de pacientes con diabetes mellitus y con afección microvascular y úlceras por presión encontrándose una respuesta caracterizada por la restauración de la estructura y función del tejido (21,22).

Interesantemente, se ha encontrado que el liofilizado y radioesterilizado de submucosa intestinal de cerdo cuenta con factores de crecimiento incorporados a la matriz, estos son el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que son capaces de actuar aún en condiciones ácidas y oxidantes mismos que al entrar en contacto con la zona dañada y disolverse en el exudado de la lesión presentan actividad biológica, con lo que se estimula el proceso de reparación dermo-epitelial (23).

Su utilización se recomienda realizando un debridamiento de la zona afectada, una vez limpia la herida se coloca la membrana y se humedece con solución salina, posteriormente se cubre con un apósito secundario no adherente. Se recomienda hacer el cambio del apósito dependiendo de la cantidad del exudado y retirarlo solamente cuando la membrana se desprenda por si misma (24).

Por otra parte, los sustitutos biosintéticos son una familia de materiales que han sido desarrollados para imitar una de las funciones de las diferentes capas de la piel o de alguna de ellas. Fueron desarrollados desde los años '70, se caracterizan por promover la reepitelización cuando el daño de la lesión es parcial, permitiendo el intercambio de fluidos y brindando protección bacteriana; además algunos de éstos, los autólogos, pueden incorporarse a la herida generando una neoepidermis que a su vez estimula la remodelación dérmica a través de la comunicación intercelular parácrina (11).

Asimismo, a través de las estrategias de terapia celular, se ha desarrollado desde 1982 cultivo de células epiteliales para el tratamiento de la pérdida de la piel. Un sistema diseñado para el aislamiento de las células epidérmicas autólogas (queratinocitos basales) a partir de una pequeña biopsia de piel sana, de donde se obtendrá una suspensión celular viable que puede dispersarse sobre la herida con el objeto de “sembrar” homogéneamente unidades formadoras de colonias de

queratinocitos que ayudarán, y formarán por sí mismas, el epitelio nuevo. Sin embargo requiere de tener un lecho receptor adecuado que sirva como soporte para la incorporación y/o migración epitelial, lo cual puede favorecerse a través del uso de fibrina, fibronectina, vitronectina y colágena como andamios biomoleculares (25). Por lo tanto, la administración de queratinocitos es una opción para el tratamiento de heridas de espesor parcial.

Este sistema *in vitro* de la expansión del tejido, permite cubrir la superficie epidérmica del sitio de la herida quemada con mínimo dolor (26) actualmente se cuenta con un kit en donde a través de una biopsia de piel sana se pueden obtener células basales de la de epidermis tanto queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans por medio de una separación enzimática. La solución obtenida es dispersada en la zona afectada obteniéndose una cobertura que promueve la reparación tisular y la cicatrización mediante la acción de células basales que se encuentran expuestas de manera que al colocar la cubierta las células hacen contacto con el área de la lesión promoviendo la proliferación de las células epidérmicas remanentes de los folículos pilosos del área cruenta del paciente, así como de la piel sana del perímetro del área lesionada, además de la participación de diferentes componentes bioquímicos y factores de crecimiento fomentando el rápido crecimiento de la epidermis y reduciendo significativamente el dolor. (27,28).

Por su contenido de melanocitos se ha sugerido en el tratamiento de vitíligo con buenos resultados con respecto a otros compuestos celulares (29). De este grupo de cubiertas, los reemplazos epiteliales temporales están conformados por láminas de queratinocitos alogénicos, estratificados y diferenciados, con características muy similares a los normales, al menos metabólicamente y una vez que el área lesionada reestructuró su propio epitelio creciendo por debajo de la cubierta alogénica, entonces ésta se desplaza y es eliminada naturalmente.

En la actualidad existen varias estrategias para cubrir las heridas, sin embargo, su aplicación clínica debe ser individualizada de acuerdo a sus características y componentes, como también debe valorarse el costo-beneficio del tratamiento a corto o largo plazo que se requiera. Así, el estudio del manejo del paciente quemado con cubiertas cutáneas, bien sean sintéticas, biológicas, heterólogas, homólogas o autólogas ha sido exhaustivo; no obstante, los estudios siempre son realizados de manera separada en modelos que van de lo preclínico a lo clínico. De estos últimos, frecuentemente se realizan estudios que consideran diferentes variables a evaluar, donde la mayoría sólo se enfocan al efecto reepitelizante a tiempos determinados y cuantificados solamente por parámetros clínicos.

Por ello nosotros proponemos evaluar tres esquemas de tratamiento diferentes, que van desde lo sintético (estándar de tratamiento en el sector salud), hasta lo biológico, empleando el mismo procedimiento de tratamiento y de análisis, lo que permitirá conocer las diferencias reales en tiempo, arquitectura y respuestas tisulares.

3. JUSTIFICACIÓN

El paciente con lesiones de espesor parcial es en general un paciente de fácil tratamiento; no obstante, el hecho de que existan terapias conservadoras que resuelvan la carencia de epitelio no significa que los pacientes no deban tener acceso a otras estrategias tecnológicas que puedan favorecer la epitelización en menor tiempo y/o con mejor calidad. Tal es el caso de las terapias biotecnológicas, incluyendo la celular, donde la aplicación de sustitutos dérmicos delgados o la administración de células autólogas que no necesitan ser reemplazadas aceleran el proceso de cicatrización, economizando otros materiales de curación y en algunos casos el tiempo de hospitalización, proveyendo de una mejor calidad de piel y de vida al paciente quemado.

4. HIPÓTESIS

La calidad y eficiencia en la reparación de heridas superficiales postquemadura dependerá del tipo de apósito aplicado, siendo mejor los de origen biológico que los sintéticos, y más aún los que incluyen algún tipo de reemplazo epitelial, ya que la velocidad y calidad de la remodelación está en relación directa con la capacidad de estimular biológicamente al tejido lesionado.

5. OBJETIVO

Evaluar y comparar la eficacia de reparación a través del índice de epitelización y la calidad de la restauración dermo-epidérmica en quemaduras de espesor parcial, tratadas con diferentes estrategias biológicas vs. el tratamiento estándar a base de hidrofibra impregnada con plata iónica (sintética).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Tipo de Estudio

El trabajo es un estudio piloto, prospectivo, longitudinal, abierto, comparativo.

6.2. Ubicación Temporal y Espacial

- La parte clínica del estudio se llevó a cabo en el Servicio de Quemados Hospital de Traumatología y Ortopedia de Lomas Verdes, IMSS, en la Unidad de Quemados “Hospital Rubén Leñero” DDF y en el Servicio de Cirugía Plástica ISSEMYM, Edo. Mex.
- Los procesamientos histológicos e inmunohistoquímicos fueron procesados en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados, INR.

6.3. Criterios de Selección de la Muestra

Criterios de Inclusión

Paciente adulto (18 a 60 años).

Género indistinto.

Quemadura térmica, aguda de espesor parcial.

Menor o igual al 10% superficie corporal quemada (SCQ) pero de al menos 300cm² de lesión.

Criterios de no Inclusión

Paciente con quemadura eléctrica, química o radiación.

Lesión de grado profundo y mayor al 10% SCQ.

Criterios de Exclusión

Paciente que al momento que ingrese tenga infectada la herida.

Paciente con enfermedades metabólicas.

Criterios de Eliminación

Paciente que no se apegue a las indicaciones de cuidado.

Paciente que no cumpla con sus visitas de revisión médica.

Muerte del paciente.

6.4. Variables

Independientes: Quemaduras de espesor parcial con escala de intervalo.

Dependientes: Epitelización y arquitectura cutánea con escala de intervalo y ordinal.

6.5. Tamaño de la Muestra

Estudio piloto conformado por dos grupos de 5 pacientes cada uno donde el mismo paciente es su control. El número reducido se debe a que es un estudio piloto donde se obtuvieron muestras antes y después de los tratamientos que fueron analizadas para histomorfología.

6.6. Métodos de Laboratorio

6.6.1. Procesamiento histológico:

- Inclusión por parafina (30)
 1. Colocar la biopsia en etanol al 70% por un tiempo de 30 minutos con agitación.
 2. Colocar la biopsia en etanol al 85% por un tiempo de 30 minutos con agitación.
 3. Colocar la biopsia en etanol al 95% por un tiempo de 30 minutos con agitación
 4. Colocar la biopsia en etanol al 100% por un tiempo de 30 minutos con agitación
 5. Colocar la biopsia en etanol/xileno a 60°C por un tiempo de 15 minutos
 6. Colocar la biopsia en xileno a 60°C por un tiempo de 10 minutos.
 7. Colocar la biopsia en xileno/parafina a 60°C por un tiempo de 30 minutos.
 8. Colocar la biopsia en parafina a 60°C por un tiempo de 12 horas.
 9. Incluir las muestras en parafina.
 10. Se pueden almacenar a temperatura de 4°C

- Desparafinación de cortes (30)
 1. Calentar las laminillas a temperatura de 60°C por un tiempo de 30 minutos o hasta fundir la parafina que cubre el corte de la biopsia.
 2. Colocar las laminillas en xileno a 60°C por un tiempo de 10 minutos.
 3. Colocar las laminillas en alcohol absoluto por un tiempo de 3 minutos.
 4. Colocar las laminillas en alcohol al 96% por un tiempo de 3 minutos.

5. Colocar las laminillas en alcohol al 85% por un tiempo de 3 minutos.
6. Colocar las laminillas en alcohol al 70% por un tiempo de 3 minutos.
7. Colocar las laminillas en alcohol al 50% por un tiempo de 3 minutos.
8. Colocar las laminillas en agua destilada por un tiempo de 5 minutos

6.6.2. Técnicas tintoriales:

- Hematoxilina – eosina (H-E) (31)
 1. Laminillas con cortes de 5 a 6 μm de espesor.
 2. Lavar las laminillas con agua destilada.
 3. Teñir con hematoxilina de Harris por 5 minutos.
 4. Lavar con solución saturada de carbonato de litio.
 5. Lavar con agua destilada.
 6. Teñir con eosina por 2 minutos
 7. Enjuagar con agua destilada.
 8. Deshidratar con alcoholes de 50%, 70%, 80%, 95%, absoluto, etanol/xileno, xileno por un tiempo de 3 minutos cada uno.
 9. Montar las laminillas con resina.

- Ácido Peryódico-Schiff (PAS) (30)
 1. Laminillas con cortes de 5 a 6 μm de espesor.
 2. Lavar las laminillas con agua destilada.
 3. Teñir con ácido peryódico por 5 minutos.
 4. Lavar con agua destilada
 5. Teñir con el reactivo de Schiff de Coleman por 15 min
 6. Lavar con agua corriente por 10 min
 7. Contrateñir con Hematoxilina de Mayer por 15 minutos

8. Enjuagar con agua destilada.
 9. Deshidratar con alcoholes de 50%, 70%, 80%, 95%, absoluto, etanol/xileno, xileno por un tiempo de 3 minutos cada uno.
 10. Montar las laminillas con resina.
- Picropolicrómica de Herovici (32)
 1. Laminillas con cortes de 5 a 6 μm de espesor.
 2. Lavar las laminillas con agua destilada.
 3. Teñir las laminillas con solución de azul celestino por 5 minutos.
 4. Lavar con agua.
 5. Teñir con hematoxilina de Regaud por 5 minutos.
 6. Lavar con agua por un tiempo de 15 a 30 minutos.
 7. Teñir con amarillo de metanilo por 2 minutos.
 8. Hacer la diferenciación con solución de acético 0.5% por 2 minutos.
 9. Virar con solución de carbonato de litio por 2 minutos..
 10. Lavar con agua destilada.
 11. Teñir con solución picropolicrómica durante 2 minutos.
 12. Lavar con solución de acético al 1% por 2 minutos.
 13. Deshidratar con alcoholes de 50%, 70%, 80%, 95%, absoluto, etanol/xileno y xileno por un tiempo de 3 minutos cada uno.
 14. Montar las laminillas con resina
 - Fibras elásticas por Verhoeff. (30)
 1. Laminillas con cortes de 5 a 6 μm de espesor.
 2. Incubar las laminillas en una solución de trabajo por un tiempo de 15 a 30 minutos.
 3. Lavar con agua destilada.
 4. Diferenciar con cloruro férrico al 2% hasta observar las fibras elásticas de color negro sobre un fondo gris.

5. Lavar con agua destilada.
6. Lavar con alcohol al 95% por 3 minutos.
7. Contrateñir con eosina por 3 minutos.
8. Lavar con agua destilada.
9. Deshidratar con alcoholes de 50%, 70%, 80%, 95%, absoluto, etanol/xileno, xileno, por un tiempo de 3 minutos cada uno.
10. Montar las laminillas con resina.

6.6.3. Técnica de inmunohistoquímica

- Inmunohistoquímica: CD31 para células endoteliales (33)
 1. Desparafinar

Horno 60°C	10 min
Xileno T.A	5 min
ETOH 100%	5 min
ETOH 96%	5 min
ETOH 80%	5 min
ETOH 50%	5 min
H ₂ O _d	5 min
H ₂ O _d	cambio
 2. Lavar con PBS 3x2´
 3. Bloqueo peroxidasa endógena MeOH/H₂O₂ (36ml/4ml) 10 min
 4. Lavar con PBS 3x2´
 5. Sol bloqueante 15 min
 6. Lavar con PBS 3x2´
 7. Anticuerpo primario CD31 1:250 incubar 1hs a TA
 8. Lavar con PBS 3x2´
 9. Anticuerpo secundario biotinado 1hrs
 10. Lavar con PBS 3x2´
 11. Enzima conjugada streptavidina-peroxidasa HRP 30 min

12. Lavar con PBS 3x2´
13. Revelado con AEC tiempo aprox 30 seg
14. Lavar con PBS 3x2´
15. Contrateñir con hematoxilina de Harris 10 min
16. Virar a color azul con Li_2CO_3 saturado
17. Lavar con agua
18. Montar con entellan

6.7. Análisis Estadístico

Análisis estadístico descriptivo y análisis no paramétrico por prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple por prueba de Dunn considerando significativo valores $p < 0.05$.

6.8. Descripción Operativa del Estudio

El estudio se llevo a cabo con 10 pacientes (7 hombres y 3 mujeres) recibidos en las diferentes áreas hospitalarias del Servicio de Quemados y bajo la firma del consentimiento informado (ver anexo 1). Los pacientes incluidos fueron aquellos que presentaron quemaduras parciales térmicas por escaldadura menores o iguales al 10% SCQ pero al menos 300cm^2 , cada paciente fue su propio control de tal manera que el área quemada se dividió simétricamente en dos, excepto algún paciente que cuando presentó dos lesiones simétricas una se identificó como control y la otra como experimental.

El día de ingreso el paciente fue valorado clínicamente para conocer la extensión y profundidad de la quemadura así como antecedentes de importancia, posteriormente y bajo sedación se realizó lavado convencional y debridamiento de la herida para retirar el tejido necrosado, enseguida se tomó fotografía y biopsia de

4mm de diámetro y de espesor total por sacabocado de cada zona (control y experimental). Para el caso del tratamiento control, se colocó la hidrofibra con plata ionizable (Aquacel Ag®, ConvaTec, Bristol-Myers Squibb Company, United Kingdom) sobre la herida y se humedeció el apósito con agua inyectable, enseguida se colocó un apósito no adherente (Jelonet, Smith and Nephew, USA) y finalmente se cubrió con un apósito secundario (gasa estéril).

Para el tratamiento experimental se trató con la submucosa de intestino delgado de cerdo (Oasis, Healtpoin USA) colocándose la membrana en la zona de la herida e hidratándola con solución salina, enseguida un apósito no adherente (Jelonet, Smith and Nephew, USA) y finalmente se cubrió con un apósito secundario (gasa estéril).

Para el caso de la aplicación de la suspensión de queratinocitos autólogos se tomó una biopsia de piel sana de espesor parcial (0.2-0.3mm), posteriormente esta muestra fue procesada a través de un sistema de degradación enzimática controlada (ReCell, Clinical Cell Culture Americas LLC, USA).

Después de la digestión inicial se separaron con pinzas la epidermis de la dermis. La dermis fue desechada y de la epidermis se recuperaron los queratinocitos basales por medio de una segunda digestión controlada con el mismo sistema y raspado para favorecer la liberación de los queratinocitos y otros grupos celulares del epitelio. Finalmente la aplicación de la suspensión celular fue administrada considerando que para una lesión de 320 cm² se administró el total de la suspensión obtenida de una biopsia de 2x2 cm, y cuando se tuvieron lesiones menores se administró la proporción respectiva de la suspensión final.

Posteriormente, la herida se cubrió con un apósito primario no adherente (Jelonet, Smith and Nephew, USA), y gasa estéril después como apósito secundario.

A todos los pacientes, control y experimental se les colocó un vendaje simple sobre el apósito secundario.

Los pacientes fueron revisados a los 7 días posteriores al tratamiento se retiraron los apósitos de ambas secciones cuidando no remover las cubiertas si éstas se encontraban aún adheridas a la herida, se tomo fotografía y una segunda biopsia junto a la inicial y de las mismas características.

En caso de que los pacientes aún no hubieran epitelizado en su totalidad se colocó nuevamente el apósito correspondiente y se cubrió con los apósitos secundarios para su posterior valoración. Los pacientes fueron revisados a los días 7,14, 28 y 3 meses.

Evaluación clínica.

Los pacientes fueron citados a los 7 días post-tratamiento, se llevó registro de las características clínicas como son coloración y estado general de la piel observando la epitelización en la zona dañada y un seguimiento fotográfico en cada visita. Además se valoró posible infección y profundización de la zona dañada.

Evaluación Morfológica

En todos los pacientes y de ambas secciones se realizó toma de biopsia de espesor total al inicio y a los 7 días post tratamiento, cada muestra fue incluida en parafina realizándose cortes de 5 micras de espesor para tinción de hematoxilina y eosina de donde se valoró el infiltrado inflamatorio, estructura general y grado de quemadura; tinción picropolicrómica (Herovici) para conocer la proporción de las fibras de colágena tipo I y III; tinción de Verhoeff evaluación de las fibras de elastina todas ellas analizadas bajo la escala visual análoga.

Se realizó tinción de PAS donde se fotografiaron los cortes histológicos a 100X a través del microscopio Axio Observer Z1, (Carl Zeiss MicroImaging GmbH; Jena, Germany) donde se observó la presencia y característica de la membrana basal epidérmica, así como presencia de las capas que conforman el epitelio, valorado a través de una escala binaria basado en la estructura epidérmica de la piel normal (presencia de papilas dérmicas, epitelio estratificado, capa basal columnar, capa espinosa, capa granular y capa córnea) teniendo al final de la evaluación un puntaje de 8 como sería la piel normal.

Finalmente los tejidos se procesaron para análisis inmunohistoquímico contra el antígeno de superficie celular CD31 con lo cual se cuantificaron las células endoteliales por micra cuadrada del tejido.

7. RESULTADOS

7.1 Datos de los pacientes

Se trataron 10 pacientes los cuales se dividieron en dos grupos para los dos tratamientos aplicados. El grupo 1 fueron los pacientes a los cuales se les aplicó la hidrofibra con plata iónica como control y la suspensión de queratinocitos autólogos como experimental, el grupo 2 pacientes tratados con la hidrofibra con plata iónica (Hidrofibra Ag) como control y la submucosa de intestino de cerdo (SIS) como experimental.

En la tabla 1 y 2 se muestran los datos de los pacientes de ambos grupos.

<i>Px</i>	<i>Género</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Localización</i>	<i>Tipo quemadura</i>
1	Masculino	28	Ambas manos	térmica
2	Femenino	43	Ambos brazos	térmica
3	Masculino	62	Ambas manos	térmica
4	Masculino	38	Ambas manos	térmica a
5	Femenino	21	Ambas manos	térmica

Tabla 1 Datos clínicos de los pacientes tratados con la suspensión de queratinocitos autólogos. (GRUPO 1)

<i>Px</i>	<i>Género</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>Localización</i>	<i>Tipo quemadura</i>
1	Femenino	18	Ambas piernas	térmica
2	Masculino	39	Ambos brazos	térmica
3	Masculino	30	Ambos brazos	térmica
4	Masculino	18	Ambos brazos	térmica
5	Masculino	28	Ambos brazos	térmica

Tabla 2 Datos clínicos de los pacientes tratados con la submucosa de intestino de cerdo. (GRUPO 2)

Debido a que los pacientes reclutados tuvieron quemaduras simétricas se consideró una mano como control y la otra como experimental.

7.2 Resultados clínicos:

En cuanto a los resultados clínicos obtenidos a los 7 días post-tratamiento como se puede observar en la Figura 1 y 2 se aprecia en la zona de la herida epitelización casi en su totalidad, tanto en la región control (hidrofibra con plata iónica) como en la zona experimental (suspensión de queratinocitos y submucosa de intestino de cerdo), por lo que se le indicó al paciente cubrir las heridas con gasa vaselinada y se volvió a citar sólo para el seguimiento fotográfico.

Cabe mencionar que de acuerdo a los cuidados de la Unidad de Quemados de donde se obtuvieron los pacientes, éstos permanecieron hospitalizados por lo menos los primeros 7 días, teniendo total control de sus quemaduras (ver anexo 2).



Figura 1. Seguimiento clínico. El panel muestra a un paciente tratado en forma convencional con hidrofibra con plata (hidrofibra Ag) vs suspensión de queratinocitos por 7 y 30 días. (Grupo 1).



Figura 2. Seguimiento clínico. El panel muestra a un paciente tratado en forma convencional hidrofibra con plata (hidrofibra Ag) vs submucosa de intestino de cerdo a los 7 y 45 días.(Grupo 2).

7.3 Resultados histológicos:

Al día cero y siete post-tratamiento fueron colectadas muestras de la herida tanto de la zona control como experimental las cuales fueron procesadas para inclusión en parafina donde se obtuvieron cortes histológicos de 5 μ m de espesor para posteriormente realizar las siguientes tinciones:

Arquitectura del tejido e infiltrado inflamatorio a través de la tinción de hematoxilina y eosina se valoró la arquitectura general del tejido y confirmación del grado de quemadura a través del daño dermo-epidérmico así como la proporción del infiltrado inflamatorio por conteo de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y fibroblastos activos (ver anexo 4).

Los resultados obtenidos indicaron que en los 10 pacientes el daño fue parcial confirmado por la presencia de reminiscencias de algunos apéndices dérmicos

como glándulas sudoríparas y folículos pilosos (Figura 3).

En cuanto a las biopsias del día 7 post-tratamiento tanto control como experimental, se observó para ambos tiempos y tratamientos la presencia del infiltrado inflamatorio en la misma proporción, además de observarse ya la existencia de un epitelio inmaduro para en el caso de los pacientes tratados con el apósito sintético mientras que en los tratados con la suspensión de queratinocitos autólogos y submucosa de intestino de cerdo el epitelio se observó con un grado de madurez mayor.

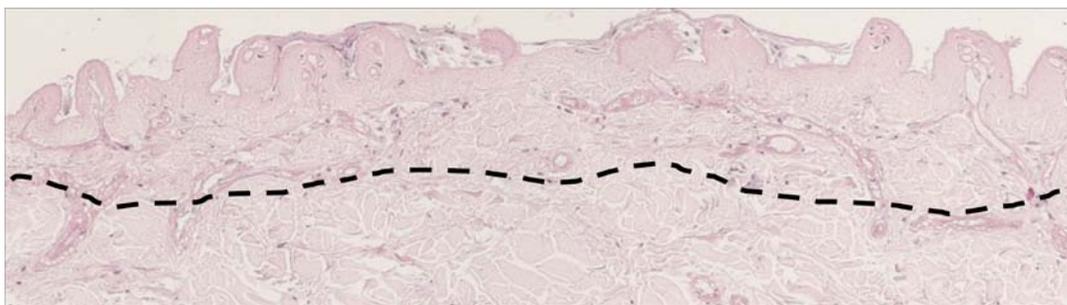


Figura 3 Fotomicrografía del tejido inicial. Se muestra el daño que genera una quemadura parcial por escaldadura conservándose en algunas zonas papilas dérmicas así como reminiscencias de anexos cutáneos. La línea punteada indica la profundidad del daño.

Membrana basal e índice de epitelización por medio de la tinción de PAS se valoró la presencia de la membrana basal y el índice de epitelización a los 7 días post-tratamiento.

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de una membrana basal inmadura para el tratamiento con hidrofibra con plata iónica (control) y una membrana basal más compacta para el de la suspensión de queratinocitos autólogos y submucosa de intestino de cerdo. (Figura 4)

En cuanto al índice de epitelización, se observó un 60% y 80% de los pacientes tratados con la suspensión de queratinocitos autólogos y submucosa de intestino de cerdo respectivamente un epitelio mejor conformado aunque con la ausencia de células basales columnares de acuerdo con la escala establecida, teniendo un

valor total por arriba de 6 mientras que en los pacientes tratados con el apósito sintético el 80% y 60% de ellos en ambos grupos presentaron un epitelio inmaduro con ausencia de papila dérmica, capa basal columnar, capa espinosa y capa granular teniendo un valor total por debajo de 5. Estadísticamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis se obtuvo un valor de $p = 0.029$. Posteriormente se aplicó la prueba de Dunn para comparaciones múltiples indicando que los pacientes tratados con ambas estrategias biológicas (suspensión de queratinocitos y submucosa de cerdo) presentan un índice de epitelización significativamente mayor que los tratados con hidrofibra Ag ($p < 0.05$ en ambos casos) (ver anexo 5).

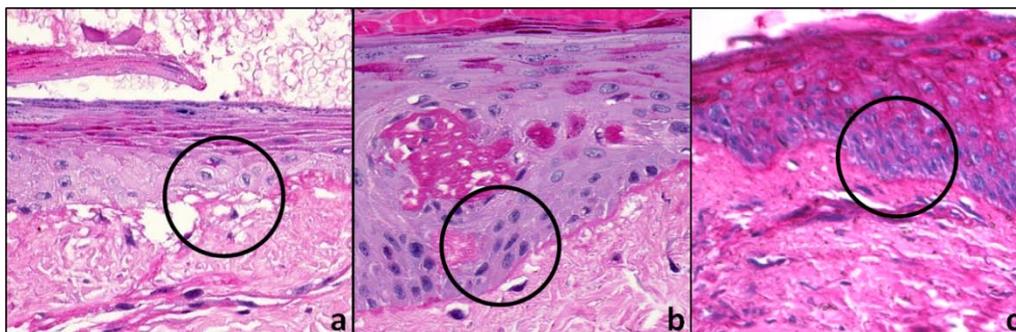


Figura 4 Fotomicrografías de los tejidos a los 7 días post-tratamiento teñidos por la técnica de PAS: (a) tratamiento control (hidrofibra Ag) donde se muestra la membrana basal inmadura al igual que el epitelio, (b) y (c) corresponde al tratamiento experimental (suspensión de queratinocitos autólogos y submucosa de intestino de cerdo) donde se muestra la membrana basal madura (compacta) y una mejor conformación del epitelio.

Proporción de colágenas tipo I y III a través de la técnica picropolicrómica de Herovici se observó en los tejidos iniciales una mayor proporción de colágena tipo I (fibras gruesas de color magenta) en la zona dañada correspondiente al tipo de colágena presente en la piel normal, en cambio en las biopsias de 7 días posterior al tratamiento se encontró que para el caso de los pacientes tratados con hidrofibra con plata la proporción de colágena tipo III fue mayor que la cantidad de colágena tipo I lo que nos habla de la presencia de colágena depositada de *novo* en la zona del daño y un grado de reparación temprano de la herida.

Para el caso de las muestras tratadas con la suspensión de queratinocitos autólogos y submucosa de intestino de cerdo se observó mayor presencia de colágena tipo I lo que nos indica un incremento en la madurez en la zona de reparación (Figura 5) (ver anexo 4).

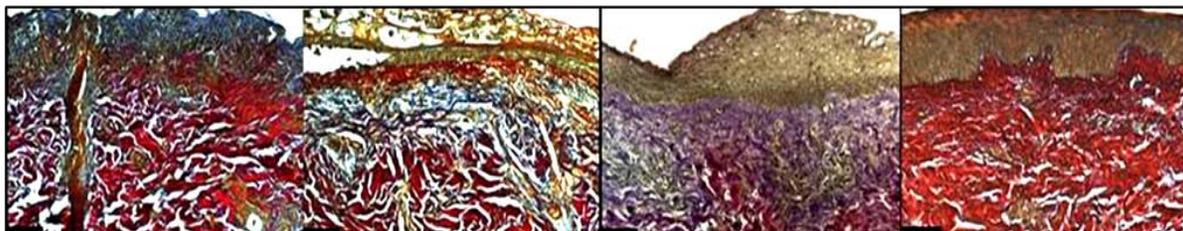


Fig 5 Fotomicrografías de los tejidos procesados con la tinción de Herovici. El panel de la izquierda muestra el día cero donde se observa la colágena tipo I presente en la piel normal. El panel central izquierdo muestra el tratamiento con la hidrofibra con plata a los 7 días post-tratamiento observando en la parte de la dermis papilar mayor cantidad de colágena tipo III (fibras delgadas de color azul), en el panel central derecho muestra el tratamiento con la suspensión de queratinocitos autólogos y el panel de la derecha muestra el tratamiento con la submucosa de intestino de cerdo ambos a los 7 días post-tratamiento destacando en la parte de la dermis papilar una mayor proporción de colágena tipo I caracterizada por fibras gruesas de color magenta.

Valoración de la vasculatura a través de un ensayo inmunohistoquímico contra el antígeno de superficie CD31 se cuantificó la presencia de vasos sanguíneos por micra cuadrada tanto en los tejidos iniciales y de 7 días post-tratamiento.

Los resultados obtenidos indicaron que tanto para el apósito sintético como el biológico no se obtuvieron cambios significativos con respecto a los 7 días de aplicación del tratamiento ni tampoco entre los tratamientos, sin embargo como se muestra en la figura 6 los vasos sanguíneos presentes aún son incipientes en tiempos tempranos de reparación (7 días) lo que nos indica una reparación aún incompleta (ver anexo 6).

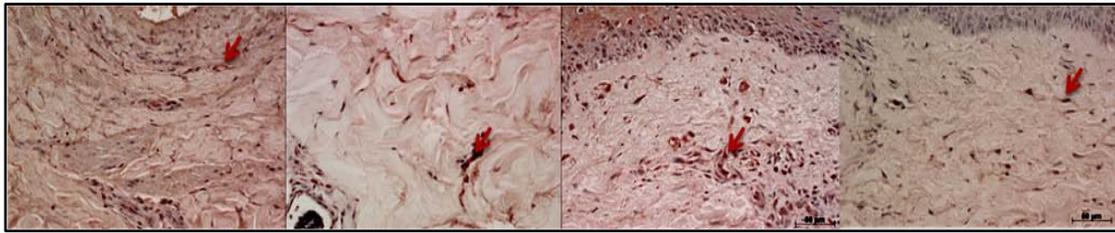


Figura 6 Fotomicrografías de los tejidos teñidos por inmunohistoquímica vs CD31. El cuadro de la izquierda muestra el tejido al inicio. Los tres restantes corresponden a los 7 días post-tratamiento para la hidrofibra Ag iónica, suspensión de queratinocitos y submucosa de intestino de cerdo respectivamente. La flecha señala las células endoteliales marcadas con el anticuerpo anti CD31 que fueron revelados con AEC.

La presencia de fibras elásticas a través de la técnica de Verhoeff esta tinción se realizó para valorar la presencia de fibras a los 7 días post-tratamiento con la submucosa de intestino de cerdo. Los resultados encontrados fueron la presencia de fibras elásticas por debajo de la zona de reparación (dermis reticular) en ambos tratamientos (ver anexo 3), sin embargo de forma estructural la submucosa de cerdo contiene péptidos de elastina que no son aportados a la zona de daño por lo que la membrana sólo funciona como una membrana temporal creciendo el epitelio nuevo por debajo de ella y desplazándola hasta epitelizar la zona dañada. (Figura 7).

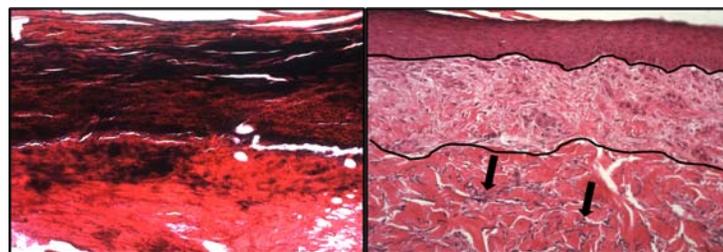


Figura 7 Fotomicrografía de los tejidos teñidos por la tinción de Verhoeff a los 7 días post-tratamiento con la submucosa intestinal de cerdo, el panel de la izquierda muestra la elastina en color negro correspondiente a la presente en la membrana. El panel de la derecha muestra la zona de reparación con ausencia de fibras de elastina, las flechas señalan las fibras elásticas presentes por debajo de la zona de reparación (dermis reticular).

8. DISCUSION

El uso de cubiertas cutáneas en la práctica médica para el tratamiento de quemaduras de tipo parcial es muy amplio, sin embargo aún no se han realizado estudios comparativos de eficacia entre los tratamientos disponibles sean de características sintéticas como la hidrofibra impregnada con plata iónica, donde el mayor aporte es la capacidad de retención de agua creando un ambiente húmedo ideal para propiciar un adecuado medio que induzca el proceso de reepitelización, o bien los tratamientos a base de cubiertas biológicas sean celulares como el caso de la suspensión de queratinocitos autólogos o cubiertas biológicas acelulares como la submucosa de intestino de cerdo, ambas con características importantes por contener moléculas y factores indispensables para el cierre de la herida (34).

En cuanto al apósito sintético (hidrofibra impregnada con plata iónica) de uso convencional en el sector hospitalario mexicano, es un material que ayuda a proveer a la herida un ambiente húmedo adecuado para que se lleve a cabo el cierre de la misma que además al contener plata iónica reduce la posibilidad de infección lo que favorece el proceso de epitelización. (35).

La suspensión de queratinocitos autólogos es una estrategia biológica diseñada para propiciar la epitelización de la herida al aportar queratinocitos basales, sin embargo como esta mezcla de células se obtienen de una muestra sana del mismo paciente se puede considerar la presencia de otras células epidérmicas como las células de Langerhans y los melanocitos, donde estos últimos intervienen en la pigmentación del tejido reparado, teóricamente evitando la presencia de hipocromías en la cicatrización de las heridas (36).

Finalmente la submucosa de intestino de cerdo, otro material biológico con características importantes absorbe, conserva y protege moléculas bioactivas como colágena, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y factores de crecimiento como el FGF y el PDGF (37), en este caso la matriz actúa como andamiaje para

las células que participan en la reparación estimulando y acelerando la cicatrización de las heridas (38).

Los resultados que se obtuvieron al comparar estas tres estrategias para el tratamiento de quemaduras de espesor parcial demostraron que a los 7 días post-tratamiento los pacientes se encontraban clínicamente epitelizados. No obstante histológicamente se observó que el grado de maduración de la membrana basal es mejor cuando el tratamiento involucra tratamientos biológicos. La membrana basal es un parámetro importante estructuralmente hablando en el fortalecimiento y delimitación de los epitelios, además de servir como barrera selectiva ya que la membrana basal forma la unión dermo-epiérmica, con propiedades adhesivas y dinámicas (39).

Por otra parte, la membrana basal desempeña un papel fundamental en la diferenciación celular, la migración, proliferación y supervivencia mediante la inducción de eventos de señalización a través de interacciones con receptores transmembranales específicos y como reservorio de factores de crecimiento y citocinas (40). De ahí que los resultados obtenidos por el tratamiento con el apósito sintético evidenció una membrana inmadura en el 80% de los pacientes comparado con los tratados con los apósitos biológicos, donde el grado de maduración de la membrana basal fue mayor así como el índice de epitelización presentándose en un 80% y 60% de los pacientes tratados con la submucosa de intestino de cerdo y la suspensión de queratinocitos autólogos respectivamente.

La valoración del índice de epitelización se llevó por medio de los queratinocitos por ser el principal constituyente celular de la epidermis, que a través de un proceso de crecimiento y diferenciación proporciona una barrera protectora estratificada responsable del equilibrio de fluidos y de la evasión de las infecciones, además cada estrato epidérmico cumple una función importante, siendo la capa basal el estrato que contiene a las células no diferenciadas y proliferativas, la capa espinosa por la comunicación célula-célula, la capa granular

por el contenido de gránulos que contienen proteínas necesarias para la formación de la capa final, la capa cornea (41).

En cuanto al recambio de la colágena tipo I y III post-tratamiento se observó mayor cantidad de colágena tipo I (colágena asociada a heridas maduras) en la zona de reparación en los tejidos tratados con los apósitos biológicos, mientras que en el caso de la hidrofibra con plata se observó mayor cantidad de colágena tipo III (colágena “joven”) lo que nos indica la fase temprana de reparación. Este resultado se relaciona con el índice de epitelización y con la madurez de la membrana basal ya que requieren de una matriz madura para que estas células epiteliales se puedan anclar a la MEC y así llevar a cabo el proceso de epitelización en forma temprana. (42).

Con el objetivo de observar si uno de los materiales utilizados (submucosa intestinal de cerdo) se podría integrar al tejido en reparación se realizó la tinción de Verhoeff para evidenciar fibras de elastina, encontrando que el material (la SIS) fue desplazada, ya que la elastina sólo se encontró presente en dermis reticular pero no en dermis papilar, con lo que podemos inferir que el material biológico sólo aporta las moléculas bioactivas que contiene cuando se combina con el exudado de la herida.

Finalmente, la vascularidad nos proporciona información sobre el estado general de la reparación del tejido. Los cambios tempranos a 7 días post-tratamiento no fueron estadísticamente significativos, sin embargo en otros reportes tampoco se ha encontrado cambio significativo en estadios tempranos de reparación (3-7 días post-tratamiento) para un lecho receptor de injerto, sin embargo junto con las plaquetas y el infiltrado inflamatorio van regulan los primeros pasos de la re-vascularización (43).

9. CONCLUSIONES

- En este estudio se demostró la epitelización temprana a 7 días para los pacientes tratados con la terapia convencional (hidrofibra con plata) así como los tratados con las cubiertas biológicas (suspensión de queratinocitos autólogos y submucosa de intestino de cerdo) demostrando una epitelización a menor tiempo que los reportados en la literatura.
- Con el tratamiento de la hidrofibra con plata, histológicamente se observó un epitelio y una membrana basal aún inmaduros, mientras que con los tratamientos biológicos se obtuvo un mejor índice epitelial y una membrana basal mejor conformada así como el incremento de la colágena tipo I.
- La suspensión de queratinocitos autólogos y la submucosa de cerdo ofrecen una alternativa en el tratamiento de quemaduras parciales siendo una estrategia biológica que acelera el proceso de epitelización con una mejor calidad del epitelio, además de disminuir los costos de hospitalización.
- Las alternativas terapéuticas están disponibles en el mercado internacional para el cuidado de las heridas, no obstante el costo de los materiales sigue siendo un factor clave para su consideración, y aún más en el sector salud.
- Este es el 1er. estudio hasta nuestro conocimiento donde se compara de manera integral el efecto de 3 terapias (sintética, matricial y celular) como estrategias para el tratamiento de las quemaduras.

10. PERSPECTIVAS

Este trabajo por ser un estudio comparativo entre estrategias sintéticas y biológicas da pie a la realización de otros trabajos donde se compare la efectividad de las terapias existentes así como determinar el mejor tratamiento para cada tipo de quemadura. Al existir diversos tipos y grados de quemaduras sería interesante poder definir el uso de terapias ya sean simples o combinadas que den una mejor alternativa al paciente quemado brindándole una adecuada calidad de vida.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Bracho F. La respuesta inmunológica a las quemaduras. *Medicrit* 2005;(2):17-20.
2. Jeschke MG, Chinkes DL, Finnerty CC, Kulp G, Suman OE, Norbury WB et. al. Pathophysiologic Response to Severe Burn Injury. *Ann Surg* 2008;248: 387–401.
3. Johnson RM, Reg R. Partial-Thickness burns: identification and management. *Adv skin wound care* 2003;16:178-89.
4. Fracasso T, Pfeiffer H, Pellerin P, Karger B. The morphology of cutaneous burn injuries and the type of heat application. *Forensic Science International* 2009;187: 81-86.
5. Jaskille AD, Shupp JW, Jordan MH, Jeng JC. Critical Review of Burn Depth Assessment Techniques: Part I. Historical Review. *J Burn Care Res* 2009;30:937–947.
6. Monstrey S, Hoeksema H, Verbelen J, Pirayesh A, Blondeel P. Assessment of burn depth and burn wound healing potential. *Burns* 2008;34:761-769.
7. Ghahary A, Ghaffari A. Role of Keratinocyte-fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar. *Wound Rep Reg* 2007; 15: S46-S53.
8. Kröttsch E. Análisis del efecto de la colágena-polivinilpirrolidona sobre la expresión in vitro de algunos mediadores solubles que participan en el metabolismo de la colágena.[Tesis doctoral]. México: UNAM; 1999.
9. Kröttsch-Gómez FE, Furuzawa-Carballeda J, Reyes-Márquez R, Quiroz-Hernández E, Díaz de León L. Cytokine expression is downregulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *J. Invest Dermatol* 1998;111:828-834.
10. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 998–1008.
11. Halim SA, Lye TK, Mohd J, Shah Y. Biological and synthetic substitutes: an overview. *Indian J Plast Surg* 2010; 45: S23-8.

12. Fong J, Wood F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. *International Journal of Nanomedicine* 2006;1(4): 441-449.
13. Lansdown ABG. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices. *Advances in pharmacological sciences* 2010; 1-16.
14. Kujath P, Michelsen A. Wounds-from physiology to wound dressing. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105(13):239-48.
15. Bowler PG, Jones SA, Walker M, Parsons D. Microbicidal properties of a silver-containing hydrofiber dressing against a variety of burn wound pathogens. *J Burn Care Rehabil* 2004;25:192-6.
16. Caruso DM, Foster KN, Hermans MH, Rick C. Aquacel Ag in the management of partial-thickness burns: results of a clinical trial. *J Burn Care Rehabil* 2004; 25: 89-97.
17. Jones SA, Bowler PG, Walker M, Parsons D. Controlling wound bioburden with a novel silver-containing Hydrofiber dressing. *Wound Repair Regen* 2004;12:288-94.
18. Núñez-Gutiérrez H, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Combined Use of Allograft and Autograft Epidermal Cultures in Therapy of Burns *Plast Reconstr Surg* 1995; 98(6):929-39.
19. Nihsen ES, Zopf DA, Ernst DM, Janis AD, Hiles MC, Johnson C. Absorption of bioactive molecules into OASIS wound matrix. *Adv Skin Wound Care* 2007; 20(10): 541-8.
20. Mostow EN, Haraway GD, Dalsing D, Hodde JP, King D. Effectiveness of an extracellular matrix graft (Oasis Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial. *J Vasc Surg* 2005; 41(5): 837– 43.
21. Hodde JP, Allam R. Small Intestinal Submucosa Wound Matrix for Chronic Wound Healing. *Wounds* 2007; 19(6):157-62
22. Rando T. Use of biological extracellular matrix wound therapy to heal complex, chronic wounds. *J Wound Care* 2009; 18:70–74.

23. Hodde JP, Ernst DM, Hiles MC. An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS Wound Matrix. *J Wound Care* 2005;14(1): 23-5.
24. Oasis Wound Matrix. Ficha técnica. Cook Biotech Incorporated 2002.
25. Maddern G, Greenwood J, Cleland H. Bioengineered Skin Substitutes for the Management of Burns: A Systematic Review. En: *The Royal Australasian College of Surgeons. Nueva Zelanda: Australian Safety & Efficacy Register of New Interventional Procedures – Surgical*; 2006:1-58.
26. Wood F. The first 7 years of the west Australian skin cultura laboratory. *The West Australian Skin Culture Laboratory Experience* 2001; 275-83.
27. Currie LJ, Martin R, Sharpe JR, James SE. A comparison of keratinocytes cell spray with and without fibrin glue. *Burns* 2003; 29(7):677-85.
28. Navarro FA, Stoner ML, Park CS. Sprayed keratinocyte suspensions accelerate epidermal coverage in a porcine microwound model. *J Burn Care Rehabil* 2000;21(6):513-518.
29. Mulekar SV, Ghwish B, Issa A, Eisa AI. Treatment of Vitiligo lesions by ReCell[®] vs. conventional melanocyte-keratinocyte transplantation: a pilot study. *Br J Dermatol* 2007;158(1):45-49.
30. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin. Procesamiento de muestras. En *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington DC: Registro de Patología de los Estados Unidos; 1992. 27-35, 153.
31. Bancroft J, Gamble M. En Hematoxilina y eosina. En *Teoría y práctica de técnicas histológicas*. Sexta edición. China: Churchill Livingstone Elsevier; 2008:121-34.
32. Herovici C. Polychrome stain for differentiation procollagen from collagen. *Stain Tech* 1963; 38:204-205.
33. Boenisch T. *Handbook Immunochemical staining methods*. Tercera edición. CA, USA: DAKO Corporation Carpinteria.

34. Caicedo CA, Cuevas NM, Rodríguez IR, Torres JM, Vargas LP, Fontanilla M. Estrategias en el desarrollo de sustitutos de piel artificial. *Rev Fac Med* 2005;10 (2):7-16.
35. Barnea Y, Weiss J, Gur E. A review of the applications of the hydrofiber dressing with silver (Aquacel Ag) in wound care. *Ther Clin Risk Manag* 2010;6: 21-27.
36. Navarro FA, Stoner ML, Park CS, Huertas JC, Lee HB, Wood FM et. al. Sprayed keratinocytes suspensions accelerate epidermal coverage in a porcine microwound model. *J Burn Care Rehabil* 2000; 21:513-8.
37. Hodde JP, Janis A, Hiles M. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: Part II. Bioactivity and matrix interaction. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:545-550.
38. Hodde JP, Johnson CE. Extracellular matrix as a strategy for treating chronic wounds. *Am J Clin Dermatol* 2007; 8(2):61-66.
39. Yates CC, Whaley D, Hooda S, Hebda PA, Bodnar TJ, Wells A. Delayed reepithelization and basement membrane regeneration after wounding in mice lacking CXCR3. *Wound Repair Regen* 2009;1: 34-41.
40. Mokkalapati S, Baranowsky A, Mirancea N, Smyth N, Breitzkreutz D, Nischt R. Basement Membranes in skin are differently affected by lack of nidogen 1 and 2. *J Invest Dermatol* 2008;128: 2259-2267.
41. Thrash BR, Menges CW, Pierce RH, McCance DJ. AKT1 provides an essential survival signal required for differentiation and stratification of primary human keratinocytes. *J Biol Chem* 2006; 28(17):12155-12162.
42. Hashmi S, Marinkovich P. Molecular organization of the basement membrane zone. *Clin Dermatol* 2011; 29: 398-411.
43. Shaterian A, Borboa A, Sawada R, Costantini T, Potenza B, Coimbra R. et. al. Real time analysis of the kinetics of angiogenesis and vascular permeability in an animal model of wound healing. *Burns* 2009;35(6):811-817.

12. ANEXOS

Anexo 1: Carta de consentimiento informado

Debido a que usted tiene una herida por quemadura denominada de “segundo grado superficial”, ha sido invitado para participar en un protocolo de investigación titulado **“EFICACIA DE LAS CUBIERTAS CUTÁNEAS BIOLÓGICAS vs HIDROFIBRA CON PLATA EN EL TRATAMIENTO DE QUEMADURAS DE ESPESOR PARCIAL”** que tiene como objetivo comparar la velocidad en el tiempo de recuperación de su lesión cuando se aplican dos tratamientos comerciales distintos, autorizados por la Secretaría de Salud y que han demostrado ser eficientes; no obstante, es indispensable conocer cuál de ellos es más eficiente y económico. Por eso, en este documento le explicamos en qué consiste el tratamiento; léalo atentamente y consulte con su médico todas las dudas que usted tuviera.

1. En su primera visita será valorado clínicamente, posteriormente se realizará la limpieza de la lesión, se fotografiará la herida para tener el registro inicial. La lesión se dividirá en dos secciones equivalentes que serán tratadas de dos formas distintas. Además, antes del tratamiento de cada sección se obtendrá una biopsia de 5 mm de diámetro y de espesor total (sólo de la región de la piel), además de una biopsia de piel sana de espesor parcial para la obtención de la suspensión de queratinocitos autólogos dispersados sólo en el caso que la herida sea tratada con este tipo de cubierta.

La sección A (control), será tratada con un apósito comercial de hidrofibra que contiene plata ionizable (Aquacel Ag, ConvaTec Ltd., U.K.) y se cubrirá con un apósito no adherente o gasa vaselinada y después con gasa estéril

La sección B (experimental), de acuerdo a la cubierta a evaluar:

- a) Suspensión de queratinocitos autólogos dispersados.
- b) Submucosa intestinal de cerdo.

Todas se cubrirán con un apósito no adherente y con gasa estéril.

Usted mantendrá su vendaje como lo dejó el médico tratante y será revisado diariamente por él o quien él designe hasta el séptimo día para su valoración. En ese día se le retirarán todos los apósitos de ambas secciones. Se obtendrán fotografías y una última biopsia igual a la anterior para conocer su mejoría. Posteriormente y sólo si fuera necesario se cubrirán nuevamente con los apósitos primarios y secundarios de manera respectiva como se hizo la primera vez.

2. Al día 14 se obtendrán fotografías y si es que aún no hubiera epitelizado se cubrirá nuevamente con los apósitos y se le citará para el día 28. En caso que la lesión se encuentre reepitelizada (con la capa superficial protectora natural) se le indicarán los cuidados que debe seguir.
3. Al día 28 se tomará registro fotográfico.
4. A los tres meses será nuevamente citado y se valorará clínicamente el estado de cada zona de tratamiento. Además se obtendrán imágenes fotográficas. Y finalmente se le indicarán los cuidados para que mantengan su piel protegida hasta el alta médica, si ésta no se hubiera otorgado.

Complicaciones

En todo procedimiento siempre puede haber complicaciones. En este protocolo la complicación que se puede presentar es la infección en la herida, por causas ajenas a los tratamientos, la cual de observarse será tratada inmediatamente por su mismo médico e institución o puede llamar al teléfono 59 99 10 00 ext 14701.

Notas Importantes

- a) Si una de las secciones de la herida aún no hubiera epitelizado completamente, deberá mantenerse el tratamiento correspondiente por 7 días más y valorar la herida como en la forma descrita.
- b) Si se considera que la herida pudiera presentar infección o se aprecia profundización, se realizará el lavado del área y el paciente recibirá el tratamiento de rutina.
- c) Si la herida ya hubiera epitelizado en su totalidad entonces se retirará el apósito primario y se dejará descubierto al paciente, indicándole los cuidados cotidianos que llevará a partir de ese día y hasta su alta médica.

Declaración de consentimientoPaciente

Yo Sr./Sra. he leído la hoja de información que me ha entregado el/la Dr./Dra..... y he comprendido las explicaciones que se me han ofrecido. El médico que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas y preguntas que le he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que me considero satisfecho(a) con la información recibida y que comprendo la indicación y los riesgos de este tratamiento/procedimiento. Y en tales condiciones **CONSIENTO** que se me realice el tratamiento antes mencionado.

 Médico Tratante.

 El / La Paciente

 Testigo

 Testigo

México DF a de de 2010.

Revocación de consentimiento

Yo, Sr./Sra. REVOCO el consentimiento prestado en fecha y declaro por tanto que, tras haber iniciado el tratamiento del protocolo **“EFICACIA DE LAS CUBIERTAS CUTÁNEAS BIOLÓGICAS vs HIDROFIBRA CON PLATA EN EL TRATAMIENTO DE QUEMADURAS DE ESPESOR PARCIAL”**, he decidido NO continuar integrado al protocolo mencionado.

Médico Tratante

El / La Paciente

Testigo

Testigo

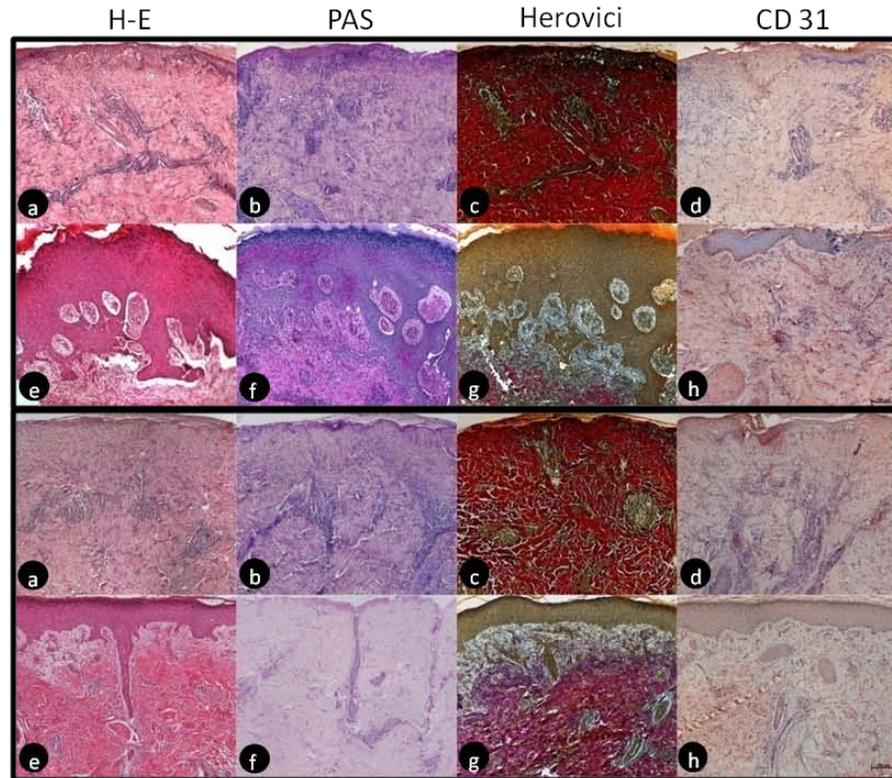
México DF a de de 2010.

“Todos los procedimientos están de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título Segundo. Capítulo I, Artículo 13, 14, 15, 16, 17 (III), 18, 19, 20, 21 y 22.”

Anexo 2: Composiciones de pacientes (fotografías clínicas e histológicas)

Hidrofibra Ag vs Submucosa de cerdo

Px 1



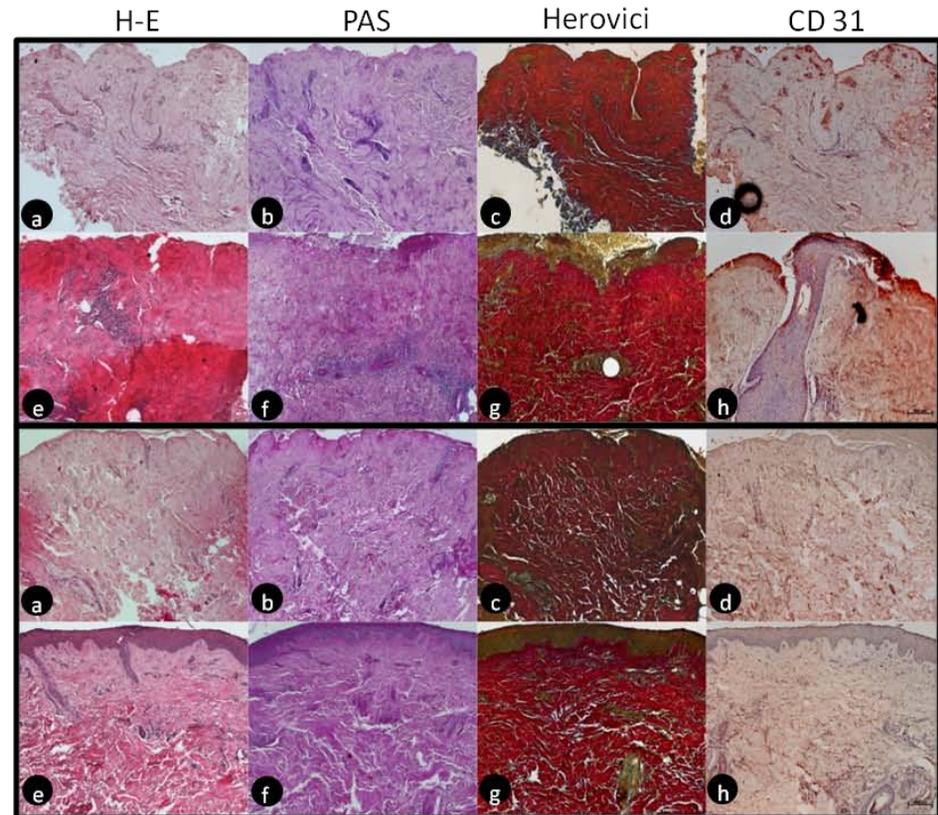
Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la submucosa de cerdo.

Hidrofibra Ag

Submucosa
de cerdo

Hidrofibra Ag vs Submucosa de cerdo

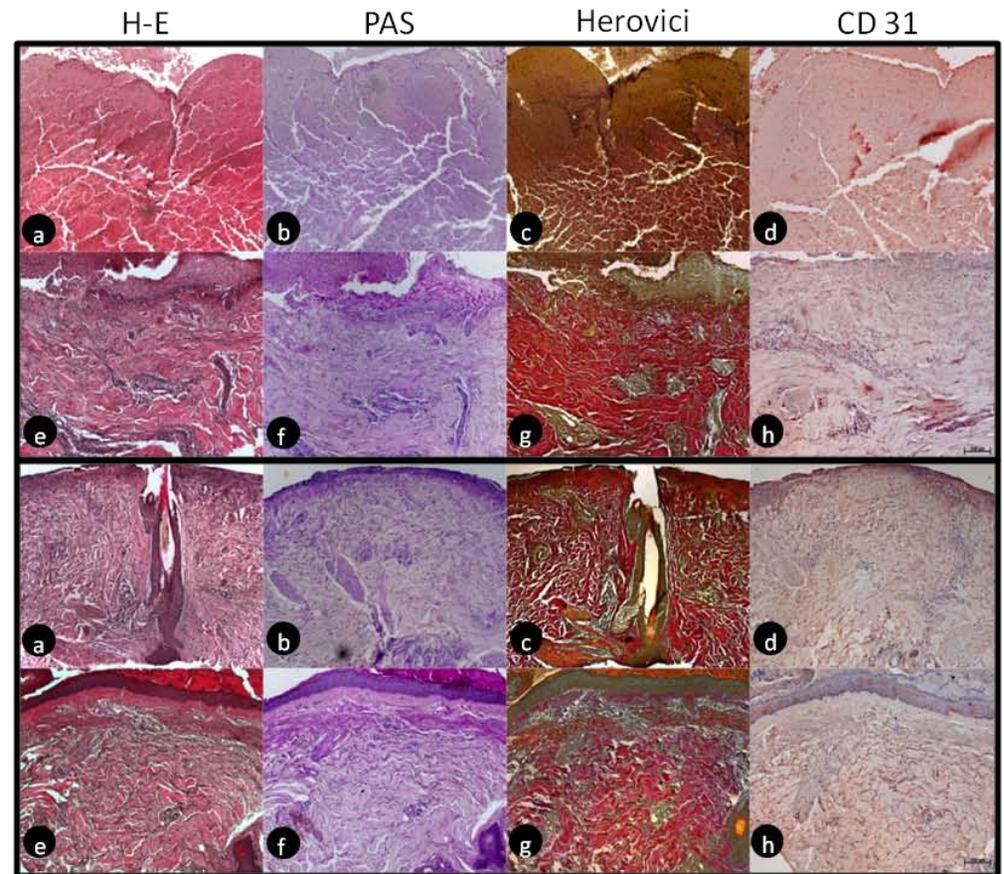
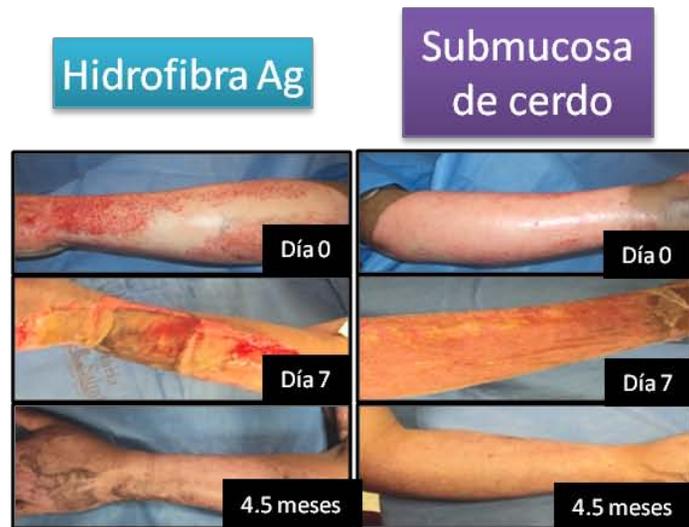
Px 2



Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la submucosa de cerdo.

Hidrofibra Ag vs Submucosa de cerdo

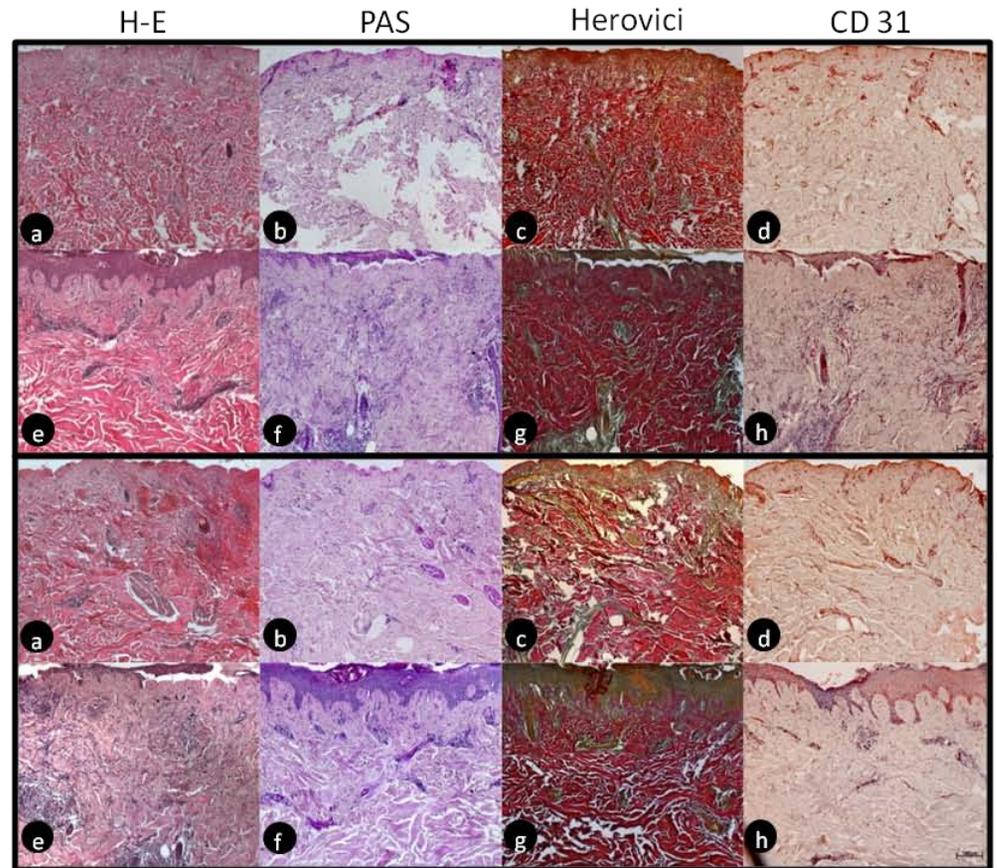
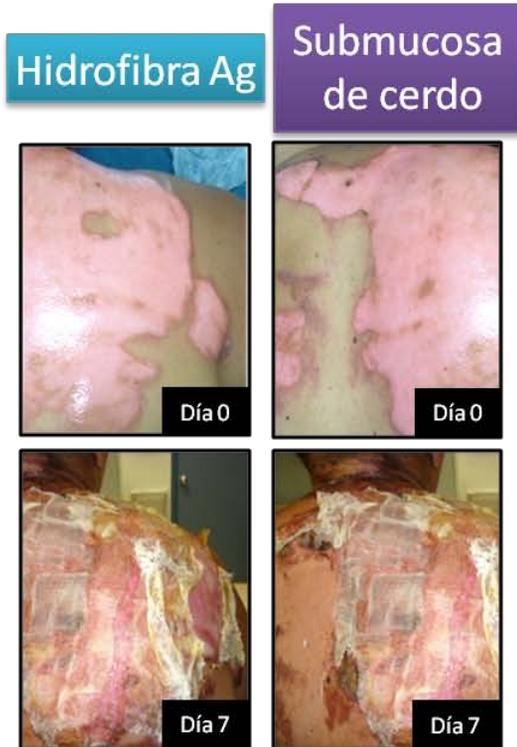
Px 3



Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la submucosa de cerdo.

Hidrofibra Ag vs Submucosa de cerdo

Px 4



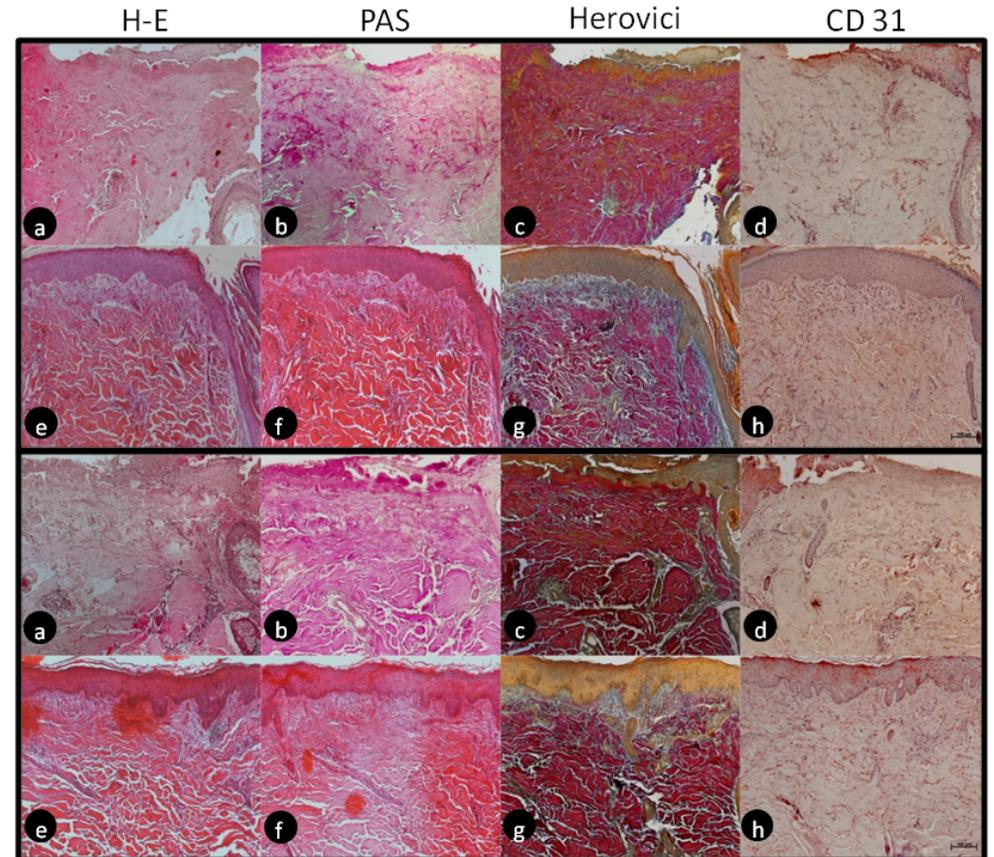
Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la submucosa de cerdo.

Hidrofibra Ag

Submucosa
de cerdo

Hidrofibra Ag vs Submucosa de cerdo

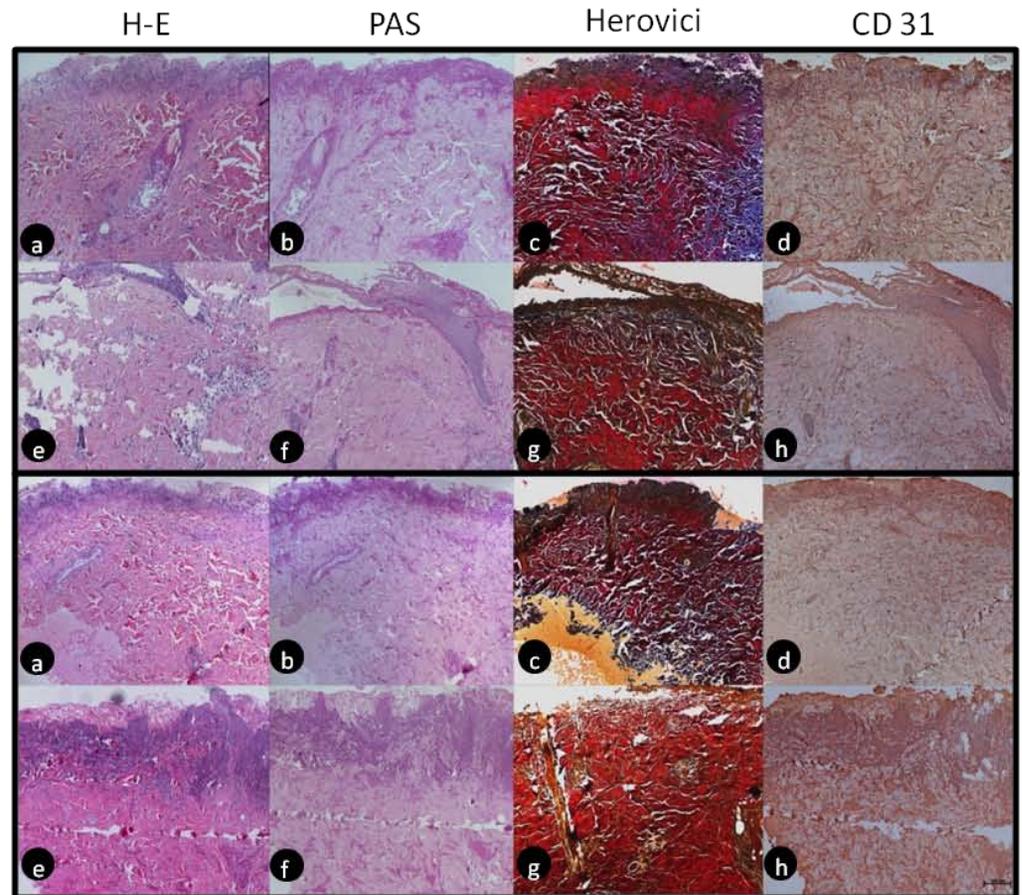
Px 5



Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la submucosa de cerdo.

Hidrofibra Ag vs Suspensión de queratinocitos

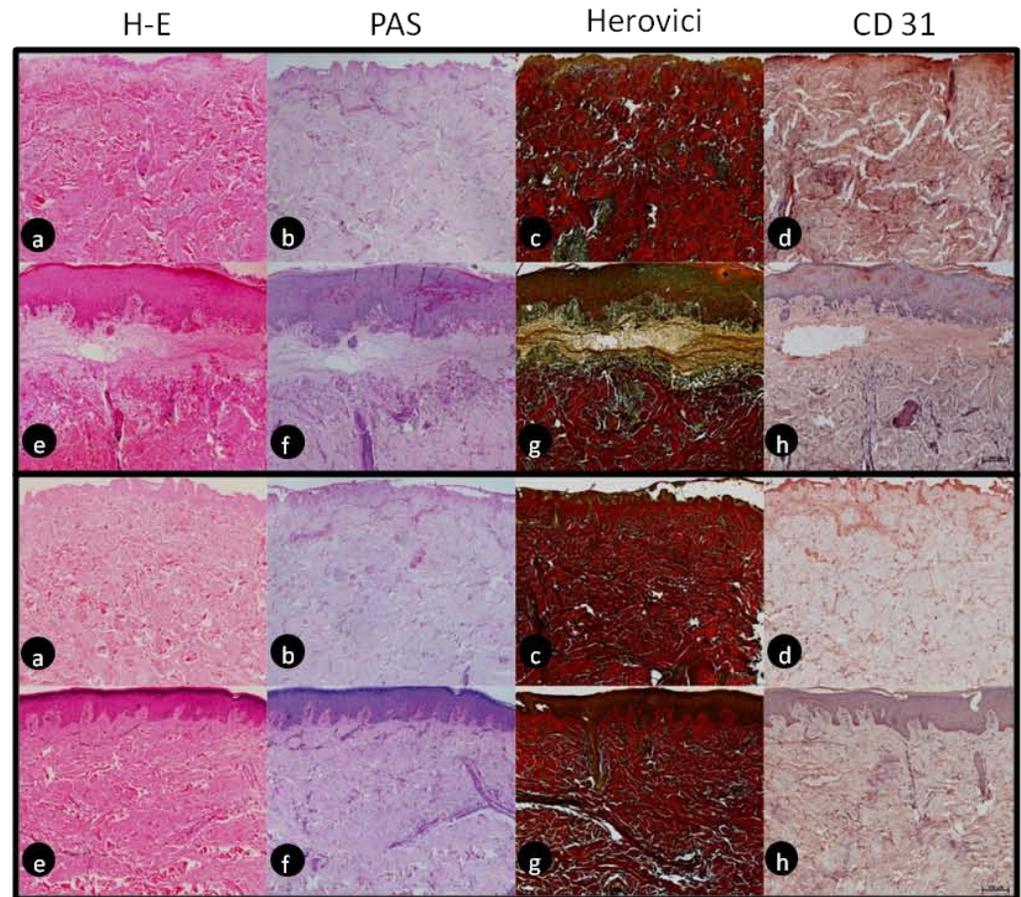
Px 1



Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la suspensión de queratinocitos autólogos.

Hidrofibra Ag vs Suspensión de queratinocitos

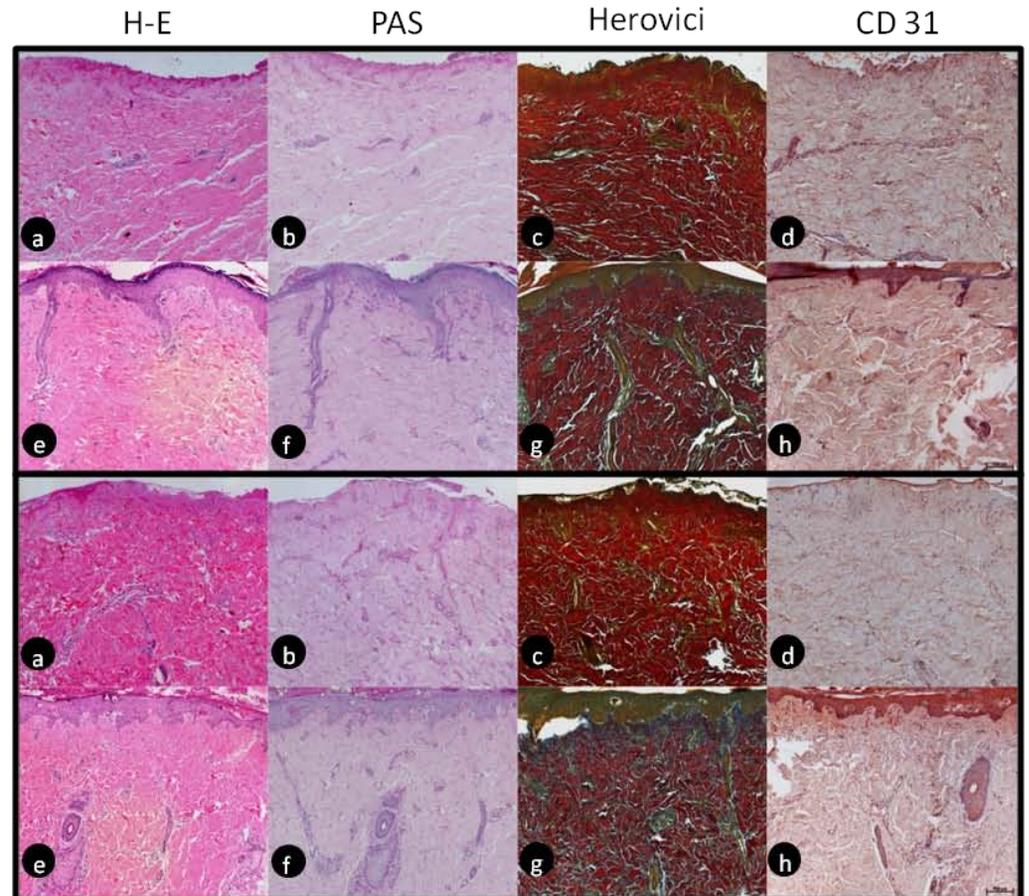
Px 2



Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la suspensión de queratinocitos autólogos.

Hidrofibra Ag vs Suspensión de queratinocitos

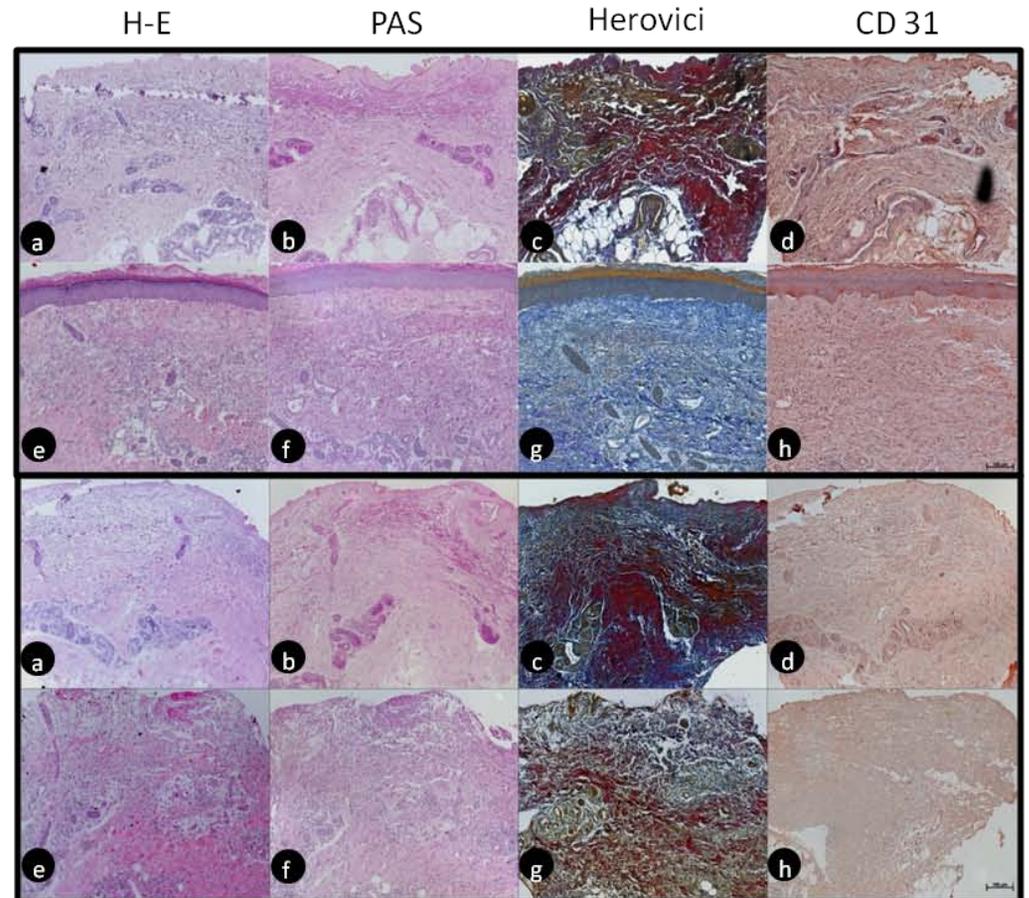
Px 3



Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la suspensión de queratinocitos autólogos.

Hidrofibra Ag vs Suspensión de queratinocitos

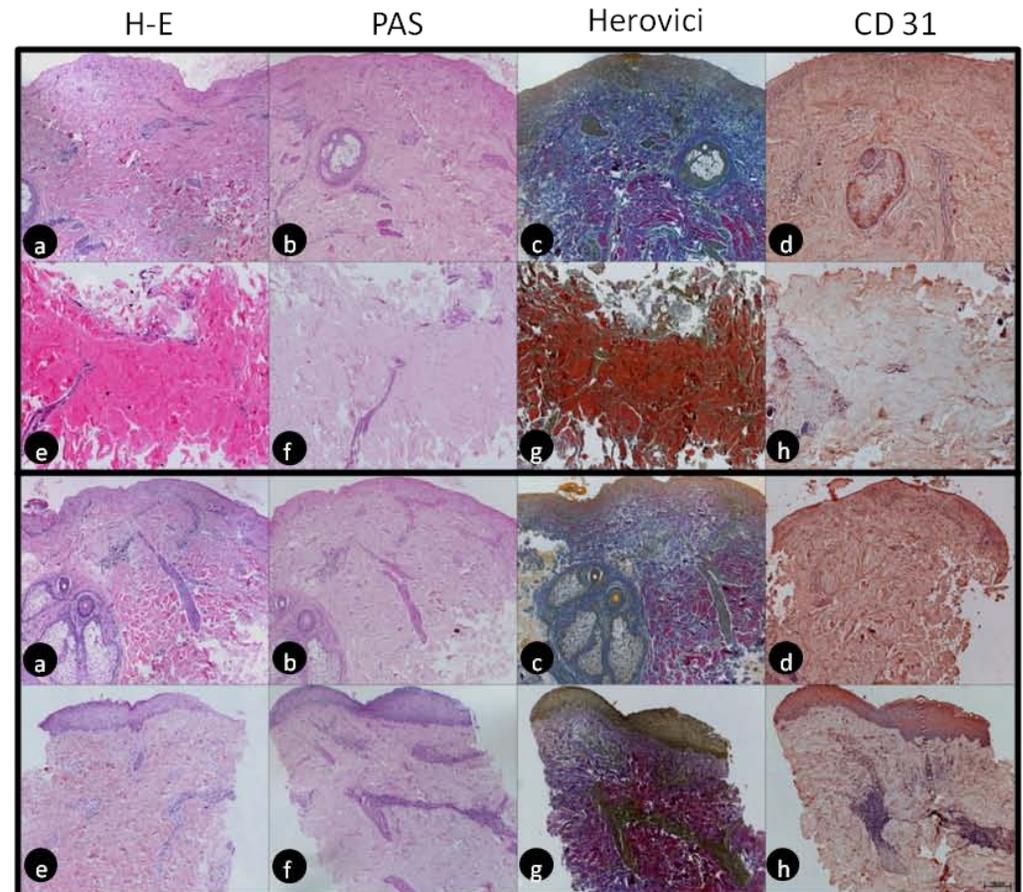
Px 4



Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la suspensión de queratinocitos autólogos.

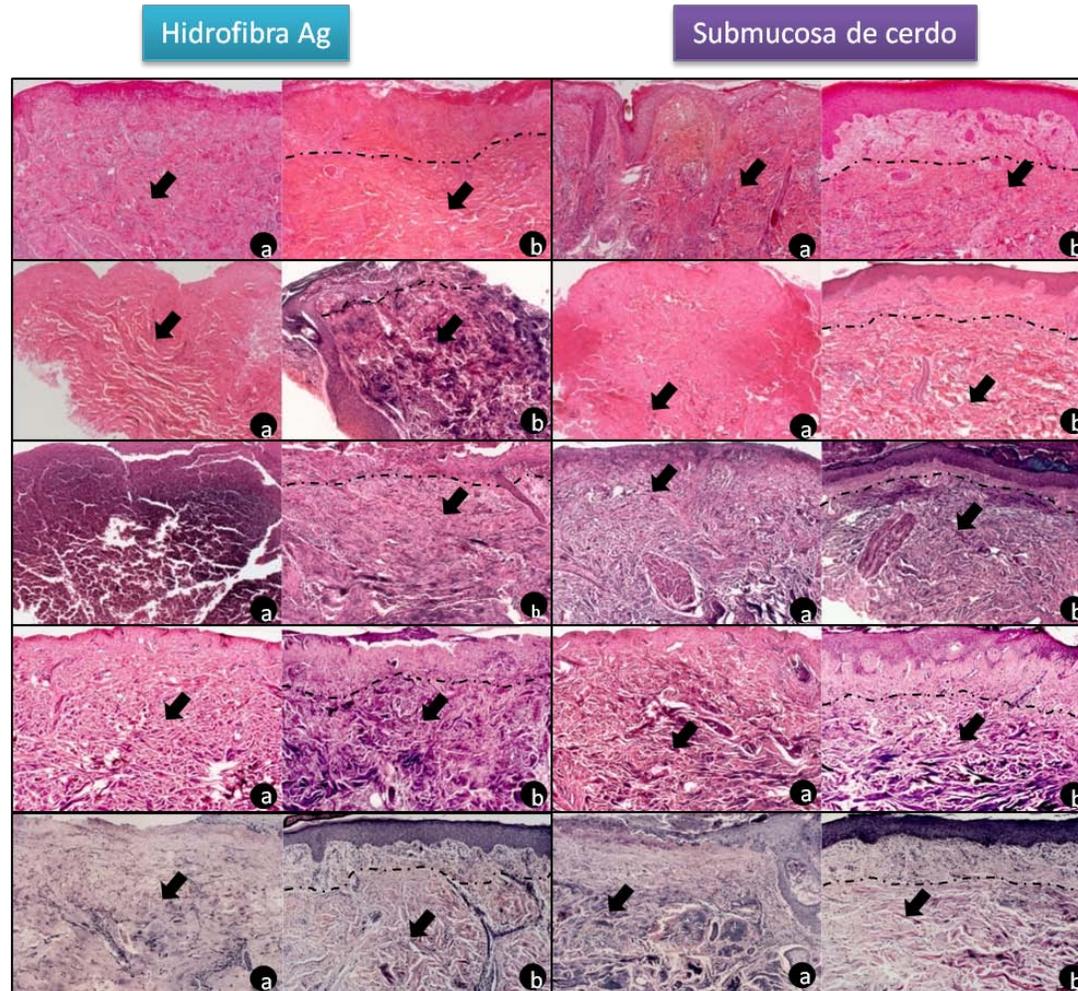
Hidrofibra Ag vs Suspensión de queratinocitos

Px 5



Fotomicrografías de los tejidos (a-d) corresponde a la muestra inicial, (e-h) corresponde a los 7 días post-tratamiento, el panel superior corresponde a los pacientes tratados con la hidrofibra Ag el panel inferior corresponde a los pacientes tratados con la suspensión de queratinocitos autólogos.

Anexo3: Fibras de elastina.



Fotomicrografías de los tejidos correspondientes a las muestras iniciales (a) y a los 7 días post-tratamiento (b) las flechas indican la presencia de las fibras de elastina, la línea punteada indica la zona de reparación con ausencia de fibras de elastina.

Anexo 4: Tablas de resultados histológicos

Resultados histológicos Hidrofibra Ag vs Susp de queratinocitos

Px	Etapa	Tratamiento	Grado Qx	Infiltrado		Linfocitos	Neutrofilos	fbs activos	Colágena	
				papilar /	reticular				I / III	
1	inicial	Hidrofibra Ag	2do. Super	4	3	0	2		5	1
1	inicial	Susp. Querat	2do. Super	4	2	0	2		5	0
2	inicial	Hidrofibra Ag	2do. Super	3	4	1	2		3	4
2	inicial	Susp. Querat	2do. Super	2	4	0	1		2	3
3	inicial	Hidrofibra Ag	mixta	0	3	1	0	si	4	3
3	inicial	Susp. Querat	mixta	0	3	0	1		5	3
4	inicial	Hidrofibra Ag	1er grado	0	1	0	1		5	0
4	inicial	Susp. Querat	1er grado	0	1	0	1		5	1
5	inicial	Hidrofibra Ag	sin dato	0	2	1	1		5	0
5	inicial	Susp. Querat	mixta	0	0	0	1		5	0
1	final	Hidrofibra Ag		3	4	0	2		5	1
1	final	Susp. Querat		2	4	0	2		5	1
2	final	Hidrofibra Ag		0	2	1	0		5	1
2	final	Susp. Querat		2	2	1	0		5	4
3	final	Hidrofibra Ag		4	4	1	1	si	0	5
3	final	Susp. Querat		4	4	2	0		1	5
4	final	Hidrofibra Ag		1	1	0	1		5	1
4	final	Susp. Querat		1	1	0	1		5	1
5	final	Hidrofibra Ag		2	2	2	1		5	2
5	final	Susp. Querat		0	0	0	1		5	1

Fbs (fibroblastos)

No se encontró diferencia estadística.

Resultados histológicos Hidrofibra Ag vs Submucosa de cerdo

Px	Etapa	Tratamiento	Grado Qx	Infiltrado		Linfocitos	Neutrofilos	Eosinófilos	Colágena	
				<i>papilar / reticular</i>					<i>I / III</i>	
1	inicial	Hidrofibra Ag	2do. Super	3	2	0	2	0	4	1
1	inicial	Submucosa	2do. Super	3	1	0	2	1	4	0
2	inicial	Hidrofibra Ag	mixta	3	2	1	1	0	4	3
2	inicial	Submucosa	2do. Super	2	2	1	1	0	5	2
3	inicial	Hidrofibra Ag	mixta	2	2	0	1	0	5	0
3	inicial	Submucosa	Mixta	0	1	0	0	0	5	0
4	inicial	Hidrofibra Ag	mixta	0	3	0	1	0	5	2
4	inicial	Submucosa	mixta	2	2	1	2	1	4	3
5	inicial	Hidrofibra Ag	2do. Super	4	2	1	1	0	5	0
5	inicial	Submucosa	2do. super	0	0	0	0	0	5	0
1	final	Hidrofibra Ag		2	0	2	1	0	4	3
1	final	Submucosa		3	3	2	0	0	3	4
2	final	Hidrofibra Ag		2	0	1	0	0	3	1
2	final	Submucosa		4	4	0	3	0	5	4
3	final	Hidrofibra Ag		1	1	2	2	0	5	1
3	final	Submucosa		3	3	1	0	0	5	1
4	final	Hidrofibra Ag		3	3	1	0	0	3	4
4	final	Submucosa		1	1	1	0	0	5	2
5	final	Hidrofibra Ag		2	2	0	1	0	5	0
5	final	Submucosa		3	1	0	1	0	5	0

No se encontró diferencia estadística.

Anexo 6: Tabla de vasculatura**Número de vasos sanguíneos**

Px	Tratamiento	fase	Área	vasos	#/1000μ^2	Cambio
1	Hidrofibra Ag	inicial	7428.73	48	6.461400535	
	submucosa	inicial	7624.37	21	2.754325931	
	Hidrofibra Ag	final	6521.18	56	8.587402893	1.3290312
	submucosa	final	5452.2	35	6.41942702	2.3306708
2	Hidrofibra Ag	inicial	7227.95	24	3.320443556	
	submucosa	inicial	6071.35	26	4.282408361	
	Hidrofibra Ag	final	4579.37	30	6.551119477	1.97296517
	submucosa	final	7117.34	60	8.430115745	1.96854551
3	Hidrofibra Ag	inicial	/	/	/	
	submucosa	inicial	6798.79	58	8.530929768	
	Hidrofibra Ag	final	6942.99	16	2.304482651	0
	submucosa	final	5131.87	48	9.353315653	1.0964005
4	Hidrofibra Ag	inicial	6925.97	40	5.775364317	
	submucosa	inicial	7200.75	54	7.499218831	
	Hidrofibra Ag	final	7402.88	44	5.943632748	1.02913555
	submucosa	final	7057.3	45	6.376376235	0.85027206
5	Hidrofibra Ag	inicial	5970.43	47	7.872129813	
	submucosa	inicial	7705.88	60	7.786261919	
	Hidrofibra Ag	final	8502.08	58	6.821860062	0.86658379
	submucosa	final	7944.97	63	7.92954536	1.01840208

Promedio	Hidrofibra Ag	1.29942893
	Submucosa de cerdo	1.45285819

No se encontró diferencia estadística

Número de vasos sanguíneos

Px	Tratamiento	fase	Área	vasos	#/1000μ^2	Cambio
1	Hidrofibra Ag	inicial	9439.16	68	7.204030867	
	Susp querat	inicial	8180.57	52	6.356525279	
	Hidrofibra Ag	final	5752.5	42	7.301173403	1.01348447
	Susp querat	final	5202.63	24	4.613051476	0.72571905
2	Hidrofibra Ag	inicial	8446.18	34	4.025488446	
	Susp querat	inicial	4046.3	20	4.942787238	
	Hidrofibra Ag	final	4905.47	38	7.746454468	1.92435144
	Susp querat	final	4192.28	35	8.348679	1.68906299
3	Hidrofibra Ag	inicial	11949.71	33	2.761573293	
	Susp querat	inicial	4496.32	35	7.784143477	
	Hidrofibra Ag	final	10925.55	82	7.50534298	2.71777794
	Susp querat	final	4950.22	29	5.858325489	0.75259732
4	Hidrofibra Ag	inicial	6043.34	36	5.956970814	
	Susp querat	inicial	9086.39	26	2.861422413	
	Hidrofibra Ag	final	11236.12	43	3.82694382	0.64243119
	Susp querat	final	10729.91	61	5.685043025	1.98678916
5	Hidrofibra Ag	inicial	8882.37	103	11.59600422	
	Susp querat	inicial	10799.07	63	5.833835691	
	Hidrofibra Ag	final	9363.33	27	2.883589492	0.24867096
	Susp querat	final	17061.92	87	5.09907443	0.87405177

Promedio	Hidrofibra Ag	1.3093432
	Suspensión de queratinocitos	1.20564406

No se encontró diferencia estadística