

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**“CONTROL DE CALIDAD *IN VIVO* DE CONSTRUCTOS
DE PIEL HUMANA ELABORADA POR INGENIERÍA
TISULAR”**

Directores:

DR. D. MIGUEL ALAMINOS MINGORANCE

DR. D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ

DR. D. JOSÉ MIGUEL LABRADOR MOLINA

JOSÉ MARÍA JIMÉNEZ RODRÍGUEZ

2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José María Jiménez Rodríguez
D.L.: GR. 3484-2009
ISBN: 978-84-692-6384-6

CONTROL DE CALIDAD *IN VIVO* DE CONSTRUCTOS DE PIEL HUMANA ELABORADA POR INGENIERÍA TISULAR

Memoria que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugía
José María Jiménez Rodríguez
para aspirar al título de Doctor

Fdo.: José María Jiménez Rodríguez

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Miguel Alaminos Mingorance
Doctor en Medicina y Cirugía
Doctor en Ciencias Biológicas
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Antonio Campos Muñoz
Doctor en Medicina y Cirugía
Universidad de Granada

VºBº El Director de la Tesis

Fdo.: Dr. José Miguel Labrador Molina
Doctor en Medicina y Cirugía
Hospital Universitario Virgen de las Nieves

Departamento de Histología
Universidad de Granada
2008

A Cristina

A mis padres

*“No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz,
sin haber aumentado tus sueños.
No te dejes vencer por el desaliento”*

Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud muy especialmente:

A mis directores de tesis, el Dr. D. Miguel Alaminos Mingorance por su espíritu de trabajo, por ofrecerme su orientación en numerosas ocasiones, ejemplo, generosidad y calidad humana, y Dr. D. Antonio Campos Muñoz por introducirme en el conocimiento de la histología, guiarme en el desarrollo de esta tesis y por darme su cariño y acompañamiento en momentos difíciles.

Al Dr. D José Miguel Labrador Molina , por sus enseñanzas en el campo de cultivos celulares que me han permitido llevar a cabo esta tesis, sus consejos a nivel profesional y personal y por su valioso apoyo.

Al Dr. D. Manuel Lorient y al Dr. D. Francisco Lara, por facilitarme las cosas y prestarme su ayuda siempre que la he solicitado.

A la Dra. Dña Raquel Pérez y Dra. Dña. Rosina Martínez por su afabilidad y ayuda ante cualquier problema surgido.

Al Dr. D. Julio Villalba y Dr. D. Constantino Torreira por su dedicación, amabilidad y por estar siempre dispuestos a trasmitirme sus conocimientos.

Al Dr. D. Leopoldo Martín y Dr. D. Juan Gómez por su ayuda tan valiosa y desinteresada.

A mis compañeros Pietro, Antonio, Obdulia, Joan y Enrique por su buena disposición y el tiempo compartido. Y mis compañeros de laboratorio Ingrid, Renato y Amparo su entusiasmo en este trabajo y los momentos distendidos que hemos pasado.

A mi familia, en especial a mi novia Cristina, a mis padres, mi hermano Paco y mi primo Juan Manuel por su empuje e interés, a Arturo, Javi , Antonio, Salva y al resto de mis amigos que también han supuesto para mi un estímulo.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA PIEL.....	2
1.1 ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y FUNCIONES DE LA PIEL.....	2
1.2 PATOLOGIA DE LA PIEL.....	16
1.2.1 HERIDAS.....	16
1.2.2 ULCERAS POR PRESIÓN.....	25
1.2.3 QUEMADURAS.....	39
1.3 TRATAMIENTO DE LA PATOLOGIA DE LA PIEL.....	54
1.3.1 INJERTOS CUTÁNEOS.....	54
1.3.2 COLGAJOS CUTÁNEOS Y FASCIOCUTÁNEOS.....	58
2. INGENIERIA TISULAR.....	72
2.1 INTRODUCCION.....	72
2.2 CELULAS MADRE.....	73
2.2.1 CELULAS MADRE EMBRIONARIAS.....	73
2.2.2 CELULAS MADRE ADULTAS.....	76
2.3 INGENIERÍA TISULAR DE LA PIEL HUMANA.....	79
2.3.1 COBERTURAS SINTÉTICAS.....	79
2.3.1.1 Omiderm.....	79
2.3.2 COBERTURAS BIOSINTÉTICAS.....	80
2.3.2.1 Biobrane.....	80
2.3.2.2 Transcyte.....	82
2.3.2.3 Integra.....	83

2.3.3 COBERTURAS BIOLÓGICAS.....	84
2.3.3.1 Autoinjertos.....	84
2.3.3.2 Aloinjerto.....	84
2.3.3.3 Apligraf.....	87
2.3.3.4 Xenoinjerto.....	88
2.3.3.5 Cultivos de piel.....	89

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....95

MATERIAL Y MÉTODOS.....97

1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS A PARTIR DE BIOPSIAS DE PIEL.....	98
2. DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS.....	100
3. SUBCULTIVO DE LAS CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE PIEL.....	101
4. CONGELACIÓN DE CÉLULAS.....	102
5. CONSTRUCCIÓN DE SUSTITUTOS DE PIEL HUMANA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.....	103
6. MÉTODO ANESTÉSICO Y QUIRÚRGICO.....	106
7. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL.....	110
7.1 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	110
7.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	110

7.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	110
8.INMUNOFLUORESCENCIA.....	111
RESULTADOS.....	113
1.GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS Y ELABORACIÓN DE SUSTITUTOS DE PIEL HUMANA DE ESPESOR COMPLETO.....	114
2.EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL DE ESPESOR COMPLETO.....	118
3.EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL DE ESPESOR COMPLETO.....	121
3.1. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	121
3.1.1. Evaluación <i>ex vivo</i>	122
3.1.2. Evaluación <i>in vivo</i>	124
3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	126
3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	133
4.EVALUACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL DE ESPESOR COMPLETO.....	136
4.1 PANCITOQUERATINAS.....	138
4.2 CK 1.....	141
4.3 CK 10.....	144
4.4 INVOLUCRINAS.....	145

4.5 FILAGRINAS.....	149
DISCUSIÓN.....	152
CONCLUSIONES.....	165
ANEXO.....	167
BIBLIOGRAFÍA.....	169

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN:

He decidido elegir este tema ya que despierta un gran interés en la especialidad que estoy realizando (cirugía plástica, reparadora y estética) en la cual lo más frecuente es la patología de la piel, realizándose tanto injertos o colgajos cutáneos para cubrir defectos dérmicos ya sea en quemaduras o pérdida de sustancia. Se cuenta con gran experiencia, pero en los últimos años se están llevando a cabo nuevas intervenciones, con la ayuda de la ingeniería tisular, como el cultivo de piel obteniéndose mayor superficie de la misma cuando es necesario para cubrir amplias superficies de piel que ha sido dañada. Un ejemplo claro lo tenemos en los grandes quemados en los que no se podría realizar injerto de la piel autóloga debido a la escasez de zonas donantes. Estas intervenciones quirúrgicas en las que se usa piel artificial obtenida mediante ingeniería tisular son aún escasas, y aunque están en auge, aún queda mucho por investigar y desarrollar pues suponen un gran beneficio para el paciente, ya que con la sustracción de una pequeña biopsia de piel del propio paciente, seríamos capaces de obtener una superficie de piel artificial lo suficientemente amplia para cubrir el defecto cutáneo en cuestión, siendo mínimamente invasivos por tanto. Y he aquí el nexo de unión entre mi especialidad y la ingeniería tisular, aprovechando esto, voy a tratar de exponer la problemática de la terapéutica actual de la patología de la piel y como surge la ingeniería tisular como medio de solución a esta problemática.

1. LA PIEL

1.1 ESTRUCTURA, PROPIEDADES Y FUNCIONES DE LA PIEL

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, y juega un papel fundamental en el mantenimiento del equilibrio interno. Histológicamente, la piel está formada por tres capas, denominadas epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo (figura 3).

A) Epidermis

Es la porción más externa de la piel y constituye el 5 % del espesor total de la misma. Tiene 0,04-1,5mm de espesor (máximo en palmas y plantas). Está constituida por un epitelio escamoso estratificado que se queratiniza y origina los apéndices (uña, pelo, glándulas sebáceas y sudoríparas).

Desde un punto de vista histológico, la epidermis está constituida por distintos tipos de células (Figuras 1 y 2), las cuales se pueden clasificar como células intrínsecas o propias del epitelio y células extrínsecas (Tabla 1), tal como se detalla a continuación:

A.- Población intrínseca o propia del epitelio. Esta población está formada por los *queratinocitos*, los cuales constituyen alrededor del 90% de la población celular total del epitelio de la piel. Los queratinocitos son células del epitelio destinadas a queratinizarse en mayor o menor grado, siguiendo un proceso en el que las células se van especializando y van migrando hacia capas más superficiales de la piel. En su evolución, los queratinocitos migran desde las capas más profundas del epitelio hasta la superficie del mismo. Producida la mitosis, pueden permanecer en la capa basal o dividirse y migrar de nuevo hacia el exterior, siendo así células especializadas hasta convertirse en ocasiones en una escama queratinizada (anucleada) que más tarde se descama hacia el exterior. De este modo, la población epitelial queratinocítica que reviste la piel se renueva constantemente.

De este modo, los queratinocitos se pueden disponer en el epitelio formando hasta cinco capas o estratos:

- **Población Celular Intrínseca:**
 - 1) Queratinocitos (90% del total de células de la epidermis)
- **Población Celular Extrínseca:**
 - **Células Permanentes o Residentes (9% del total):**
 - 2) Melanocitos
 - 3) Células de Merkel
 - 4) Células de Langerhans
 - **Células Transitorias:**
 - 5) Granulocitos
 - 6) Linfocitos
 - 7) Monocitos

Tabla 1. Clasificación de células de los distintos estratos de la epidermis

1. **Estrato basal o germinativo**, consiste en una capa celular de una sola célula de espesor que se apoya sobre la lámina basal, formación extracelular que separa este epitelio del tejido conectivo de la dermis (Carrascal, 2001). La lámina basal se identifica fácilmente mediante la tinción ácida de Schiff y la positividad inmunohistoquímica para el colágeno IV. El estrato basal contiene células madre pequeñas y cúbicas con una pequeña cantidad de citoplasma, por ello, los núcleos se sitúan muy juntos. Las células madre darán origen a los queratinocitos maduros por división mitótica, los cuales van migrando conforme se van diferenciando desde este estrato hacia el estrato más superficial o estrato córneo, donde terminarán descamándose de la superficie de la piel (Ross y cols., 2004).

Los estudios de **cinética celular** han demostrado la existencia de tres poblaciones celulares en el estrato basal de la epidermis: las células madre, las células aceleradoras de tránsito (que sólo permanecen en este estrato hasta que se transforman en células comprometidas hacia la línea epidérmica) y las propias células comprometidas que tras dividirse ascienden rápidamente desde este estrato experimentando la diferenciación terminal en queratinocitos (Potten y Morris, 1988).

1. Las **células madre o células indiferenciadas**, tienen capacidad ilimitada de división, fenómeno que experimentan con lentitud denominándose por ello “slow-cycling stem cells” (Lavker y Sun, 2000). Pueden ser identificadas “in vivo” por su capacidad de retención de 3H-timidina a largo plazo y por la elevada expresión de integrinas $\beta 1$ y $\alpha 6$ que contrasta con la baja expresión del receptor de la transferrina (Janes y cols., 2002; Jones y cols., 1995a). Estas células poseen un extraordinario potencial de proliferación ya que gracias a ellas, la epidermis se renueva cada dos semanas durante toda la vida (Fuchs, 2001).

2. Las **células aceleradoras de tránsito**, poseen un potencial mitótico limitado a tan sólo 4 o 5 divisiones antes de transformarse en células terminalmente diferenciadas.

3. Las **células comprometidas**, que ya han perdido irreversiblemente la capacidad de dividirse e inevitablemente progresan hacia la línea queratinocítica, muestran pérdida de expresión de integrina $\alpha 6 \beta 4$ y expresión de queratina 1.

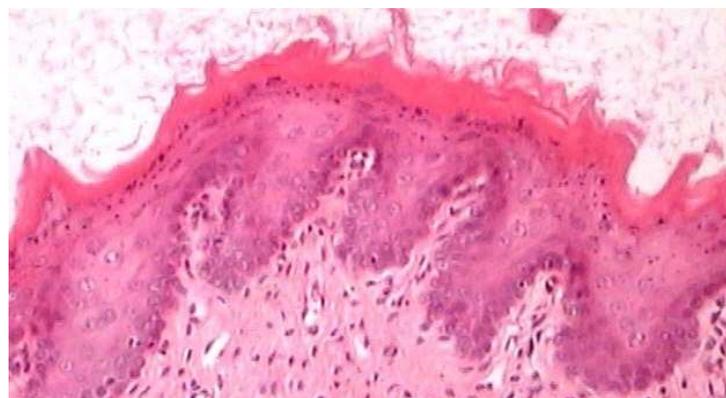


Figura 1. Epidermis humana observada por microscopía óptica con tinción hematoxilina-eosina.

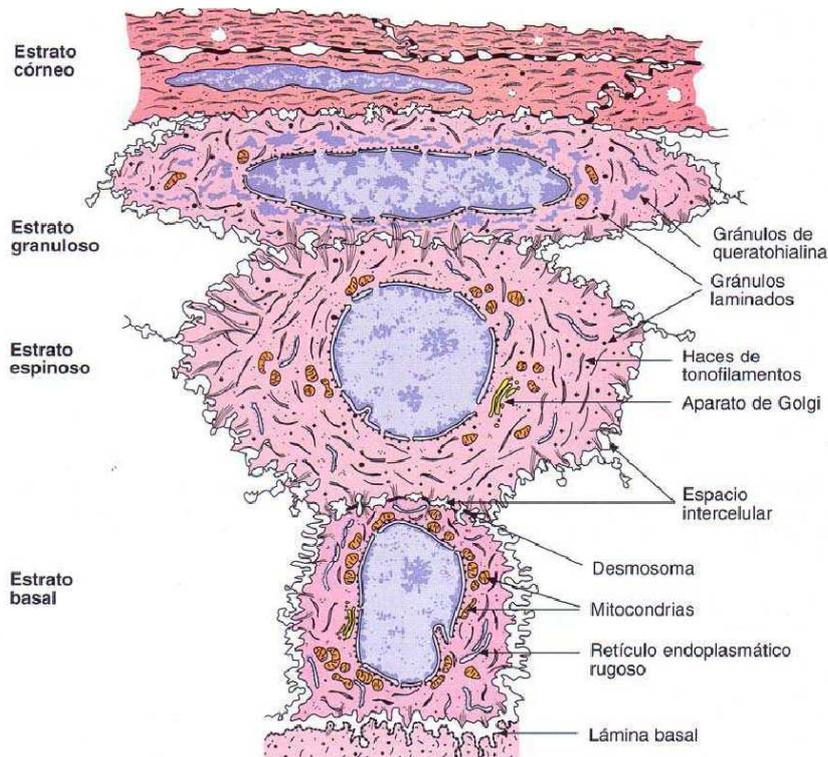


Figura 2. Esquema de los estratos de la epidermis humana.

2. Estrato espinoso: consta de varias células de espesor, cuyo tamaño es mayor que el de las células del estrato basal. Su característica peculiar es que poseen múltiples proyecciones citoplasmáticas o “espigas”. La unión de estas proyecciones entre células contiguas se realiza mediante desmosomas. Debido a este aspecto, las células de este estrato se denominan espinocitos.

3. Estrato granuloso: tiene de una a tres células de espesor que contienen abundantes gránulos de queratohialina de naturaleza basófila que se tiñen intensamente. Al igual que en el estrato espinoso, las células granulosas sintetizan la mezcla de glucoesfingolípidos, fosfolípidos y ceramidas.

4. Estrato lúcido: localizado únicamente en la piel gruesa. Posee aspecto refráctil. Contiene células eosinófilas en avanzado estado de queratinización. El núcleo y las organelas citoplasmáticas desaparecen conforme en la célula aumenta la presencia de queratina.

5. Estrato córneo: posee las células más diferenciadas de la epidermis. Tienen el núcleo y las organelas desintegradas, y la membrana plasmática engrosada. Son células cornificadas, que se van descamando y están ocupadas casi por completo de filamentos de queratina.

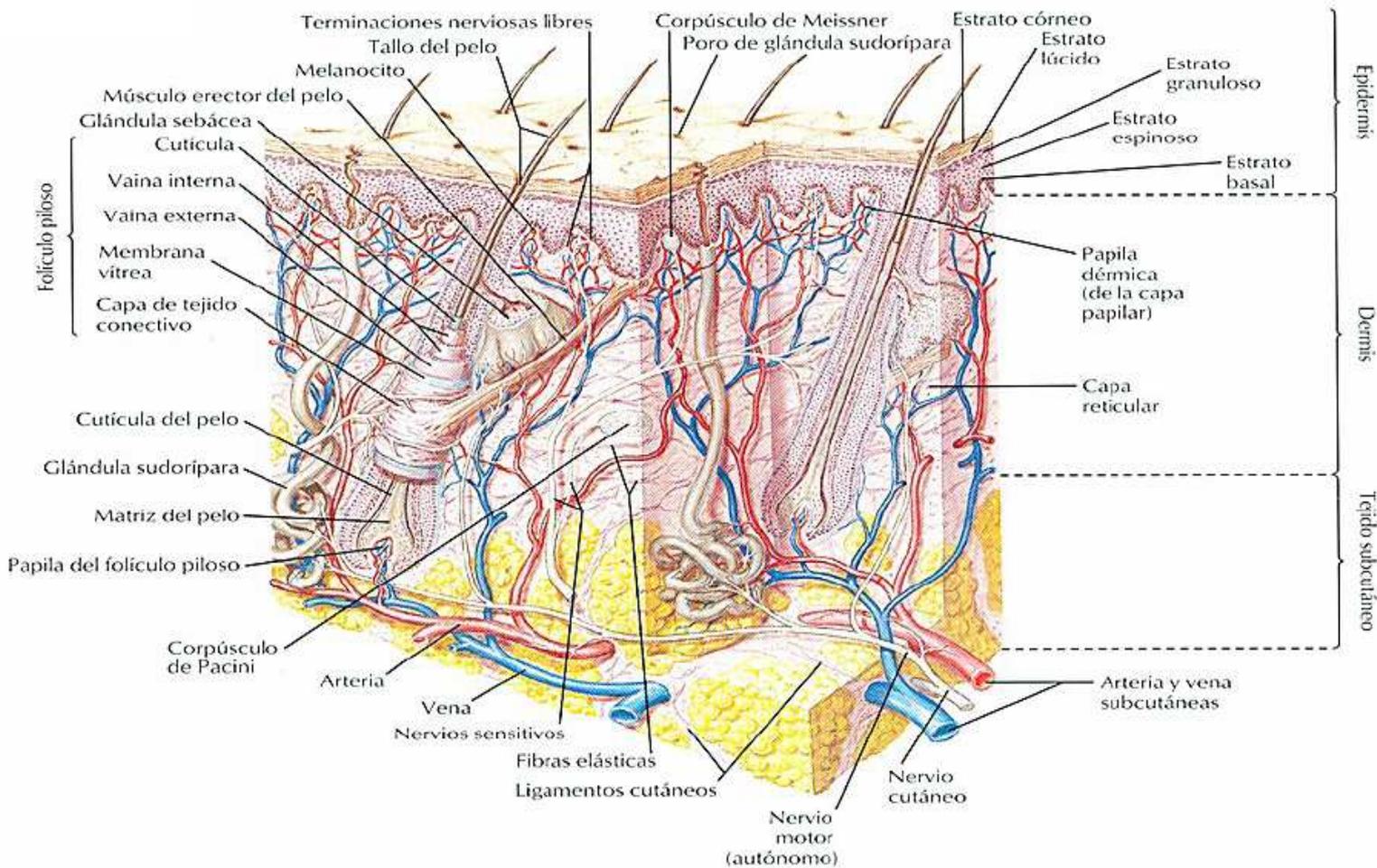


Figura 3. Esquema de piel humana, donde se detallan las distintas capas: epidermis, dermis y tejido subcutáneo.

B.- Población extrínseca: Esta población es de origen ajeno al epitelio, está formada por células permanentes y células transitorias, como se detalla a continuación:

- Población extrínseca permanente: Representa el 9% de la población celular del epitelio y está constituida por 3 tipos de células:

1. **Melanocitos**: Son células claras, de núcleo pequeño, de aspecto dendrítico, con abundantes gránulos precursores de melanina que en estados tempranos, se denominan premelanosomas y carecen de melanina. Al madurar, estos gránulos reciben el nombre de melanosomas, los cuales son transferidos a los queratinocitos, haciendo posible la pigmentación homogénea del epitelio. Cada melanocito tiene queratinocitos asociados a los que suministra melanina, por lo que a este conjunto de células se le conoce como unidad epitelial de la melanina (figura 4). Los melanocitos derivan de células que durante la vida embrionaria migran desde la cresta neural y se introducen en la epidermis en

desarrollo. La migración de los melanocitos hacia la epidermis, así como su supervivencia son dependientes tanto del receptor tirosin quinasa cKit como de su ligando, el factor de célula madre o “*stem cell factor*” (Haake y cols., 2001).



Figura 4. Imagen histológica correspondiente a la epidermis humana en la que se han marcado los melanocitos mediante una técnica inmunohistoquímica basada en diaminobencidina, la cual se puede detectar en color marrón oscuro.

2. Células de Merkel: Se encuentran entre las células de la capa basal del epitelio. Se diferencian de los melanocitos porque carecen de prolongaciones de tipo dendrítico (figura 6). Las células de Merkel participan en la percepción sensorial cutánea. En combinación con fibras nerviosas mielínicas aferentes forman parte de mecanorreceptores sensoriales, estando fundamentalmente implicadas en las sensaciones de tacto (Tachibana, 1995; Munger, 1991).

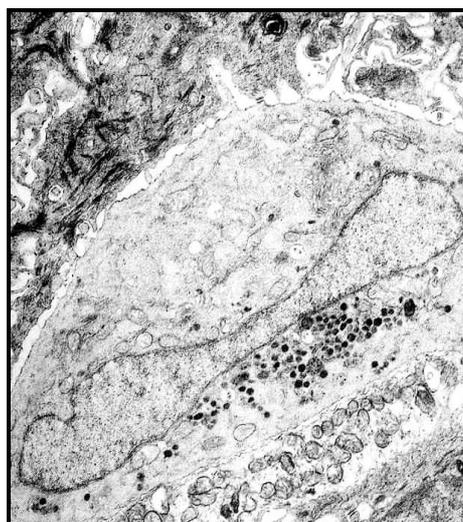


Figura 5. Detalle de célula de Merkel observada con MET

3. Células de Langerhans: Son células presentadoras de antígenos, que participan en reacciones de hipersensibilidad retardada a través de la captación de antígenos en la piel y su posterior transporte hacia los ganglios linfáticos. En estado activado expresan el receptor IgFc, el receptor interleuquina 2 (CD25) y CD4. También expresan la proteína S100, vimentina, E-cadherina y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1) (Cruz, 2001; Udey, 1997). En secciones tisulares de piel humana, el marcador específico de células de Langerhans es el anticuerpo antiCD1a (Hauser y cols., 1991). En la mayoría de los casos, las células de Langerhans aparecen en el estrato espinoso de la epidermis, aunque pueden encontrarse en cualquiera de sus estratos. Las células de Langerhans poseen prolongaciones de morfología dendrítica, y en su interior poseen gránulos de Birbeck (Figura 6). Además, estas células ejecutan la primera respuesta celular intraepidérmica frente a los antígenos tumorales y los microorganismos, desempeñando también un papel destacado en el rechazo de los injertos de piel (McKee y cols., 2005).

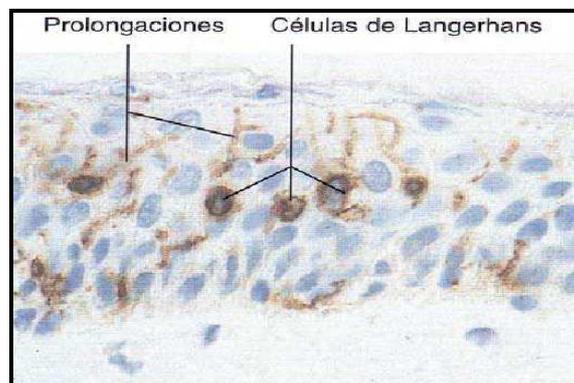


Figura 6. Detalle célula de Lagerhans donde se pueden observar sus prolongaciones de morfología dendrítica, y en su interior poseen gránulos de Birbeck

- Población extrínseca transitoria: Esta población representa alrededor del 1% de las células del epitelio y está constituida por granulocitos, linfocitos y monocitos sanguíneos que pueden infiltrarse ocasionalmente en la epidermis para responder a una agresión local.

B) Unión dermoepidérmica

Presenta una gran complejidad de estructura, función y composición química. De acuerdo a su estructura, consta de dos capas fundamentales: la lámina basal y la lámina reticular. Al microscopio electrónico de transmisión, en la lámina basal podemos distinguir la *lámina lucida* o membrana electro-transparente y la *lámina densa* o membrana electro-densa. En general, podemos distinguir cuatro componentes en la

unión dermoepidérmica: las membranas celulares de los queratinocitos basales con sus complejos de unión a la lámina basal (hemidesmosomas); la lámina basal y los componentes fibrosos asociados a la lámina reticular (fibrillas de fijación, microfibrillas dérmicas y fibras de colágeno).

La unión dermoepidérmica es una barrera semipermeable la cual permite el intercambio de células y líquidos entre la epidermis y la dermis. También actúa como soporte estructural para la epidermis y proporciona cohesión a la unión entre la epidermis y la dermis (figura 7).

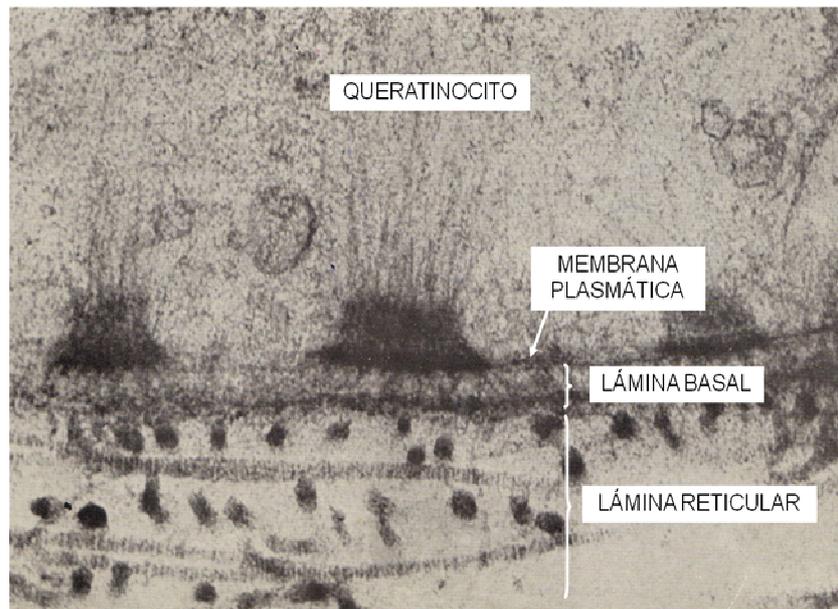


Figura 7. Imagen de MET donde se muestra la lámina y los componentes fibrosos asociados a la lámina reticular

C) Dermis

La dermis constituye la capa intermedia de la piel y constituye el 95% del espesor total de ésta. Alcanza su máximo espesor en la espalda, donde puede llegar a ser 30 veces más gruesa que la epidermis.

La dermis es un sistema de tejido conectivo fibroso que contiene redes nerviosas y vasculares y los apéndices formados por la epidermis (folículos pilosos, glándulas, etc.). Como todos los tejidos conectivos, la dermis está formada por distintos tipos de células y una gran cantidad de matriz extracelular.

Las células propias de la dermis son los fibroblastos, los cuales constituyen la población celular más abundante, existiendo, además, un gran número de células procedentes de la piel, incluyendo macrófagos, mastocitos y linfocitos.

El componente extracelular de la dermis consiste en una cantidad variable de sustancia fundamental amorfa en la que aparecen gran cantidad de fibras de colágeno, fibras

elásticas y otros tipos de materiales fibrosos y globulares. Desarrollaremos estos componentes a continuación:

El Colágeno

Forma el almacén extracelular más importante de todos los organismos pluricelulares. Es una proteína compleja sintetizada por una amplia diversidad de tipos celulares entre los que se incluyen los fibroblastos, miofibroblastos, osteoblastos, condroblastos, células musculares lisas, células endoteliales y varios tipos de células epiteliales (Wenstrup y cols., 1991). Se conocen al menos 20 tipos de colágenos diferentes (Kadler y cols., 1996), designados con números romanos (I a XX) en función de su morfología, composición aminoacídica y de sus propiedades físicas. Los enlaces entrecruzados, son el principal factor que favorece la resistencia a la tensión del colágeno (Cotran y cols., 2000); la formación de enlaces covalentes depende en parte del enzima lisil-oxidasa (McKee y cols., 2005).

La piel, gracias a la organización de las fibras colágenas, presenta zonas donde la elasticidad normal de la piel se ejerce con menos fuerza. Las líneas que se forman en estas zonas se denominan líneas de menor tensión de la piel o líneas de Langer. Normalmente se corresponden con las arrugas y son perpendiculares a la contracción de los músculos de la región.

Las incisiones electivas deben seguir las Líneas de Langer para que la cicatriz sea más favorable (figura 8).

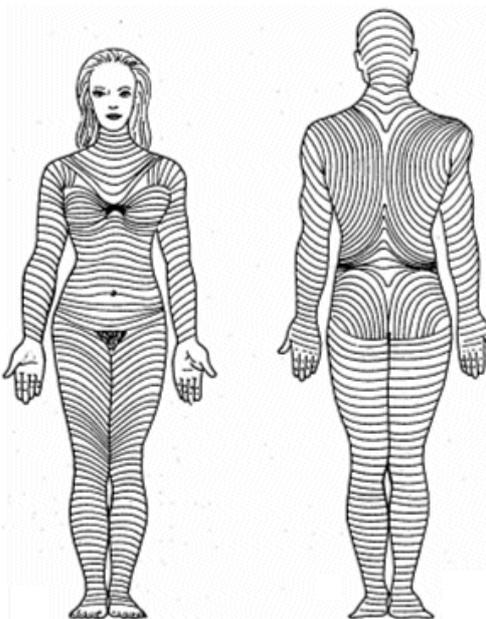


Figura 8. Líneas de menor tensión en la piel humana o líneas de Langer.

Componente elástico

Las fibras elásticas son en esencia las responsables de las propiedades retráctiles de la piel (Uitto, 1991a), aunque son un componente minoritario en la dermis normal (24%). Estas fibras son sintetizadas por los fibroblastos y también por las células musculares lisas. Están íntimamente asociadas con el colágeno, pero no pueden distinguirse mediante tinciones histológicas convencionales, siendo necesarias otras como la tinción de Orceína, elastina o de van Gieson.

En la dermis papilar las fibras elásticas son finas y tienden a situarse perpendiculares a la superficie de la piel, mientras que en la dermis reticular son más gruesas y se suelen orientar de modo paralelo a dicha superficie. A microscopía electrónica, se observa que las fibras elásticas se componen de microfibrillas de aproximadamente 11nm de diámetro, embebidas en una sustancia electrodensa amorfa de naturaleza proteica conocida con el nombre de **elastina** (Christiano y cols., 1992), la cual es un polipéptido de 800 aminoácidos con un peso de aproximadamente 72,000 daltons. La elastina está formada de un “armazón” de moléculas de fibrilina de la que se conocen tres tipos diferentes. La fibrilina es una proteína de alto peso molecular rica en cisteína y que también posee regiones de factor de crecimiento epidérmico de particular importancia por su capacidad de unión al calcio (Uitto y cols., 1991b; Goetinck y Winterbottom, 1991). La elastina posee entre otros aminoácidos desmosina e isodesmosina, que ayudan a mantener la integridad estructural de las fibras elásticas debido a su participación en enlaces covalentes. Durante la síntesis de la fibra elástica se forma primero el componente microfibrilar, que después será embebido en la elastina.

La sustancia fundamental amorfa

Constituye el medio en el que se encuentran los componentes celulares y fibrosos de la piel. Sus funciones más importantes se centran en el transporte de agua y electrolitos así como en otras de permeabilidad y osmolaridad de los fluidos intersticiales. Se compone mayoritariamente de agua, existiendo cantidades variables de fibronectina y glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, condroitín sulfato 4 y dermatán sulfato), (Goetinck y Winterbottom, 1991) que son sintetizados por los fibroblastos de la piel y posiblemente por las células musculares lisas y los mastocitos.

- ❖ La **vascularización dérmica** consta de un plexo superficial, que atraviesa la dermis paralelamente a la epidermis, y proporciona una rica red de capilares, arteriolas terminales y vénulas a las papilas dérmicas. El plexo profundo se localiza en la porción inferior de la dermis junto al tejido subcutáneo. Está compuesto por vasos de mayor calibre. La epidermis es avascular y su nutrición se produce por simple difusión.
- ❖ Los **linfáticos dérmicos** se encuentran asociados al plexo vascular.
- ❖ La dermis es rica en **nervios**. El tacto y la presión están mediados por los corpúsculos de Meissner y los corpúsculos de Paccini (mecanoreceptores). La temperatura y el dolor son transmitidos por fibras nerviosas amielínicas que terminan en la dermis papilar y alrededor de los folículos pilosos.

Las fibras adrenérgicas post-ganglionares del sistema nervioso autónomo regulan la vasoconstricción, la secreción de las glándulas apocrinas y la contracción de los músculos erectores del pelo. La secreción sudorípara ecrina está mediada por fibras colinérgicas.

Según su estructura, podemos diferenciar dos regiones distintas en la dermis:

Dermis papilar: ubicada justo debajo de la epidermis, se compone de tejido conjuntivo laxo con colágenos de tipo I y III principalmente, y de finas fibras elásticas organizadas en una red irregular. Posee vasos sanguíneos pertenecientes al plexo subpapilar (Kierszenbaum, 2002), que se extienden hacia arriba para irrigar la epidermis pero sin penetrar en ella (ya que ésta es un tejido avascular). Presenta además, prolongaciones nerviosas que terminan en la dermis o que alcanzan la epidermis penetrando a través de la lámina basal.

En el límite entre las dos capas dérmicas se encuentra un grupo de vasos sanguíneos correspondientes al plexo cutáneo (Kierszenbaum, 2002).

Dermis reticular: Es la más profunda, siendo de mayor espesor. Se compone de tejido conjuntivo denso, de colágeno tipo I mayoritariamente, y de fibras elásticas, que son algo más gruesas que en el estrato anterior. El colágeno y las fibras elásticas se organizan en líneas regulares de tensión.

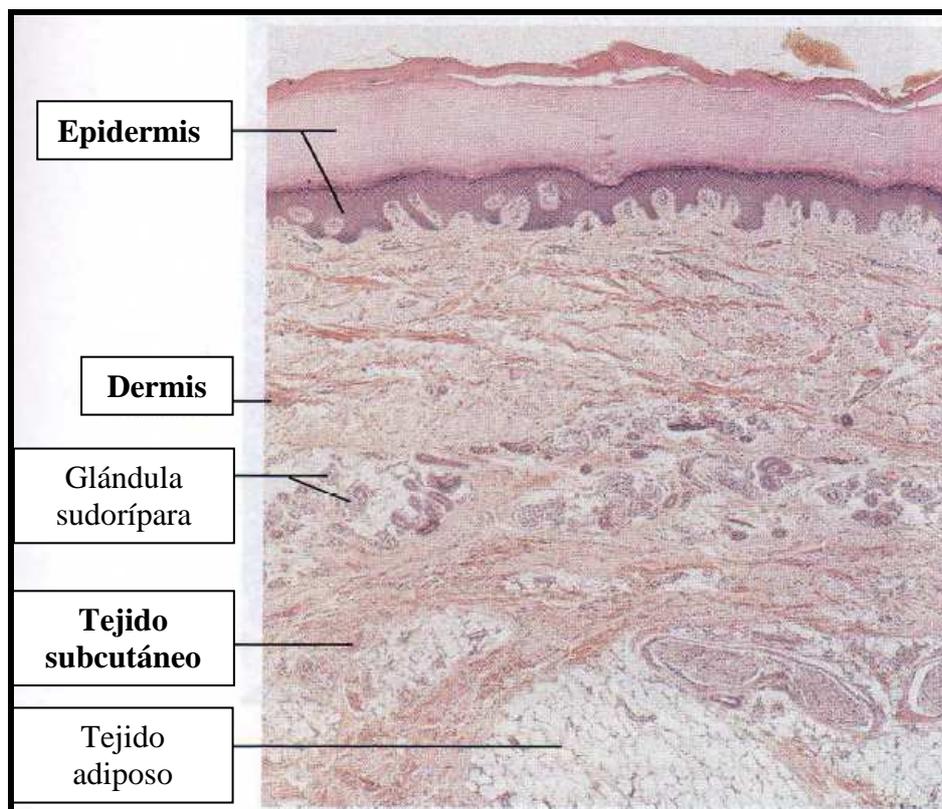


Figura 9. Imagen obtenida con microscopía óptica teñida con H-E, donde se detallan las distintas capas: epidermis, dermis y tejido subcutáneo.

Tejido celular subcutáneo

El tejido celular subcutáneo constituye la capa más interna de la piel (figura 9). Está compuesta por lóbulos de adipocitos separados por tabiques fibrosos formados por colágeno y vasos sanguíneos de gran calibre (Kierszenbaum, 2002). Recientemente, se ha descubierto que este tejido es muy rico en células madre adultas multipotentes, las cuales se han utilizado en distintos protocolos de ingeniería tisular.

Anejos cutáneos

Conjunto pilosebáceo: Es una unidad anatómica constituida por el folículo piloso, la glándula sebácea y el músculo erector del pelo.

El folículo piloso posee tres segmentos:

- Bulbo piloso: compuesto por matriz y papila dérmica. Está situado en la profundidad dérmica y termina en la inserción del músculo erector del pelo.
- Istmo: desde la inserción del músculo erector hasta la apertura en el folículo piloso de la glándula sebácea.
- Infundíbulo: desde la desembocadura de la glándula sebácea hasta su desembocadura en la superficie epidérmica.

El músculo erector del pelo está constituido por fibras musculares lisas y es el único elemento muscular liso de la dermis.

El ciclo de crecimiento del pelo consta de tres fases:

- Anagen o fase de crecimiento activo.
- Catagen o fase de involución.
- Telogen o fase de reposo.

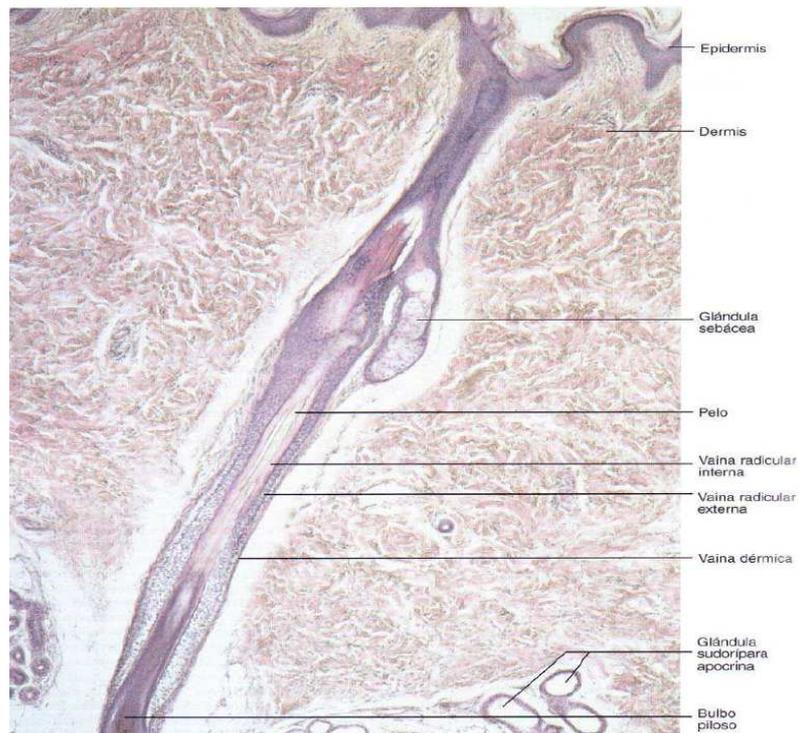


Figura 10. Imagen obtenida con microscopía óptica teñida con H-E, donde se detallan las distintas unidades del conjunto pilosebáceo: el folículo piloso, la glándula sebácea y el músculo erector del pelo.

En el cuero cabelludo el 80 % de los pelos están en anagen, que dura años; el resto en fase catagen, que dura 2-4 semanas, o en telogen, que dura 2-4 meses.

Las glándulas sebáceas son glándulas multilobuladas que se encuentran en todas las regiones corporales, excepto las palmas y plantas de pies. Son más abundantes en las zonas seboreicas, que son tronco y cara. Las hormonas androgénicas estimulan su desarrollo. La función del sebo es bacteriostática, aislante y feromona (Ross, 2004).

Glándula apocrinas: Son glándulas de tipo tubular simple, que almacena su secreción y bajo estímulo simpático sale al exterior. Se encuentran en las axilas, genitales externos, areola, conducto auditivo externo (glándulas ceruminosas) y párpados (glándulas de Moll). Tienen una acción poco conocida, pero la secreción bajo acción de las bacterias podría actuar como feromona (Ross, 2004).

Glándula sudoríparas ecrinas: Se encuentran en casi toda la piel, excepto en borde de labios, lecho ungueal, labios menores y glande. Son más numerosas en palmas y plantas. Se sitúan en la profundidad de la dermis y la hipodermis y son independientes del folículo piloso y de la glándula sebácea. La secreción ecrina está compuesta fundamentalmente por agua y tiene función termoreguladora, pues la evaporación del sudor enfría la superficie corporal. Se regula por el sistema autónomo a través de fibras colinérgicas (Ross, 2004).

Uñas: Son placas cornificadas compuestas por células con diferente queratinización y producidas por la matriz ungueal. La matriz de la uña empieza proximalmente bajo el surco ungueal proximal y distalmente alcanza hasta el borde de la media luna blanca o lúnula. La piel que se encuentra debajo del extremo libre de la uña se denomina hiponiquio. Bajo el epitelio existe una dermis muy vascularizada, lo que le da el color rosado al lecho ungueal. El crecimiento de la uña desde la parte proximal a la distal, dura aproximadamente 6 meses (Ross, 2004).

PROPIEDADES DE LA PIEL

Como cobertura externa corporal, posee funciones de vital importancia para la supervivencia. Sus dos capas de tejidos tienen cometidos específicos, aunque como órgano, la piel trabaja como un todo. La epidermis gracias a la queratina, representa una barrera física de protección frente a la entrada de agentes nocivos como bacterias y toxinas que además, impide la evaporación de agua en exceso. Recientemente Niyonsaba y cols. 2005, han descrito la presencia de agentes antimicrobianos que constituyen el escudo químico natural protector de la piel, tales como β -defensina, catelicidina LL37 y lisozima. La melanina sintetizada por los melanocitos, protege nuestro organismo de los efectos nocivos de los rayos ultravioleta y las células de Langerhans constituyen una defensa inmunológica.

- Viscoelasticidad de la piel: se deben tener en cuenta dos aspectos, la capacidad de estiramiento temporal y la capacidad de recuperación después de un estiramiento máximo. El primero se presenta cuando tras una pérdida de piel, los bordes de la herida se separan excesivamente y la sutura directa presenta mucha tensión. En este caso se dan puntos de aproximación a los bordes de la herida y se liberan después (a modo de pre-sutura). Así se consigue un estiramiento adicional. Esta propiedad de la piel se utiliza en las expansiones intraoperatorias. La capacidad de recuperación después de un estiramiento máximo se da cuando en el momento intraoperatorio la piel queda muy tensa y pobre en circulación. Si no se sobrepasa un cierto límite de tensión, al cabo de unas horas, la piel se distiende y recupera su color.
- Propiedades tensoras de la piel: normalmente la piel se mantiene bajo cierta tensión, más en los jóvenes que en los adultos. Esta tensión influye negativamente en el resultado de la cicatriz. Las incisiones que siguen las líneas de menor tensión de la piel (de Langer) cicatrizan mejor y con mayor rapidez. Así, en zonas donde la tensión cutánea es grande (hombros y pre-esternal) se dan con mucha frecuencia cicatrices hipertróficas y queloides. Cuando la tensión cutánea es más rápida que su capacidad de estiramiento, se rompen las fibras colágenas y se originan estrías cutáneas. Esto se observa en el embarazo u obesidad de rápido aumento. Cuando la tensión sobrepasa la capacidad de estiramiento de la piel se produce la obstrucción de los vasos sanguíneos y linfáticos. Por este mecanismo se producen numerosas úlceras y necrosis de colgajos.
- Extensibilidad de la piel: la elasticidad de la piel es mayor en niños y en zonas de piel delgada. Con la edad se pierde elasticidad y se reemplaza por la laxitud de la

piel. La piel que está sobre las articulaciones es más extensible, lo que permite los movimientos. Por el contrario, en zonas con mayor grosor de la piel, con presencia de pelo y fijación por trabéculas a planos profundos (palmas y plantas), la extensibilidad será menor.

- Reparación-Regeneración de la piel: Para poder soportar las continuas agresiones que si bien no son muy severas, son continuas, la piel a nivel de la epidermis, posee su propio sistema de autorrenovación programada representado funcionalmente por cuatro compartimentos: el compartimento de células madre, el de las células aceleradoras de tránsito, células en estado de diferenciación y células terminalmente diferenciadas (Janes y cols., 2002).

FUNCIONES DE LA PIEL

Las funciones de la piel son numerosas, destacando fundamentalmente las que se describen a continuación:

- Función barrera (contra microorganismos y radiación ultravioleta).
- Órgano de protección.
- Mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico.
- Producción de melanina.
- Metabolismo de secreciones internas y externas.
- Regulación de la temperatura.
- Regulación del pH cutáneo (pH 5,5).
- Función de lubricación.
- Reparación de las heridas.
- Reacciones inflamatorias.
- Identificación personal.
- Comunicación con el medio ambiente.
- Función inmunológica.

1.2 PATOLOGÍA DE LA PIEL:

Existen diversas patologías de la piel de las cuales las más frecuentes y de interés en mi especialidad serían las heridas, úlceras por presión y las quemaduras, voy a exponer cada una de ellas indicando el tratamiento específico de las mismas

1.2.1 HERIDAS

Una herida es una solución de la continuidad normal de los tejidos. El hombre, en su evolución filogenética, perdió su capacidad de regenerar miembros o tejidos. Hoy sólo conserva la posibilidad de reparar las lesiones de sus tejidos con un proceso de cicatrización, es decir, con un tejido similar aunque no idéntico. Sin esta capacidad de autorreparación el medio interno saldría al exterior permanentemente, lo cual sería incompatible con la vida. La cicatrización cutánea es un proceso reparativo complejo que conduce a la regeneración del epitelio y el reemplazo de la dermis por un tejido fibroso constituido por colágeno con características diferentes al normal. Las nuevas fibras son más cortas y desorganizadas, por lo que la cicatriz nunca presenta la fuerza tensora de la piel ilesa.

No existe hasta el momento ningún medio o factor que acelere la cicatrización normal de las heridas. Por lo que el papel del cirujano se debe limitar a favorecer y facilitar la tendencia natural que tienen todos los tejidos a cicatrizar.

Cicatrización

Fenómeno biológico que comprende varios procesos perfectamente ensamblados y ordenados. Desde el mismo momento en que se produce la agresión a un tejido, se activa una cascada de señales moleculares que dan lugar a una secuencia concatenada de procesos que integran las siguientes fases: inflamatoria, proliferativa y reparadora, y de remodelación (Clark, 1996). Hay un considerable intervalo de tiempo en la sucesión de todas estas fases, que hasta completar todo el proceso se puede prolongar varios meses (Bennet y Schultz, 1993b).

Fase inflamatoria

La inflamación representa la reacción de defensa del organismo ante la acción de un agente nocivo. Todas las heridas presentan reacciones inflamatorias. Su duración es aproximadamente de tres días (Hartmann, 1999). El primer objetivo de los procesos reparativos es el de detener la hemorragia. Al producirse una lesión, desde las células dañadas se liberan sustancias vasoactivas que provocan una constricción de los vasos (vasoconstricción) evitando una mayor pérdida de sangre. El sistema de coagulación se activa a través del complejo proceso de aglomeración de trombocitos, para de ese modo cerrar de manera permanente el lugar de la lesión. Así se origina un coágulo que detiene la hemorragia, cierra la herida y la protege de posibles contaminaciones bacterianas y de la pérdida de humores. Además sirve de reservorio de citocinas y factores de crecimiento (FC) que son liberados en la degranulación plaquetaria (Zimmerman y cols., 2000). Este "cocktail" precoz de FC constituye el inicio de los procesos de cierre de la herida: proporciona señales quimiotácticas para reclutar células inflamatorias circulantes hacia la zona de la herida, inicia los movimientos tisulares de reepitelización y contracción del tejido conectivo, y estimula la

característica respuesta angiogénica de la herida (Martin, 1997). Transcurridas 24 horas se produce la migración de los monocitos a la región de la herida reclutados desde la circulación sanguínea, que se transforman en macrófagos en la zona de la lesión, alcanzando su pico a las 48 horas después de producirse la herida. Los macrófagos ocupan un papel central en la cicatrización, de hecho, ésta no sería posible sin su participación. Si la infiltración de macrófagos es impedida, la cicatrización es severamente dañada (Leibovich y Ross, 1975). Los macrófagos liberan una batería de citocinas/FC en la herida, esenciales para la reparación, que amplifican las señales previas liberadas por la degranulación plaquetaria y los neutrófilos (Martin, 1997), que a su vez estimulan y controlan la deposición de proteínas de la matriz, la angiogénesis y la reepitelización (Slavin, 1996).

Fase proliferativa

En esta fase, que comienza aproximadamente al cuarto día, predomina la proliferación celular con el fin de alcanzar la reconstitución vascular y de volver a rellenar la zona defectuosa mediante el tejido granular. Los FC liberados por los macrófagos estimulan la migración de fibroblastos, células epiteliales y células del endotelio vascular ilesas de los márgenes de la herida (Grant y cols., 1987, 1992); a su vez, estas células proliferan, aumentando la celularidad de la herida, e iniciando la fase proliferativa, que a menudo dura varias semanas (Hartmann, 1999).

A partir del cuarto día comienza a rellenarse la zona de la lesión de un nuevo tejido, denominado tejido de granulación. Su formación es iniciada, principalmente por fibroblastos, que producen por una parte colágeno y por otra proteoglicanos (macromoléculas de matriz extracelular).

La región central de una herida es hipóxica. La reparación de la herida no puede progresar sin nuevos vasos (Hartmann, 1999). Gracias a los FC, los vasos intactos del borde de la herida generan brotes vasculares que migran a la zona lesionada y al coágulo sanguíneo colindante (Risau, 1997; Clark y cols., 1996; Fisher y cols., 1994).

Fase de diferenciación y remodelación

Entre el 6º y 10º día comienza la maduración de las fibras de colágeno. La herida se contrae, se reduce cada vez más la presencia vascular y el contenido de agua en el tejido granular, que gana en consistencia, y se transforma finalmente en el tejido cicatricial. La epitelización cierra el proceso de curación de la herida (Hartmann, 1999). El metabolismo del colágeno dentro de la herida es un equilibrio entre síntesis y degradación (Slavin, 1996). Diversos FC como el PDGF, el FGF, y algunas citocinas (IL-1, TNF- α) inducen la secreción de metaloproteinasas (MMPs) por parte de fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, y algunas células epiteliales, que degradan el colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. Una vez formadas, las MMPs son inhibidas rápidamente por sus inhibidores tisulares (TIMPs). El resultado final de los procesos de síntesis y degradación es la remodelación (Goetzi, 1996). La retracción de las fibras colágenas sólo desempeña un papel secundario en la contracción de la herida. Los fibroblastos del tejido de granulación tienen una intervención mucho más decisiva en la contracción, ya que una vez finalizan sus actividades de secreción se transforman en parte en fibrocitos (estado de reposo) y en parte en miofibroblastos, que al igual que las células musculares lisas contienen actomiosina, proteína muscular con capacidad para generar fuerzas contráctiles (Clark, 1996; Desmoulière y cols., 1993; Berry y cols., 1998).

Del tejido granular parten las señales quimiotácticas, (KGF), que actúan sobre los queratinocitos para que se inicie la migración de las células epiteliales desde los bordes de la herida (Nanney, 1990), además, proporciona una superficie húmeda deslizante para que lleven a cabo su migración. La reepitelización se origina a partir de los apéndices de epidermis residual y de los epitelios de los márgenes laterales de la herida (Hartmann, 1999; Garlick y Taichman, 1994; Kidd y cols., 1971). Las uniones de hemidesmosomas tienen que ser disueltas, y los primeros queratinocitos de los bordes de la herida tienen que expresar nuevas integrinas, en orden a alcanzar un sostén sobre la matriz provisional de la herida y desplazarse sobre la dermis subyacente a ella (Breuss y cols., 1995; Haapasalmi y cols., 1996; Grinnell, 1992).

Cuando la superficie denudada de la herida ha sido cubierta por una monocapa de queratinocitos, la migración epidérmica cesa, y una nueva epidermis estratificada con una membrana basal subyacente es reestablecida desde los márgenes internos de la herida (Clark, 1996).

Por el modo de evolución, podemos establecer dos grupos fundamentales de heridas: Heridas agudas, que son lesiones discretas que vienen seguidas de una fase de cicatrización relativamente rápida; y heridas crónicas, que se desarrollan durante un largo periodo de tiempo (usualmente no inferior a dos meses) y que se caracterizan por un significativo retraso en el proceso cicatrizal (Saulis y Mustoe, 2001).

Modelos experimentales de cicatrización

A pesar de ser la cicatrización un mecanismo universal, cada proceso, al mismo tiempo es modulado por tantos factores o variables que lo convierten en un hecho singular. A nivel cutáneo, los modelos experimentales con animales han sido cruciales en el avance obtenido en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la cicatrización de heridas. Múltiples estudios en animales han revolucionado nuestra percepción en este campo. La siguiente clasificación (Saulis y Mustoe, 2001) no incluye todos los modelos de cicatrización de heridas existentes, pero sí aquellos que han sido más relevantes.

Modelos de heridas agudas

Hay tres tipos principales:

- heridas incisas, similares a las heridas quirúrgicas
- heridas excisionales de espesor parcial
- heridas por quemaduras.

Modelos de cicatrización retrasada

Los modelos con demora en su cicatrización principalmente empleados son:

- heridas isquémicas,
- heridas en animales envejecidos,
- heridas crónicas,
- heridas de úlceras por presión. Modelos en animales inmunodeprimidos.

Hay cuatro grupos esenciales:

- heridas en animales diabéticos,
- heridas inducidas por la radiación,
- heridas en animales tratados por esteroides,
- heridas en animales tratados con inmunodepresores.

Modelos con cuerpos extraños

Entre ellos encontramos los modelos tipo: “wound chambers” (espacio muerto cubierto por cubiertas deslizables), modelos de espacio muerto (como los implantes porosos que permiten el crecimiento del tejido de granulación dentro de ellos a través de los poros, y así se puede estudiar este tejido, separado de otros procesos como la epitelización y la contracción de la herida (Saulis y Mustoe, 2001), y modelos que utilizan de forma provisional cuerpos extraños que actúan como sistemas de liberación de principios activos que posteriormente se degradan hasta desaparecer por completo del medio tisular.

Otros

Además de los modelos descritos en los últimos años, han surgido otros nuevos que han revolucionado con nuevas perspectivas el tratamiento de los procesos de reparación entre ellos destacan sobre todo y de forma muy reciente los que implica las técnicas de ingeniería tisular en todas sus acepciones, tanto como terapia guiada, constructos (piel artificial) ó células madre (Llames y cols., 2006; Jiménez y Jiménez, 2004), y es hacia estos modelos hacia donde se dirige nuestra atención en esta memoria.

Tipos de cicatrización

- Cierre primario: Se produce cuando la herida se cierra dentro de las primeras horas tras su creación. Los bordes de la herida son aproximados directamente. El metabolismo del colágeno aporta fuerza tensional de la herida. Las enzimas de la matriz extracelular regulan la formación de colágeno y la degradación de la matriz y permiten la remodelación de la herida, dejando así una cicatriz estrecha. La epitelización cubre la superficie de la herida y actúa como barrera a la infección.
- Cierre primario retrasado: Los bordes de la herida son aproximados varios días después del traumatismo, una vez solventado el riesgo de infección de la herida. Después de 3 o 4 días las células fagocíticas ya han entrado en la herida y la angiogénesis ha comenzado. Las células inflamatorias destruyen las bacterias contaminantes. El metabolismo del colágeno no se altera y la fuerza tensional que se obtiene es la misma que mediante el cierre primario.
- Cierre secundario: El cierre secundario de una herida de espesor total se produce por contracción y epitelización. La herida disminuye de tamaño por la contracción producida por los miofibroblastos. Estas células aparecen al tercer día, aumentan su número hasta los 20 días siguientes y desaparecen cuando la contracción se completa.

- **Cierre de heridas de espesor parcial:** Las heridas que afectan al epitelio y a la capa superficial de la dermis cicatrizan mediante epitelización. Las células epiteliales de los folículos pilosos y glándulas sebáceas vecinas se dividen para cubrir toda la dermis expuesta. Hay una mínima formación de colágeno y no se produce contracción (Saulis y Mustoe, 2001).

Factores que influyen en la cicatrización

- **Técnica de sutura:**

Líneas de Langer: las heridas que siguen estas líneas afectan menos la resistencia funcional de los tejidos y permiten que los bordes de la herida se junten más fácilmente y con menos tensión, produciendo así mejores cicatrices. Si siguen una dirección perpendicular favorece la tensión y una cicatriz ancha, hipertrófica o retráctil.

Técnica quirúrgica: es muy importante el tratamiento atraumático de las heridas. Se ha de retirar el tejido necrótico y los cuerpos extraños de la superficie cruenta. Las suturas no deben estar muy apretadas ni muy cerca de los bordes de la herida. Se debe evitar la aparición del hematoma con una buena hemostasia; afrontar bien los bordes de la herida y evitar el cierre a tensión. La forma de la cicatriz es importante: las cicatrices circulares dan malos resultados y las rectas se retraen más pero son menos visibles que las quebradas.

Se recomienda utilizar suturas no absorbibles que producen menos reacción de los tejidos y retirarlas precozmente (5 días en la cara, y entre 7-10 días en tronco y extremidades).

- **Edad:**

Se han observado diferencias en la formación de matriz celular, en el depósito de tejido conectivo y en la actividad celular, de forma que en sujetos jóvenes la tasa de cicatrización es más rápida.

- **Temperatura local:**

Un ligero aumento de la temperatura local (30 grados C) favorece la cicatrización ya que aumenta la irrigación sanguínea.

- **Infección de la herida:**

La infección bacteriana de una herida, especialmente por ciertos organismos como el estreptococo beta-hemolítico y pseudomona, retrasan la cicatrización. El crecimiento bacteriano, la actividad enzimática bacteriana y la prolongación de la fase inflamatoria provocan destrucción local de los tejidos. Cierta contaminación de las heridas suele ser normal, incluso un controlado crecimiento bacteriano puede acelerar la cicatrización.

La inmunosupresión, los corticoides y la malnutrición son factores predisponentes a la infección de las heridas.

- **Malnutrición:**

En pacientes con malnutrición se han observado dificultades de cicatrización debido a diversos factores. La malnutrición proteica afecta al metabolismo

proteico del organismo y altera la síntesis de colágeno y la formación de tejido conectivo.

La falta de vitamina C, un cofactor necesario para la hidroxilación del procolágeno, conlleva una alteración en la reparación tisular y la dehiscencia de heridas.

La vitamina A es importante para la epitelización, la síntesis de glucoproteínas y proteoglucanos; es un cofactor para la síntesis de colágeno y revierte alguno de los efectos indeseables de los corticoides.

Muchas otras vitaminas incluyendo la riboflavina, piridoxina y tiamina actúan como cofactores para la formación de colágeno.

La deficiencia de Zinc, requerido por la DNA y RNA polimerasa, retrasa la epitelización y la proliferación fibroblástica. El hierro es un cofactor de la hidroxilación del colágeno y su déficit altera la capacidad bactericida de los fagocitos. El cobre es necesario para el funcionamiento de la lisil-oxidasa que actúa en la formación de colágeno. El magnesio activa enzimas indispensables para la producción energética y síntesis de proteínas. El déficit de alguno de estos elementos perjudica la respuesta inflamatoria.

La malnutrición severa produce inmunosupresión que conlleva un riesgo aumentado de infecciones y también altera la cicatrización mediante el anormal funcionamiento de citoquinas y factores de crecimiento.

- **Fármacos:**

Los corticoides provocan una disminución de la vascularización, inhiben la proliferación fibroblástica, disminuyen la producción de proteínas, y disminuyen la epitelización y formación de colágeno. La vitamina A parece contrarrestar estos efectos, pero el uso clínico de esta sustancia no ha demostrado beneficios concluyentes en humanos. Dado que el efecto de los corticoides sobre la cicatrización es debido a una deficiencia de la respuesta inflamatoria, se recomienda la administración de los mismos cuando éste proceso ya esté establecido (aproximadamente el tercer día postoperatorio), así sólo se verán afectadas la epitelización y la contracción.

Si se inyectan corticoides intralesionales tras la exéresis de un queloide, las suturas se han de dejar más tiempo del que sería necesario en situaciones normales.

Los quimioterápicos actúan interfiriendo la síntesis de DNA y RNA, la división celular y la síntesis de proteínas. Por lo tanto el efecto negativo sobre la cicatrización ocurre principalmente en la fase proliferativa. Muchos pacientes que reciben este tratamiento padecen también neutropenia y predisposición a la infección, factores que afectan por sí mismos a la cicatrización.

Los fármacos inmunosupresores como la prednisona, azatioprina y ciclosporina alteran la normal respuesta de las células responsables de la fase inflamatoria de la cicatrización, causando una deficiencia en la reparación tisular.

Los vasoconstrictores locales, como la adrenalina, alteran las defensas locales y potencian la infección. Por lo que deben evitarse en tejidos contaminados.

La hormona somatotropa y hormonas androgénicas son indispensables para la cicatrización ya que favorecen la proliferación de tejido conectivo. Niveles altos de estas hormonas harán que una segunda herida hecha a los pocos días de la primera cicatrice más rápido.

- **Radioterapia:**

La radioterapia tiene efectos agudos y crónicos sobre los tejidos que perjudican la cicatrización o incluso provocan dehiscencia de tejidos ya cicatrizados. Los efectos agudos son eritema, inflamación, edema y ulceración. Los efectos crónicos son más difíciles de tratar y consisten en cambios de pigmentación, atrofia de epidermis y dermis, telangiectasias, disminución de la vascularización, necrosis, y neoplasias.

La contractura sobre las articulaciones se ha de prevenir mediante fisioterapia y se ha de examinar el tejido irradiado para detectar la formación de neoplasias secundarias.

- **Enfermedades sistémicas:**

Los efectos adversos sobre la cicatrización en pacientes con diabetes mellitus son múltiples. Presenta predisposición a la infección de las heridas, alteración de la microcirculación, neuropatía periférica que facilita los microtraumatismos de repetición, alteración de la función de los leucocitos y efectos perjudiciales directos sobre el proceso de cicatrización como disminución de la formación de tejido conectivo.

La vasculopatía periférica provoca un insuficiente aporte arterial y la consecuente deficiencia de la liberación de oxígeno y de metabolitos necesarios para la actividad celular. Algunas heridas de la isquemia arterial surgen espontáneamente, pero la mayoría obedecen a micro o macrotraumatismos.

La nicotina interfiere en la fase inflamatoria, disminuye el aporte sanguíneo por vasoconstricción y retrasa la epitelización.

El alcoholismo crónico retrasa la cicatrización no sólo por la malnutrición asociada, sino por producir un retraso de la migración celular y alteración de la síntesis proteica.

La pérdida aguda de sangre produce hipoxia de los tejidos y altera la formación de colágeno (Saulis y Mustoe, 2001).

Cicatrización patológica

- **Cicatrización defectuosa:**

Entre las cicatrices defectuosas tenemos las hundidas, separadas, irregulares, montadas y las adheridas a planos profundos. El tratamiento es la extirpación y sutura por planos (Berman y cols., 2008).

- **Cicatrización patológica:**

Incluyen las calcificadas; las que tras continuos intentos de cicatrización con solo epitelio degeneran en carcinoma epidermoide (úlceras de Marjolin); las hipertróficas y las queloideas (Butler y cols., 2008; Robles y cols., 2007).

Cicatrices hipertróficas y queloides: Las cicatrices hipertróficas son elevadas, eritematosas y pueden originar prurito o dolor. Pero a diferencia de los queloides están limitadas a la zona original del trauma. El queloide es también elevado, eritematoso y pruriginoso pero se extiende a la piel sana más allá de la zona del trauma.

Las cicatrices hipertróficas aparecen rápidamente después de la herida, aumentan su tamaño en los 3-6 primeros meses y luego comienzan su regresión. Los queloides suelen aparecer más tarde, meses o años tras la agresión. A pesar de una posible atrofia en la parte central, continúan su crecimiento, exceden el tamaño de la lesión inicial y nunca regresan.

Las cicatrices hipertróficas aparecen más frecuentemente en zonas en contra de las líneas de Langer y en superficies flexoras. La cicatrización hipertrófica es más frecuente en niños y personas jóvenes y en raza negra o asiática. Histológicamente tanto las cicatrices hipertróficas como los queloides presentan una importante vascularización, adelgazamiento de la epidermis y gran densidad de fibroblastos. La síntesis y la degradación de colágeno están aumentadas (Clark, 1996).

Tratamiento:

- Cirugía: La cirugía es la única manera de extirpar el volumen del queloide, aunque la exéresis debe ir seguida de otro tratamiento para evitar la recidiva. La escisión simple provocaría un rápido crecimiento del queloide y en mayor superficie que el anterior. Se puede realizar también a extirpación intralesional sin un mayor riesgo de recidiva. En la exéresis se ha de utilizar una técnica atraumática, siguiendo las líneas de Langer, realizando una buena hemostasia y con mínima cantidad de suturas. Se han de evitar las suturas subcutáneas y realizar una sutura intradérmica continua que se retira a las tres semanas. La extirpación más autoinjerto cutáneo delgado de grosor parcial se recomienda en lesiones muy voluminosas (Butler y cols., 2008; Robles y cols., 2007).
- Láser: Los resultados obtenidos con diferentes tipos de láser: de argón, dióxido de carbono o YAG han sido inconstantes. Se cree que la mayor ventaja de la escisión con láser es que traumatiza menos los tejidos y disminuye así la reacción inflamatoria y la consecuente fibrosis. Actualmente muchos cirujanos utilizan la inyección intralesional de triamcinolona tras la resección con láser de dióxido de carbono. Se deja que la herida cierre por segunda intención repitiendo mensualmente las inyecciones durante 6 meses (Bouzari y cols., 2007).
- Esteroides: Los esteroides pueden utilizarse solos o tras la escisión del queloide o cicatriz hipertrófica. El corticoide de elección para el tratamiento de queloides es la triamcinolona acetónide 40mg/ml que potencia la actividad de la colagenasa, reduciendo así el tamaño de la lesión, aplanándola y ablandándola. La inyección se realiza en la dermis superficial hasta que la lesión palidezca. Se ha de procurar no inyectar en la piel sana. La dosis máxima es de 120 mg en el adulto y 80 mg en el niño. Después se aplica un vendaje compresivo. Los síntomas de dolor y prurito desaparecen pronto. Para la disminución de la masa cicatricial se repiten las inyecciones entre

seis y ocho semanas. Las complicaciones son: atrofia del tejido circundante, aparición de telangiectasias y despigmentación de la piel.

- **Presión:** Se cree que la presión de la cicatriz produce hipoxia, reduce el flujo capilar, estabiliza los mastocitos y aumenta la actividad de la colagenasa. La presión mínima requerida es de 15-22 mmHg y ha de ser aplicada continuamente durante más de un año.
- **Radioterapia:** La radioterapia se ha usado sola o en combinación con otras técnicas. Por sí sola disminuye los síntomas locales, pero en combinación con la exéresis, controla el crecimiento del queloide. La radioterapia inhibe el desarrollo y regeneración vascular. Se ha recomendado para el control de la fibroplasia en las primeras fases activas y en conjunción con la cirugía para lesiones más antiguas.

Se deben aplicar dosis pequeñas. Para muchos autores el riesgo de malignización es mayor que el porcentaje de curación.

- **Gel de silicona:** Los beneficios del gel de silicona se creen debidos a las propiedades químicas del gel, el cual es relativamente impermeable. Así aumenta la hidratación y reduce la hiperemia capilar y la consecuente fibrosis. Hay varios estudios que atribuyen al gel de silicona una mejoría en la textura, el color y en la elevación de la cicatriz (Clark, 1996).

1.2.2 ÚLCERAS POR PRESIÓN

INTRODUCCIÓN

En la época actual, caracterizada por una rápida sucesión de los progresos médicos y por el empleo de cada vez más sofisticados medios técnicos, continúan presente en los hospitales las úlceras por presión.

Podemos definir las úlceras por presión (UPP) como toda pérdida tisular, producida por isquemia, y derivada de una presión ejercida y mantenida sobre una prominencia ósea.

Aunque se utilizan, de forma intercambiable, diversos términos para describir esta pérdida tisular, como úlcera por el lecho o úlcera por decúbito, el término más adecuado es el de úlcera por presión, ya que refleja el concepto actual sobre su etiología: una presión excesiva y mantenida sobre la piel por encima del límite tolerable de la misma.

La patología ulcerosa puede presentarse tanto como principal causa nosológica o como una complicación dentro del contexto de otra patología de base (Morris y cols., 1989). Así podemos decir que puede aparecer en:

- Enfermos geriátricos, con grave deterioro de su estado general y con escasa movilidad que les condena a permanecer durante mucho tiempo en la misma posición.
- Pacientes con trastornos del aparato locomotor, con enfermedades invalidantes crónicas o con trastornos agudos que precisan extensas férulas o tracciones.
- Enfermos comatosos ingresados en unidades de cuidados intensivos.
- Pacientes neurológicos con afectación motora, sensitiva o psíquica.
- Lesionados medulares, los cuales tienen unas características especiales que les diferencian de los enfermos neurológicos por su importancia y frecuencia de aparición de esta patología (Kim y cols., 2006).

Estos grupos de pacientes de riesgos tienen en común que carecen de los mecanismos fisiológicos de defensa, ya que presentan una hipoestesia-anestesia, acompañada o no de trastornos tróficos en la piel, como piel delgada y una pérdida de grasa subcutánea; además puede existir una falta de tono muscular o espasticidad, o presentar un éstasis venoso-linfático. Todas estas alteraciones contribuirán en mayor o menor medida a incrementar el efecto nocivo de la presión.

Cuando aparece una UPP en estos enfermos puede ser índice de que existe un agravamiento de su enfermedad primitiva y sobre todo se acompañará de una mala evolución y una curación más difícil, de ahí la importancia extrema que representa la prevención de la formación de las úlceras por presión en todos estos grupos de riesgos.

ETIOLOGIA-PATOGENIA

Para llegar a comprender el problema de la patogenia de una UPP hay que considerar que en su producción intervienen dos factores relacionados. Por una parte, existe un factor extrínseco, que únicamente es la presión que se realiza sobre un tejido concreto y que representa el motivo primordial y *sine qua non* para desarrollar la patología

ulcerosa. Por otra parte, podemos distinguir un factor intrínseco, individual, que es la respuesta biológica de cada organismo a la presión.

Factor extrínseco

Una presión ejercida y mantenida sobre una prominencia ósea es la causa principal para la aparición de una UPP. Esta presión sobre los tejidos actúa como un hecho físico puro en la interrupción de la circulación tisular, ocasionando una isquemia localizada que será el origen de la aparición de una necrosis tisular.

Aunque se han descrito en la literatura diferentes estudios valorando la presión sanguínea en los capilares y en distintos puntos del cuerpo (Landis, 1930; Greenway y Piazza, 1965; Groth, 1942; Kosiak, 1959), podemos decir que la aplicación sobre cualquier zona del cuerpo de una presión de 50-60 mm Hg/cm² produce una isquemia localizada. Dicha presión es difícil superar en el desarrollo de una actividad normal, sin embargo, si en los tegumentos blandos subyace un plano óseo, con suma facilidad se rebasará esta presión crítica ya que la presión se transmite desde la superficie hasta el hueso subyacente, con la compresión de todos los tejidos interpuestos, sufriendo en primer lugar las consecuencias de la presión aquellos tejidos situados próximos al hueso (Jones y cols., 2007). Esta presión mayor en las zonas próximas al hueso disminuye gradualmente hacia la periferia, por lo que la mayor necrosis de los tejidos se produce en las zonas más profundas, próximas al hueso y no en la superficie cutánea. Este hecho es importante tenerlo en cuenta ya que cuando se presentan alteraciones en la superficie cutánea es indicativo de la existencia de una mayor necrosis en profundidad.

Factor intrínseco

Son las respuestas biológicas en las diferentes patologías las que reducen el gradiente de presión necesario para interrumpir la vitalidad de los tejidos.

En los estados de shock se produce un estasis sanguíneo en las áreas espláncicas y una isquemia en la piel y en los músculos. La circulación hística superficial se ve muy reducida por la disminución del gasto cardiaco, por la reducción de la presión venosa periférica y por el descenso de la presión arterial.

En la arterioesclerosis, los cambios que se producen en la pared vascular tienen consecuencias también en la nutrición de los tejidos superficiales, ocasionando deficiencias en la irrigación de muchas zonas corporales (Jones y cols., 2007).

Determinadas situaciones como por ejemplo la fiebre, ocasionan una serie de alteraciones metabólicas, incrementando hasta el 50% el metabolismo normal de los tejidos y elevando así el requerimiento de nutrientes y oxígeno, por lo que los tejidos se hacen más vulnerables a la presión (Morris y cols., 1989).

Situaciones de déficits nutricionales como la hipoproteïnemia o la anemia, colocan al enfermo en una situación de indefensión frente al factor extrínseco principal que es la presión. En todas las situaciones en que se establecen pérdidas importantes en el medio interno, se produce un desbalance nitrogenado, con una disminución de las proteínas séricas, anemia y déficits vitamínicos, que conducen a una reducción de la masa corporal total, estimulándose el proceso destructivo que puede llevar a la instauración de un círculo vicioso.

La lesión de la médula espinal merece una especial atención dentro del capítulo de las UPP, ya que las alteraciones secundarias a la lesión medular que van a predisponer a

la aparición de ulceraciones, se mantienen a lo largo del tiempo, de ahí que la mayoría de estos pacientes presenten a lo largo de su vida alguna UPP, así como un alto riesgo de recidivas (Jones y cols., 2007). En esto se diferencian de los pacientes encamados por procesos agudos como por ejemplo los incluidos en las unidades de cuidados intensivos, en los cuales las causas coadyuvantes para la aparición de ulceraciones desaparecerán cuando finalice el encajamiento (Morris y cols., 1989).

Durante la fase de shock medular se produce una desaparición de los reflejos vasomotores, acompañándose de una reducción de la respuesta a los efectos isquemizantes de la presión, favoreciendo así la aparición de ulceraciones. A este factor se suma el estasis venoso ocasionado por la parálisis, que acentúa el efecto de la presión al aumentar su tiempo de actuación sobre una zona concreta.

La anestesia de una zona corporal hace que el individuo no tenga la posibilidad de conocer la progresiva actuación de la presión con la correspondiente alarma sensitiva, haciéndolo más vulnerable a la aparición de lesiones. En los individuos sanos la presión recibida en una determinada zona ocasiona una alarma sensitiva, recibida inconscientemente y que provoca, también de forma inconsciente, una serie de cambios continuos de postura y actitud.

A todos estos factores se suma un conjunto de alteraciones tróficas que incrementan la vulnerabilidad de los tejidos a la presión, que si se acompañan de fuerzas de cizallamiento o deslizamiento, contribuirán a la ulceración de la piel por aplicación directa de fuerzas mecánicas a la epidermis.

La espasticidad con la que cursan algunas de las enfermedades neurológicas puede determinar una situación postural que permita que la presión actúe con especial intensidad sobre las articulaciones deformadas (Jones y cols., 2007).

EVOLUCIÓN CLÍNICA

El aspecto clínico que presentan las úlceras por presión va variando a lo largo de su evolución. Así pues podemos diferenciar una fase aguda, al comienzo de su formación, en la que la UPP se presenta como una mancha parda o violácea, persistente, sobre una prominencia ósea. Este enrojecimiento persistente puede pasar por estadios de inflamación y comenzar a presentar el inicio de una necrosis tisular, que habitualmente es interpretada, de forma equivocada, como un absceso agudo, que en general suele ser incidido para drenar un pus inexistente, dejando expuesto una grasa necrótica de color amarillo-grisáceo, susceptible de una infección posterior. Cuando se presenta este “pseudoabsceso” debe ser interpretado como la fase inicial de una UPP y, por lo tanto, es importante adoptar una actitud conservadora, eliminando la presión y evitando el drenaje del mismo.

Si la presión no se alivia, la mancha violácea comenzará a oscurecerse hasta llegar a formar una placa negra, dura y adherida, que, a medida que vaya evolucionando, comenzará a presentar un halo de enrojecimiento periférico que indica el inicio de un proceso inflamatorio que permitirá eliminar este tejido necrótico, hasta conseguir que esta placa negra quede suelta y, por último, se desprenda.

La pérdida de sustancia resultante suele tener en su fondo una prominencia ósea o un tejido fascial visible. En los límites de la oquedad existen zonas desvitalizadas que son eliminadas progresivamente de forma espontánea y que dejan como resultante una

prolongación lateral de la pérdida de sustancia, que en la úlcera evolucionada se denomina **saco ulceroso**.

Cuando los procesos reparadores espontáneos llegan a su máxima expresión, aparece una zona granulada algo más pequeña que la primitiva placa de necrosis, una zona cicatricial que la rodea (determinada por el crecimiento del epitelio en los márgenes de piel no afectada), y en una zona de la ulceración, una entrada al saco ulceroso que igualmente estará cubierto por tejido de granulación (Morris y cols., 1989).

Los productos de la invasión bacteriana y de la destrucción de tejidos conforman una descarga purulenta y maloliente, destructiva para el nuevo epitelio. Esta descarga continua de material proteolizado se traduce clínicamente en un déficit de proteínas, anemia, fluctuación de la temperatura y malestar general.

En algunas ocasiones, el proceso supurativo puede recorrer gran distancia entre planos fasciales y establecer trayectos fistulosos, con la penetración en determinadas cavidades articulares por destrucción de la cápsula articular, dando origen a una artritis séptica, con destrucción de la articulación, que se traducirá clínicamente en fiebre alta acompañada de un cuadro clínico de sepsis.

CLASIFICACIÓN

Aunque se han descrito diferentes clasificaciones de las úlceras por presión, basadas fundamentalmente en la profundidad y el grado de destrucción de las estructuras profundas, en el Hospital Nacional de Paraplégicos se emplea una clasificación basada en la evolución clínica de la úlcera, que permite, por un lado, establecer una serie de criterios básicos del tipo de tratamiento a realizar en cada una de las fases (profilaxis, tratamiento conservador y tratamiento quirúrgico), y, por otro lado, desterrar la tendencia a considerar las úlceras por presión sólo en términos de su cronicidad, siendo sin embargo, un proceso evolutivo.

Podemos diferenciar 4 fases clínicas de las UPP, la fase de eritema, de escara, de detersión y de contracción, las cuales se describen a continuación.

1ª Fase de Eritema

Caracterizada por un enrojecimiento persistente sobre una prominencia ósea (figura 11). Este eritema indica que se ha llegado al límite de tolerancia de la piel a la presión, por eso, esta fase constituye el punto de alarma inicial para la formación de una ulceración, y representa la única fase reversible de la misma.

Durante esta fase, si se elimina la presión persistente, conseguiremos evitar la aparición de una necrosis tisular profunda que constituiría el punto de partida de una UPP. Por eso, durante esta fase, los esfuerzos terapéuticos deben ir encaminados a la prevención (Eldar, 2002).



Figura 11. Úlcera en fase de eritema

2ª Fase de Escara

Si continúa la presión, se producirá una necrosis tisular de la parte de tejido comprendida entre la piel y el hueso subyacente, que se traducirá en la aparición de una placa oscura, de aspecto seco, que se mantiene así durante varios días y que, progresivamente, va experimentando un reblandecimiento progresivo por los bordes, comenzando a macerarse para finalizar formando gruesos esfacelos húmedos que progresivamente se eliminan, ya sea de forma espontánea o por sucesivas escarectomías quirúrgicas.

Durante esta fase los exudados de superficie pueden ser negativos (16%), no demostrando contaminación o pueden aparecer gérmenes grampositivos.

En esta fase, el tratamiento a realizar será conservador, encaminado a la eliminación de la escara.

3ª Fase de Detersión

Durante la fase de detersión o de limpieza, la úlcera se presenta como una oquedad profunda, con la aparición de esfacelos necróticos y restos de fibrina en el fondo y con un tejido recubierto de un exudado purulento y maloliente como consecuencia de los productos de invasión bacteriana y la destrucción de tejidos desvitalizados (figura 12). En muchas ocasiones, el aspecto externo de la úlcera puede llevar a engaños, ya que se presenta con un orificio externo pequeño que deja en el interior una importante cavidad o saco ulceroso.

Microscópicamente se presenta un infiltrado celular de neutrófilos y linfocitos en los tejidos afectados con un incremento de la fagocitosis, que permitirán la limpieza microscópica de todos los tejidos desvitalizados.

En los exudados de superficie podemos apreciar la existencia de gérmenes gramnegativos, cuyo número de colonias aumentan durante toda la fase de detersión.

A partir de las células epiteliales vasculares de la zona, comenzará a producirse el crecimiento de un tejido de granulación que se presenta como una serie de mamelones rojos que tapizan toda la zona superficial de la ulceración.

En esta fase el tratamiento conservador irá encaminado a favorecer la limpieza local de la úlcera y la eliminación del tejido necrótico formado.



Figura 12. Fase de detersión

4ª Fase de Contracción

Una vez formado el tejido de granulación, comienza la reparación espontánea con la proliferación del epitelio marginal de la úlcera. Los bordes de la UPP presentan una progresiva contracción, reduciendo paulatinamente el tamaño de la lesión (figura 13).

Esta fase se caracteriza por la reaparición de gérmenes grampositivos y la reducción significativa del exudado purulento, que representan un signo del inicio de los fenómenos de reparación espontánea, condición necesaria para poder emprender los procedimientos quirúrgicos necesarios para el cierre de la úlcera, con las máximas garantías de éxito.



Figura 13. Fase de contracción.

PROFILAXIS

Educación sanitaria

Una correcta explicación a los pacientes y familiares sobre cómo se forman las UPP y la importancia extrema de evitar la presión sobre las zonas de riesgo constituye el pilar básico para la prevención y el tratamiento de las úlceras por presión (Calianno, 2007).

La elaboración de una serie de protocolos de profilaxis de las UPP dirigidos tanto al personal sanitario como a aquellas personas que, por diversos motivos se ven obligadas a permanecer acostadas o en una silla de ruedas durante un tiempo prolongado, ha reducido de forma significativa la incidencia de aparición de las UPP tanto en nuestro medio hospitalario como en nuestra área sanitaria.

Otro de los motivos claves para hacer hincapié en la prevención es la elevada incidencia de complicaciones de infección y sepsis secundarias a la falta de cuidados o al mal tratamiento de las UPP, necesitando ingresos hospitalarios prolongados y tratamientos quirúrgicos, que incrementarán de forma significativa el gasto sanitario (Morris y cols., 1989).

Medidas preventivas

Las UPP se producen en las zonas en las que una persona acostada o sentada apoya su piel sobre el colchón o asiento, sobre todo en aquellas zonas en las que existe un saliente óseo que incrementa más la presión al quedar comprimida la piel entre dos superficies duras (Grey y cols., 2006). Por lo tanto, podemos afirmar que la causa directa de la aparición de una ulceración es exclusivamente la presión mantenida durante un determinado periodo de tiempo, diferente según la tolerancia a la presión de cada individuo

Si la causa directa es la presión, la forma de evitar la aparición de las UPP se debe basar en no mantener apoyo continuo sobre la piel (Hagisawa y cols., 1999).

Las medidas a tomar para prevenir la aparición de las UPP serán las siguientes:

- Limpieza de la piel y aseo diario con jabones neutros, y aplicar cremas hidratantes en aquellas zonas de mayor sequedad cutánea
- El colchón debe ser cómodo y las sábanas limpias, con el fin de que la piel no esté en contacto con secreciones como sudor, orina, etc.
- Utilizar cojines especiales que repartan homogéneamente las presiones y que no sean demasiado duros. Existen en el mercado varios modelos de cojines “antiescaras”, que reparten uniformemente las presiones a condición de que se lleven relativamente desinflados. Un cojín duro incrementará la presión en la zona de apoyo pudiendo ser el origen de la aparición de enrojecimientos y ulceraciones. Todos los artefactos industriales existentes hasta la actualidad, ya sean cojines o camas, pueden resultar más o menos eficaces, pero, por sí solos, no llegan a eliminar la condición principal en la profilaxis, que es el cuidado constante y esmerado del enfermo para evitar su apoyo continuado (Hulsenboom, 2007).
- Cuando sea posible, se adoptará la posición de decúbito prono mientras permanezca en la cama, protegiendo las rodillas y el dedo gordo del pie. Esta posición es la que permite liberar de presiones la cintura pélvica, área anatómica con mayor incidencia de ulceraciones.

- En las personas que deban permanecer en silla de ruedas, es importante enseñarles a “sentarse bien”, con una posición correcta que evite el apoyo de la región sacrococcígea y evitar arrastrarse hasta el asiento.
- La realización de cambios posturales cada 2-3 horas debe ser estricta. Si coexiste alguna causa que favorezca la ulceración, como por ejemplo fiebre, se vigilará continuamente al enfermo hasta que quede establecido el tiempo mínimo preciso para que no aparezca sufrimiento tegumentario, ya que este tiempo límite es individual para cada enfermo.
- Protección con almohadas de las zonas peligrosas: talones y sacro en posición decúbito supino; caderas cuando estén acostados de lado; e isquión cuando estén sentados.
- Realizar pulsiones periódicas, elevándose con ayuda de los brazos, o cuando los brazos no estén útiles, tendrán que separar el cuerpo del cojín inclinándolo hacia un lado y otro (Calianno, 2007).
- Vigilar el estado de la piel después de estar un tiempo en la misma posición, constituye una de las medidas más importantes dentro de la profilaxis. Para ello se realizará una inspección regular de las zonas de apoyo con un espejo, vigilando que no aparezca un enrojecimiento persistente que nos indicaría que hemos llegado al límite de tolerancia de la piel a la presión (Grey y cols., 2006).
- Una dieta correcta incluyendo un buen aporte proteico, así como de vitaminas y minerales será un apoyo importante para favorecer la cicatrización de los tejidos dañados.

TRATAMIENTO CONSERVADOR

Cuando en la superficie cutánea comienza a formarse una escara seca y negra, la destrucción tisular en las áreas próximas al hueso se ha instaurado. A partir de este momento, la ulceración seguirá evolucionando y pasará por las diferentes fases clínicas evolutivas, precisando el inicio de un tratamiento conservador lo más precoz posible.

Dentro del tratamiento conservador podemos distinguir diferentes aspectos tanto locales como generales, encaminados a asegurar una herida quirúrgicamente limpia o, en úlceras de pequeño tamaño, a conseguir el cierre espontáneo de las mismas (Hagisawa y cols., 1999).

Cuando la úlcera no es demasiado grande, el tejido de granulación formado comienza a rellenar el fondo del defecto, acompañado de un crecimiento epidérmico desde los bordes de la herida hasta conseguir el cierre por segunda intención. Sin embargo, cuando la úlcera es de gran tamaño, o está localizada en una zona sometida a importantes presiones o traumas mínimos, este recubrimiento cicatricial que se forma no proporciona una cubierta epitelial de calidad suficiente, por lo que en estos casos la indicación de tratamiento quirúrgico constituye la primera elección.

Medidas locales

Van encaminadas a conseguir una escrupulosa higiene diaria manteniendo limpia y seca la herida. Durante la fase de escara y de detersión se deben ir eliminando todos los esfacelos necróticos que se van formando, ya sean piel, grasa, músculo o aquellos fragmentos libres de hueso necrótico que se acumulan en el fondo de la herida (Kim y

cols., 2006). Este desbridamiento quirúrgico debe realizarse diariamente mediante pinzas y bisturí estériles, cumpliendo todas las medidas de asepsia necesarias, y salvo desbridamientos muy amplios, puede realizarse en la propia cama del paciente. Aunque existen en el mercado diferentes agentes desbridantes enzimáticos, ninguno de ellos se ha mostrado más efectivo que el desbridamiento quirúrgico, pudiendo además causar complicaciones infecciosas añadidas si no se retira completamente la crema con cada cura (Rocha, 2006).

Acompañando a este desbridamiento de esfacelos necróticos, se realizará un lavado de la herida a presión, por arrastre, y cumpliendo todas las medidas de asepsia necesarias (Thomas y cols., 2007).

Medidas generales

Junto a todas estas medidas locales, el tratamiento conservador incluye una serie de medidas generales que van a favorecer la cicatrización de la herida y la preparación del paciente para un posterior tratamiento quirúrgico, en los casos en los que sea necesario.

Como primera medida básica cabe destacar la necesidad de evitar la presión, manteniendo reposo y realizando cambios posturales periódicos, con el fin de evitar que se amplíen las áreas de isquemia tisular, y por tanto de necrosis. Por mucha cura local o tratamiento quirúrgico que se realice, si no eliminamos la presión, nunca se conseguirá el cierre satisfactorio de una UPP (Hagisawa y cols., 1999).

Se deben realizar cultivos seriados del material drenado por la úlcera, con la identificación de los microorganismos y su sensibilidad a diferentes antibióticos. Estos cultivos permitirán conocer cómo va cambiando la flora contaminante de la herida, valorando así el momento más propicio para realizar el tratamiento quirúrgico cuando sea necesario. La administración local de pomadas o cremas antibióticas se ha mostrado ineficaz en la mayoría de los estudios, sobre todo en las úlceras crónicas, ya que el importante tejido cicatricial formado acompañado de vasos trombosados, impide el acceso del agente terapéutico a la herida.

Como medidas coadyuvantes cabe destacar el asegurar un correcto aporte proteico y corregir la anemia cuando sea necesario, con el fin de favorecer el proceso de cicatrización.

TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE LAS ÚLCERAS POR PRESIÓN

Cuidados preoperatorios

La intervención quirúrgica debe ir precedida de una serie de actuaciones, tanto generales como locales, destinadas a eliminar las causas que provocaron la úlcera por presión (UPP) y acudir a quirófano en las mejores condiciones posibles. Estas medidas implican una actuación multidisciplinaria en la que estarán implicados distintas especialidades médicas, así como, el personal de enfermería y quién se ocupe del cuidado domiciliario del paciente (Rocha, 2006). Es importante optimizar todo este entramado previamente a la cirugía.

- **Optimización nutricional:** La malnutrición es un factor asociado en muchas ocasiones a UPP (Calianno, 2007). Se ha demostrado que para mantener un potencial normal de curación los niveles de albúmina en suero deben mantenerse por encima de 2gr/dl. Se deben corregir los déficit nutricionales mediante una alimentación hipercalórica e hiperproteica, en ausencia de otros factores de estrés, se administrarán de 25 a 35 cal/kg de calorías no proteicas, y de 1.5 a 3 gr/kg de proteínas. También es importante la aportación de determinadas vitaminas (A, C) y oligoelementos (zinc, hierro y calcio) que intervienen en el proceso de la curación. Si el paciente es incapaz de mantener, por si solo, una ingesta adecuada se deben tomar medidas suplementarias como la alimentación por sonda gástrica, ya sea continua o sólo por la noche (Rocha, 2006).

En otras ocasiones nos encontramos con pacientes obesos que dificultan la curación por una mayor presión y mayor fragilidad vascular, en estos casos se debe perseguir una disminución de peso.

- **Antibióticoterapia y profilaxis infecciosa:** La presencia de procesos infecciosos concomitantes a la UPP es frecuente (Thomas y cols., 2007). Las fuentes más frecuentes son la urinaria, suelen ser paciente con sondas vesicales lo que favorece esta infección, y la pulmonar, en las pacientes con lesión medular son frecuentes las neumonías que se asocian a una disminución de la función diafragmática y el cúmulo de secreciones, estaría indicado instaurar programas de fisioterapia respiratoria y tratamiento con broncodilatadores. A partir de estas fuentes sépticas son frecuentes los episodios de bacteriemia y la sobreinfección de los tejidos isquémicos que rodean la UPP, con lo que se amplía la lesión. Antes de la cirugía debemos buscar y, en caso necesario, tratar estos procesos. Todas las UPP están, sistemáticamente, contaminadas por bacterias. La flora hallada es mixta encontrándonos gérmenes aerobios, sobre todo procedentes de la piel, hallamos estafilococos en el 71% de los cultivos positivos, pero también del tracto digestivo y urinario, Enterococos 60%, E. coli 29%, Pseudomonas 20%. La presencia de estafilococos es significativamente mayor en úlceras que evolucionan a la curación, mientras que las pseudomonas o enterococos abundan en las úlceras perniciosas. También se hallan gérmenes anaerobios en la mitad de las UPP cuando la muestra se toma para gérmenes anaerobios y del fondo de la úlcera.
- **Profilaxis antitrombótica:** Los pacientes con lesión medular tienen un alto riesgo de trombosis venosa profunda y tromboembolismo pulmonar, este riesgo se eleva cuando son sometidos a una intervención quirúrgica. Debemos asegurarnos de tomar las medidas necesarias para disminuir ese riesgo, como pueden ser el

vendaje compresivo de las extremidades inferiores, el uso de heparina de bajo peso molecular, etc.

- **Descarga de la presión:** Evitar las fuerzas de rozamiento y la presión sobre la UPP es fundamental para la curación y también para el óptimo resultado postquirúrgico. Se ha demostrado que el alivio de la presión durante 5 minutos cada 2 horas elimina los efectos negativos de la presión. En la actualidad existen además una serie de dispositivos de almohadillado, camas de agua o de aire etc. que disminuyen la presión que debe soportar un punto concreto aumentando la superficie de contacto. Es fundamental prever preoperatoriamente las posiciones de descompresión disponibles y los cambios posturales a efectuar, el paciente deberá acostumbrarse, preoperatoriamente, a estas posiciones, aumentando progresivamente el tiempo de permanencia en las mismas.
- **Tratamiento de la espasticidad:** La espasticidad se debe a la pérdida de las vías de inhibición supraespinal sobre el arco reflejo miotático, cuanto más alto sea el nivel de la lesión mayor frecuencia tendrá la espasticidad. Si no se trata la espasticidad antes de la corrección quirúrgica de la UPP, la recurrencia es segura. El tratamiento de elección es médico, se suele usar la asociación de diazepam (10 mg/8 horas) con baclofeno, que comenzará con 10 mg/6 horas e iremos incrementándolo hasta los 25 mg/ 6 horas. También es posible el manejo quirúrgico mediante bloqueos nerviosos periféricos, estimuladores epidurales y rizotomías, que nunca se realizará en los primeros 18 meses después de la lesión medular, por la posibilidad de mejoría clínica.
- **Búsqueda de otros factores de riesgo:** Se deben investigar otros factores de riesgo que hayan podido favorecer la aparición de la UPP o bien limitar el resultado de la cirugía. La diabetes se relaciona frecuentemente con la UPP, se debe mejorar el control de las glucemias previo a la intervención (Kim y cols., 2006). Se buscará la presencia de anemia, debe mantenerse la hemoglobina por encima de 10 mg/dl mediante ferroterapia y en caso necesario transfusiones, etc.
- **Tratamientos innovadores:** el uso de colágeno polivinilpirrolidona se ha visto que disminuye el diámetro de la úlcera respecto al placebo (Zeron y cols., 2007).

Técnicas quirúrgicas:

- **Indicación de cirugía:** En primer lugar debe decidirse la conveniencia o no del tratamiento quirúrgico. Existen una serie de casos donde no existe duda de la necesidad de cirugía, sin embargo, en la mayoría de las situaciones la indicación será relativa.
 - Indicaciones absolutas:
 - Hemorragia arterial importante. Puede aparecer en UPP profundas que afecten a grandes vasos. Es poco frecuente ya que estos vasos suelen encontrarse trombosados.
 - Sepsis sin otro foco evidente. Se instaurará una terapia antibiótica sistémica empírica y se procederá al desbridamiento de la úlcera, dejando la cobertura para un segundo tiempo.
 - Osteomielitis con secuestros óseos. El tratamiento quirúrgico es el único capaz de obtener la curación en estos casos.

- Comunicación de la UPP con la articulación de la cadera. Produce una artritis séptica que con frecuencia evoluciona a sepsis. En esta situación es necesario el desbridamiento de los tejidos necróticos, la extirpación de la cabeza del fémur y la instauración de un sistema de lavado continuo. Posteriormente la cavidad debe rellenarse utilizando colgajos musculares grandes como el de vasto lateral.
- Fístulas uretrales o rectales. Son raras y aparecen sobre todo tras isquiectomías demasiado agresivas. En su tratamiento se debe contar con la colaboración de urólogos y cirujanos generales.
- Malignización de las úlceras. La transformación maligna en las úlceras crónicas tiene una latencia media de 20 años. El tipo más frecuente es el carcinoma de células escamosas y su pronóstico es malo. Requiere la extirpación de la UPP dejando amplios márgenes libres de lesión.
- Indicaciones relativas.
 - Cuando la UPP no afecta al hueso esta suele curar con el alivio de la presión y medidas conservadoras, sin embargo, el periodo de tiempo necesario es muy largo oscilando entre 6 y 12 meses. El tratamiento quirúrgico en estas circunstancias pretende reducir el tiempo necesario para alcanzar la curación.
 - Lesionados medulares y politraumatizados, suelen presentar buen estado general y una esperanza de vida grande por lo que la cirugía está especialmente indicada.
 - Úlceras consecuencia de deformidades esqueléticas, ya que seguirán recidivando hasta que se solucione la causa desencadenante.
 - UPP en los ancianos. Su indicación es muy problemática ya que los mismos factores que condicionan su aparición son responsables del mal resultado quirúrgico. La cirugía se indicará solo en pacientes seleccionados que permitan la descompresión de la zona quirúrgica.
 - Dolor crónico secundario a la UPP.
 - Úlceras recurrentes.
 - Fracaso del tratamiento conservador.

Principios básicos: El tratamiento quirúrgico de las UPP sigue tres pasos básicos. En primer lugar debe procederse a la extirpación, de forma económica pero total, de la bolsa fibrosa de la UPP, para conseguir esto, sigue siendo de utilidad la técnica del “pseudotumor de Guttman” en la que la bolsa fibrosa se determina claramente empaquetándola con compresas o gasas impregnadas en colorante, azul de metileno. Los bordes de la herida se cortan a 2 cm del margen de la úlcera y, tras despegarlos, se suturan uno contra el otro cerrando la cavidad (Rocha, 2006). Entonces se realiza la extirpación “en bloque” de la lesión con un margen mínimo de tejido sano de 2 cm, como si se tratara de un tumor, en caso de ver el colorante durante la extirpación

sabemos que estamos muy cerca de la úlcera y debemos aumentar el margen. La pieza de extirpación se debe enviar al laboratorio de anatomía patológica para descartar la degeneración maligna de la úlcera. También se puede mandar a cultivar para adoptar la antibiocioterapia postquirúrgica adecuada. En segundo lugar, en caso de osteítis o exposición ósea, se procederá a la escisión de las prominencias afectadas, cada vez más conservadora, especialmente en el caso del isquion por los cambios en los puntos de presión que pueden originar úlceras perineales y fístulas uretrales. Por último debemos buscar el modo de conseguir la mejor cobertura cutánea teniendo en cuenta, no solo, la cirugía actual, sino también, la posibilidad de nuevas intervenciones, dado el alto índice de recidivas de estos pacientes.

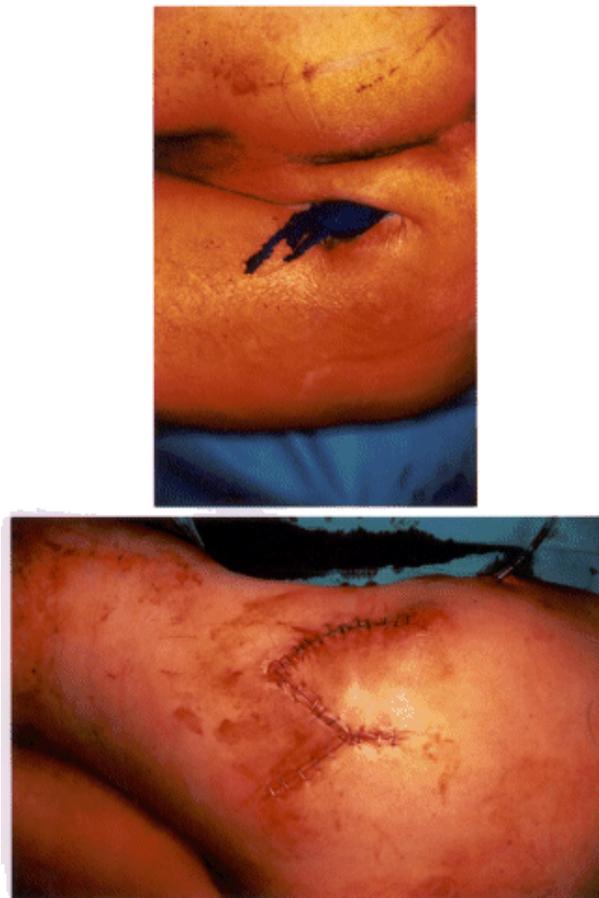


Figura 14. Tratamiento quirúrgico de una UPP. Arriba se muestra la técnica del pseudotumor de Guttman. Abajo cobertura cutánea mediante colgajo romboidal

Entre las posibilidades de cobertura cutánea podemos citar:

- El cierre directo, sólo puede usarse en pequeñas úlceras superficiales. Los resultados son malos ya que crea tensión en los bordes y además las cicatrices se sitúan en las zonas de apoyo. Por ello las dehiscencias son frecuentes.
- Los injertos cutáneos (Bilkay y cols., 2006), pueden usarse en úlceras superficiales pero proporcionan una cobertura inestable, siendo un procedimiento con baja tasa de éxito, aproximadamente un 30%. Sus indicaciones se limitarían a pacientes ambulatorios y como cobertura temporal en pacientes con mal estado general, que contraindique otras intervenciones, hasta conseguir la estabilización del paciente.
- Los colgajos cutáneos, pueden usarse dependiendo de la localización, tamaño, profundidad y cirugías previas, sin embargo no consiguen rellenar los espacios muertos subcutáneos por lo que la tasa de recidivas es alta y sólo se usan ante la imposibilidad de emplear técnicas más efectivas y reparaciones secundarias.
- Los colgajos fasciocutáneos, proporcionan una cobertura duradera, menor índice de recidivas, y producen mínimas secuelas funcionales, pero sólo logran rellenar parcialmente las úlceras de mayor tamaño.
- Los colgajos musculares y musculocutáneos (Bilkay y cols., 2006), proporcionan una cobertura excelente con un relleno adecuado de la cavidad y actividad demostrada en el tratamiento de heridas infectadas, pero dejan mayores secuelas funcionales, en pacientes ambulatorios, y pueden ser atróficos en ancianos y lesionados medulares.
- Los colgajos libres también se han utilizado cuando se carece de medios de reconstrucción local, sin embargo sus indicaciones actuales son muy limitadas.

1.2.3. QUEMADURAS

La piel, barrera protectora del organismo, es muy expuesta a agresiones como las quemaduras. La gravedad de las lesiones varía dependiendo del agente causal y el tiempo de exposición, la localización y la calidad de los tejidos afectados, así como de la rapidez y la eficacia del tratamiento realizado.

CLASIFICACIÓN

Clasificación histológica

Ésta es la principal de las clasificaciones utilizadas para las quemaduras. Se basa en la histología y fisiología de la piel y sus capas; especialmente, en su capacidad de regenerarse de forma espontánea y de actuar como barrera cutánea (Church y cols., 2006). Así, según la capa alcanzada por la lesión, las quemaduras se clasifican en (Morgan, 2000):

- Primer grado (epidérmica): cuya extensión se limita a la epidermis. El lugar de la quemadura duele, no presenta ampollas y está enrojecido y seco. Un ejemplo sería una quemadura solar leve. No es frecuente que se produzca daño permanente de los tejidos; la lesión suele consistir en el aumento o disminución de la coloración de la piel.

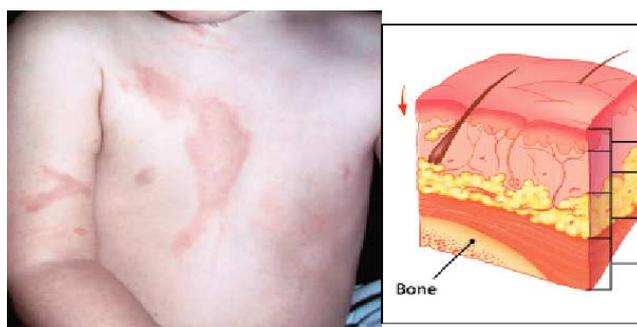


Figura 15. Quemadura de primer grado

- Segundo grado (dérmica): Las quemaduras de segundo grado afectan la epidermis y la dermis. El lugar de la quemadura está enrojecido y ampollado y puede estar tumefacto y doler. Se pueden dividir en quemadura de segundo grado superficial y profundo.
 - Segundo grado superficial: afecta a epidermis y dermis papilar



Figura 16. Quemadura de segundo grado superficial

- Segundo grado profundo: que afecta a epidermis y dermis reticular

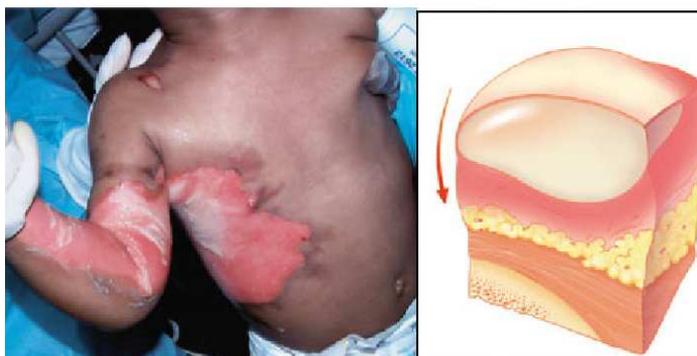


Figura 17. Quemadura de segundo grado profunda

- Tercer grado (subdérmica): Las quemaduras de tercer grado destruyen la epidermis, la dermis y la hipodermis. Este tipo de quemaduras también pueden dañar los huesos, los músculos y los tendones. El lugar de la quemadura presenta un color blanco o carbonizado. No hay sensibilidad en la zona, puesto que las terminaciones nerviosas están destruidas.

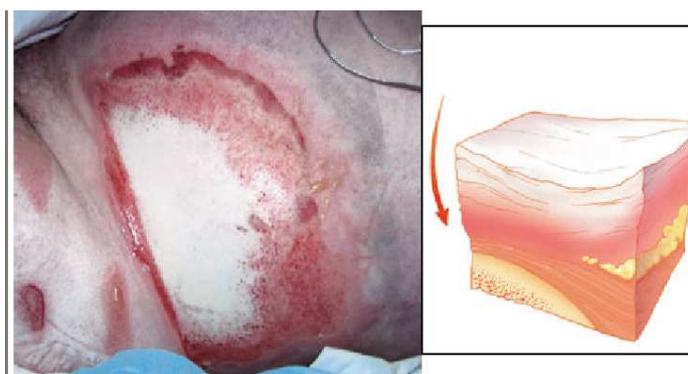


Figura 18. Quemadura de tercer grado

Clásicamente se habla también de quemaduras de cuarto grado para referirse a aquéllas que afectan al tejido subcutáneo, músculo, fascia, periostio o hueso.

La evaluación de la profundidad de las quemaduras es, con frecuencia, difícil en un primer momento. En la tabla 2 se resumen las características de los distintos tipos de quemaduras:

	Quemaduras de primer grado	Quemaduras de segundo grado Dérmica superficial	Quemadura de segundo grado Dérmica profunda	Quemaduras de tercer grado
Causa	–Sol –Fogonazo menor	–Líquidos calientes –Fogonazos o llamas –Exposición breve a sustancias químicas diluidas	–Líquidos calientes –Fogonazos o llamas –Exposición prolongada a sustancias químicas diluidas	–Llama –Escaldadura por inmersión –Electricidad de alto voltaje –Exposición a sustancias químicas concentradas –Objetos calientes
Color	Rosado	Rosado o rojo brillante	Rojo oscuro o blanco amarillento moteado	–Blanco perlado o carbonizado –Transparente o como parche
Superficie	Seca o pequeñas vesículas	–Tamaño variable; ampollas grandes –Exudado abundante	–Ampollas menores, a veces rotas –Ligeramente húmeda	–Seca con epidermis no viable adherente –Vasos trombosados
Sensación	Dolorosa	Dolorosa	–Disminución de la sensación al pinchazo – Sensación de presión profunda intacta	–Anestesia – Sensación de presión profunda
Textura	Suave, con edema mínimo y posterior exfoliación superficial	Engrosada por edema, pero flexible	Edema moderado con menor elasticidad	No elástica y correosa
Cicatrización	2-3 días	5-21 días	>3 semanas	Ninguna; requiere injertos

Tabla 2. Características de las quemaduras según su grado de profundidad

Es importante destacar que la valoración de las quemaduras en niños pequeños, especialmente en los menores de cuatro años, difiere de forma notable respecto a la de los adultos. Así, las lesiones de apariencia superficial son en los niños más profundas. Al ingreso, las quemaduras de tercer grado tienen en ellos color rojo intenso (por lo que podrían parecer de segundo grado) y casi nunca se aprecian las típicas lesiones blancas o en pergamino.

Clasificación etiológica

- Escaldadura
- Llama
- Sólido caliente
- Eléctrica (por paso de corriente, a diferencia de la producida por flash eléctrico, que es por llama)
- Química

Esta clasificación tiene también su importancia, dado que algunos grupos (como las quemaduras químicas y las eléctricas) se comportan de manera específica y merecen una vigilancia especial.

FISIOPATOLOGÍA DE LA QUEMADURA

La lesión por quemadura rompe la homeostasis del organismo más que ningún otro tipo de traumatismo, afectando prácticamente a todos los órganos de la economía. Por ello, para su correcto tratamiento deben comprenderse bien los mecanismos que se desencadenan y de esa forma poder actuar en consecuencia.

Alteraciones hemodinámicas

Una quemadura cutánea se manifiesta, desde el punto de vista anatómico-patológico, como una necrosis de coagulación, con trombosis microvascular en las áreas más profundas del daño. El tejido vecino suele presentar, además, zonas de estasis e hiperemia (Church y cols., 2006). Estas áreas de necrosis incompleta reciben el riego de una microcirculación dañada y puede evitarse en ellas la progresión del daño por medio de una reanimación adecuada (figura 19).

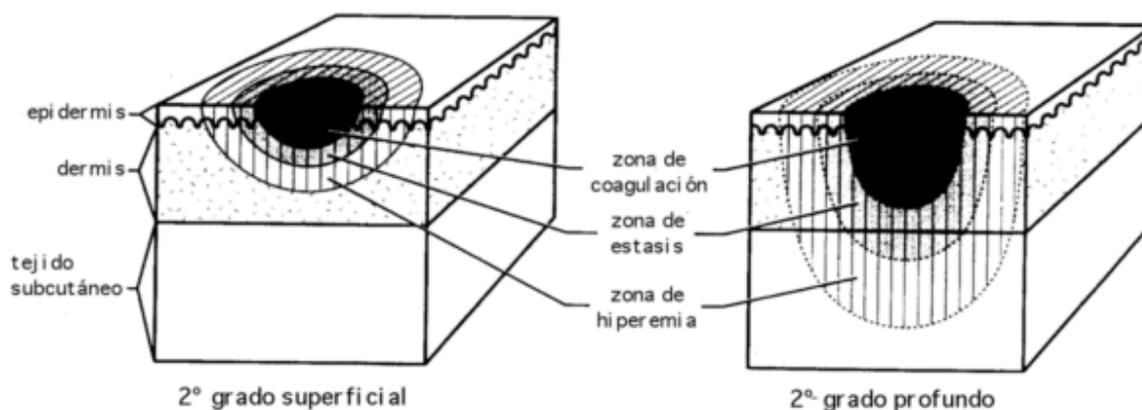


Figura 19. Quemaduras de 2º grado superficial y profundo y su división en zona de coagulación, de estasis y de hiperemia.

La necrosis por quemadura da lugar a una pérdida de la integridad capilar, produciéndose la extravasación de líquido desde el compartimento intravascular hacia el intersticio, con la consiguiente formación de edema. Pero el paso masivo de líquido del compartimento intravascular al intersticial se debe también a otros factores:

- **Alteración de la integridad de la microcirculación.** Además del daño físico directo por efecto del calor, la microcirculación se ve afectada por el efecto de diversos mediadores de la inflamación (prostaglandinas, tromboxano, kininas, serotonina, catecolaminas, histamina, leucotrienos, IL-8, EGF, bFGF, PDGF-AB) (Lu y cols., 2002) que se activan o generan en el tejido lesionado. Estos mediadores contribuyen a determinar la gravedad y evolución de la lesión local, así como los efectos que produce a distancia. En la figura 20 se resume la acción de los principales mediadores que actúan en la quemadura (Church y cols., 2006). Se han ensayado tratamientos con antagonistas de algunos de estos mediadores (como el ibuprofeno, anti-H1, anti-H2...), obteniéndose respuestas parcialmente correctoras del edema postquemadura. Con todo, los beneficios no están lo suficientemente demostrados.

Por lo general, la formación de edema en una quemadura pequeña alcanza su máximo nivel entre las 8 y 12 horas posteriores a la lesión. En cambio, en el caso de quemaduras grandes éste ocurre más tarde, entre las 18 y 24 horas, porque la hipovolemia sistémica retrasa la extravasación de líquido.

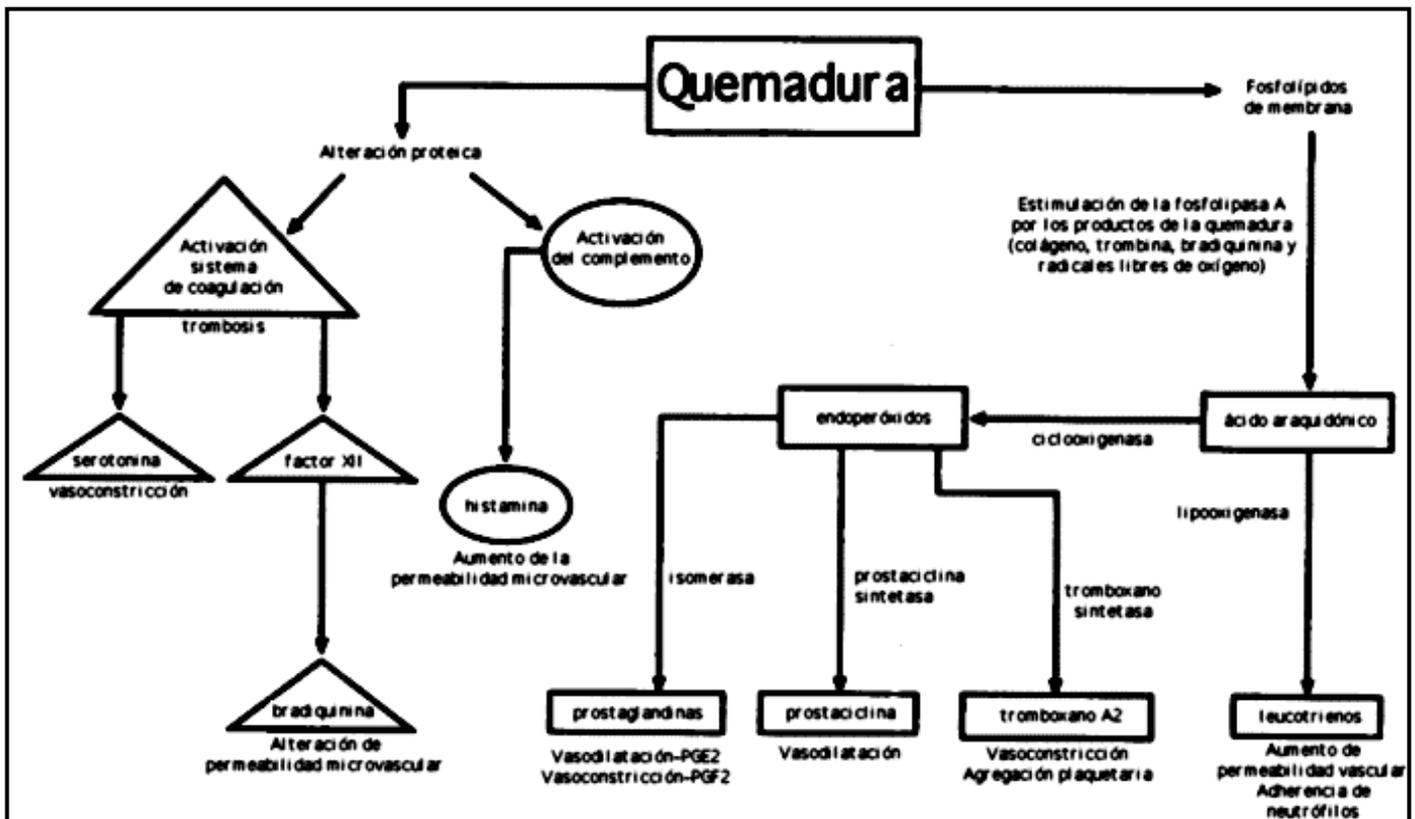


Figura 20. Esquema de los principales mediadores que actúan en la quemadura

Esta pérdida de la integridad microvascular conduce no sólo a la extravasación de líquido desde el plasma hacia el intersticio, sino también de proteínas. De este modo, la composición del líquido acumulado en el intersticio se asemeja estrechamente a la del plasma en su contenido de proteínas y electrolitos. Las pérdidas proteicas son proporcionales al tamaño de la lesión. Además, también se pierde líquido -sin proteínas- hacia tejidos sanos lejanos a la lesión, aunque a un ritmo más lento y en menor volumen. Este hecho se debe a la hipoproteinemia secundaria -que rompe el equilibrio de presión osmótica a ambos lados de la membrana capilar, según la ley de Starling-. Este efecto es, a su vez, responsable de la formación de edema pulmonar, aunque no suele tener repercusión clínica en ausencia de inhalación y con una reanimación adecuada. En general, la formación de edema en los tejidos, ya sean sanos o quemados, se acentúa considerablemente con la reanimación con líquidos, si bien, como veremos más adelante, varía según la solución utilizada.

- **Alteración de la membrana celular.** La presencia de factores circulantes, como los ácidos grasos libres liberados después de la lesión, y la disminución de la ATPasa de la membrana -debida a la pérdida de volumen intravascular y consecuente isquemia tisular- provocan una alteración en el potencial de membrana de la célula y la hinchazón de la célula debida a la entrada de sodio y de agua desde el espacio extracelular. Este fenómeno es especialmente evidente en el músculo y dura de 24 a 36 horas.
- **Aumento de presión osmótica en el tejido quemado.** El aumento de presión osmótica en el tejido quemado parece deberse a una gran extravasación de sodio desde el compartimento plasmático, que genera hiponatremia. De ahí la importancia del aporte de grandes concentraciones de sodio en la reanimación.

Estas tres alteraciones provocan una inestabilidad hemodinámica -por reducción notable y precoz del volumen plasmático y un aumento en la resistencia vascular periférica- y un gasto cardíaco disminuido -al parecer más por la hipovolemia que a causa de un factor depresor del miocardio generado tal vez por la quemadura. Este factor sí parece ser el responsable de la persistencia de un gasto cardíaco reducido tras la normalización de la tensión arterial (T.A.) y la diuresis.

Aunque la T.A. se mantiene prácticamente dentro de los niveles normales al inicio de la lesión, la contracción continua del volumen intravascular, muy rápida y masiva en quemados con más del 20-25% de superficie corporal quemada -SCQ-, origina hipotensión, disminución del gasto cardíaco, disminución del riego periférico y acidosis metabólica a medida que se establece el shock por quemadura.

Pasadas las primeras 24 horas se normaliza la permeabilidad al paso de proteínas, por lo que los coloides administrados en este periodo permanecerán normalmente en la circulación.

Alteraciones metabólicas

Tras la quemadura, el organismo responde con una serie de alteraciones hormonales que comienzan con un aumento de las catecolaminas e incluyen el descenso de la insulina y el aumento del glucagón, la ACTH, el cortisol, la hormona del crecimiento y los mediadores de la inflamación. Las consecuencias metabólicas de todo ello se resumen en:

- aumento importante del gasto metabólico,
- aumento en los requerimientos nutricionales. Se produce la movilización de las reservas de glucosa y aumenta la neoglucogénesis a partir de las proteínas y las grasas.

Con el objetivo de disminuir el hipermetabolismo y ayudar a preservar la integridad de la mucosa intestinal, reduciendo de este modo la incidencia de infecciones, se ha recomendado el inicio precoz de la nutrición enteral en el paciente quemado. Ello favorece igualmente una protección frente a las úlceras de estrés.

La glucosa es el principal nutriente de los tejidos quemados y de las células encargadas de la cicatrización. Pese a incrementarse súbitamente sus niveles plasmáticos tras la lesión, el aumento de la resistencia a la insulina hace que su aporte vaya preferentemente a los tejidos periféricos.

Alteraciones inmunológicas

A pesar de todos los esfuerzos empleados en la lucha contra la infección, ésta sigue siendo la primera causa de muerte pasados los primeros días post-quemadura (Church y cols., 2006).

Las causas se resumen en (Mann, 1996):

- alteración de las barreras mecánicas, tanto la piel, como las mucosas (respiratoria e intestinal);
- pérdida de proteínas, incluyendo aquellas necesarias para la función inmunológica, tanto por alteración de la barrera endotelial, como por déficit de síntesis;
- alteración de los sistemas de defensa humoral y celular.

TRATAMIENTO MÉDICO DEL QUEMADO

Criterios de tratamiento ambulatorio

Los pacientes quemados pueden ser tratados hospitalariamente, en servicios de Cirugía Plástica o Unidades de Quemados, o de forma ambulatoria. Los resultados en el tratamiento de los pacientes externos son generalmente buenos, siempre que hayan sido correctamente seleccionados para ello. Los factores a considerar en la decisión de tratar a un paciente ambulatoriamente, lógicamente acompañados de una buena dosis de sentido común, son los siguientes: 1) edad del paciente; 2) extensión de la quemadura; 3) profundidad de la misma; 4) enfermedades previas; 5) lesiones asociadas; 6) situación social (Mann, 1996).

- **Edad:** Los pacientes menores de 5 años y los mayores de 60 tienen un riesgo aumentado de morbilidad y mortalidad tras sufrir una quemadura. En los niños muy pequeños hay que considerar la posibilidad de malos tratos, lo cual requeriría ingresarlos para su protección.
- **Extensión:** A mayor extensión de quemadura, peor pronóstico (Church y cols., 2006). El cálculo aproximado del tanto por ciento de extensión corporal de una quemadura se hace de acuerdo a la “regla de los nueves” (con una variación para el caso de los menores). Para realizar un cálculo más exacto, se utilizan las gráficas de Lund-Browder (Morgan 2000, Adam 2007) (figura 21).

Deberán ser ingresados todos aquellos pacientes que requieran fluidos intravenosos, lo cual comprende a aquellos adultos con SCQ > 20% y a los niños con SCQ > 10%, así como a aquellos que, por la causa que fuere, estuvieran previamente deshidratados.

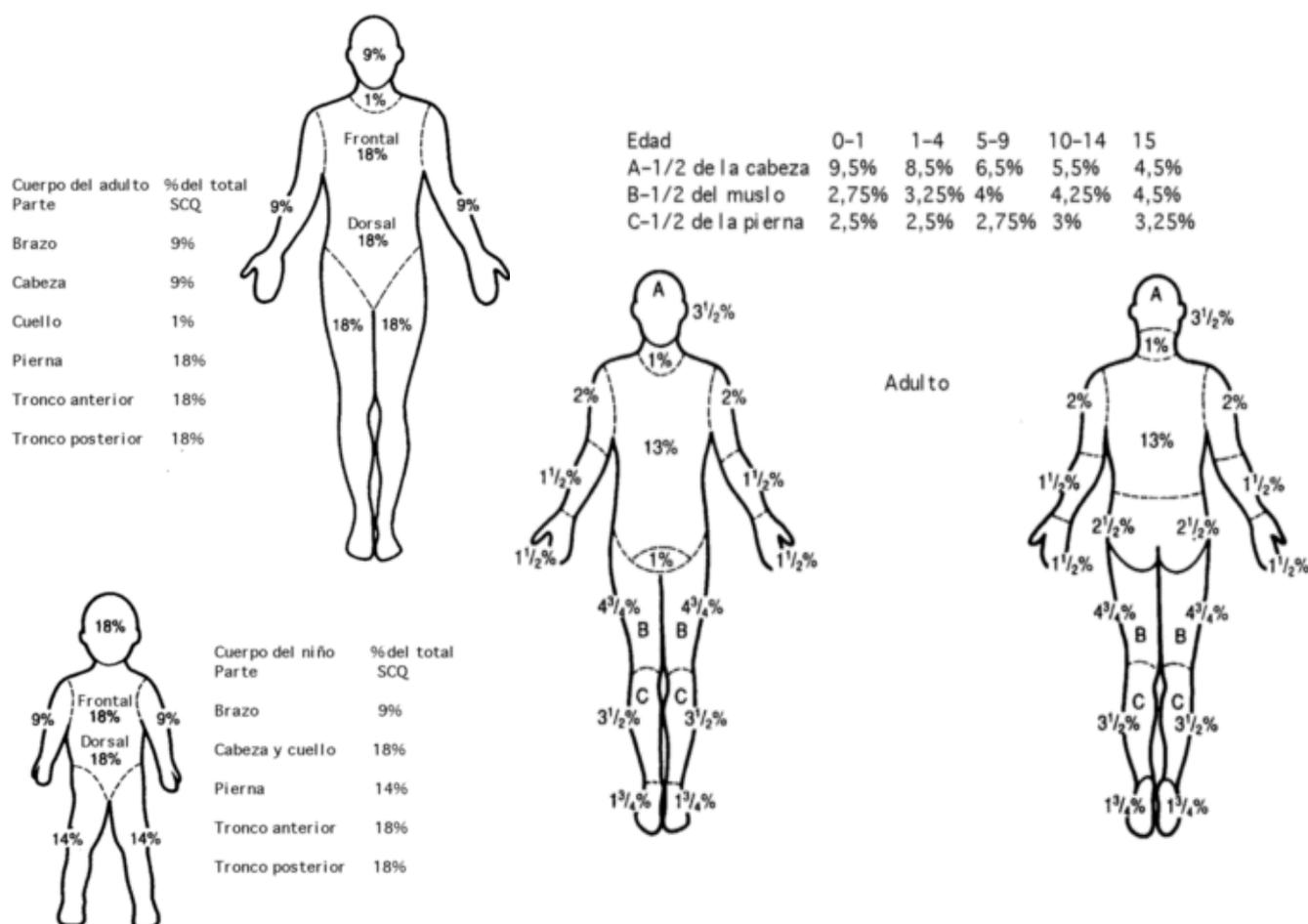


Figura 21. Cálculo de la extensión en una quemadura. A la izquierda según la regla de los nueve y a la derecha según las gráficas de Lund-Browder.

- Profundidad:** La profundidad de la quemadura tiene menor importancia a la hora de determinar la necesidad de cuidado hospitalario. Una excepción son aquellas quemaduras cuya profundidad haga prever de entrada que requerirán intervención quirúrgica (sin olvidar que esta necesidad no es fácil de valorar en primera instancia). Existen casos en que, a pesar de la necesidad de tratamiento quirúrgico, los pacientes pueden ser seguidos ambulatoriamente e ingresar directamente para la intervención.
- Enfermedades previas:** La existencia de enfermedades previas ensombrecen la evolución de la quemadura: insuficiencia renal, insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión arterial, EPOC, diabetes mellitus, secuelas de alcoholismo, uso de esteroides, obesidad mórbida, etc.
- Lesiones asociadas y etiología:** Especialmente en las quemaduras eléctricas (por caída desde cierta altura) o en aquellas sufridas en accidentes de tráfico, el paciente pueden haber sufrido alguna lesión grave asociada que agrave el pronóstico de la quemadura. Las quemaduras químicas y las eléctricas pueden tener consecuencias graves como, por ejemplo, alteraciones del ritmo cardíaco en las eléctricas o hipocalcemia severa en las producidas por ácido fluorhídrico.

- **Localización de la quemadura:** Hay zonas del cuerpo (manos, pies, cara, periné y articulaciones) que por su localización y función dificultarán la independencia del paciente. En otros casos, la distribución de las quemaduras hace que requieran actuaciones especiales, como las quemaduras circunferenciales, que pueden precisar escarotomía. Estas situaciones exigirán el ingreso en un hospital.
- **Situación social:** Los pacientes externos deben presentar unas condiciones sociales que permitan el cuidado e higiene correctos de la lesión, así como disponibilidad para acudir al hospital a fin de realizar las curas locales y revisiones necesarias (Smith, 1996).

Tratamiento del quemado no extenso

Los objetivos son: 1) control del dolor; 2) limpieza y desbridamiento de la quemadura; 3) uso de agentes tópicos; 4) cobertura de la lesión; 5) elevación del área quemada; 6) profilaxis antimicrobiana; 7) controlar el prurito; 8) rehabilitación (en caso de ser precisa).

- **Control del dolor.**

El dolor es muy intenso inicialmente y se modera de forma espontánea pasadas unas horas. La manipulación de la quemadura durante las curas locales lo intensifica.

La mayoría de los pacientes ambulatorios requiere analgésicos, siendo suficiente su administración por vía oral. En caso de necesitar analgesia intravenosa, hay que proceder al ingreso hospitalario. Si la intensidad del dolor es leve, suele ser suficiente el empleo de AINEs, AAS o analgésicos menores. Si es moderada, habrá que recurrir a la dihidrocodeína oral de absorción lenta. Para procedimientos más dolorosos, como las curas, hay que administrar bolos de MST oral (0.25 – 0.5 mgr/Kgr) 60 minutos antes de la cura o morfina subcutánea o intramuscular (0.1 – 0.3 mgr/Kgr) 15-30 minutos antes. Muchos pacientes requieren analgesia-sedación extra para dormir.

- **Limpieza y desbridamiento de la quemadura.**

Si la quemadura es química, deberá irrigarse (no sumergirse) inmediatamente con abundante agua a chorro durante un periodo prolongado de tiempo, desde 20 minutos hasta 1 hora (a excepción de la quemadura por cal viva, que no se debe lavar). Existen antagonizantes específicos para algunas sustancias químicas productoras de quemaduras: ácido fluorhídrico/gluconato cálcico; fenol/agua y alcohol; fósforo blanco (que, en contacto con el oxígeno, prende)/SO₄Cu al 4% (que forma una película que evita su oxidación).

El tratamiento de las ampollas es todavía controvertido. Algunos defienden que deben dejarse intactas, alegando la protección que ello supone para la zona quemada y la consiguiente disminución del dolor. Pero se ha demostrado que el fluido acumulado en la ampolla contiene mediadores de la inflamación, que, si no se eliminan, continuarán actuando localmente, con potenciales efectos adversos, como estimular a los fibroblastos favoreciendo la contracción de la cicatriz. Por ello, se aconseja dejar intactas las ampollas pequeñas y el desbridamiento de las grandes (Adam, 2007). La reabsorción espontánea del fluido ocurriría pasada una semana.

- **Agentes tópicos.**

- Hay tres agentes **antimicrobianos tópicos** de eficacia contrastada (sulfadiacina argéntica, nitrato de plata y acetato de mafenida), aunque cada uno de ellos tenga sus propias ventajas y desventajas. El más utilizado es la sulfadiacina argéntica, (Selvaggi y cols., 2007) si bien debe evitarse su uso en el caso de pacientes alérgicos a las sulfamidas o cuando se haya desarrollado resistencia bacteriana a su acción (un problema creciente en los hospitales). El de segunda elección, en dichos casos, es el acetato de mafenida. Además de los tres agentes nombrados, existen otras posibilidades de tratamiento tópico antimicrobiano, como los siguientes:

- **clorhexidina**: Todas las quemaduras deben limpiarse cuidadosamente, usando agua y un jabón antiséptico. De entre todos ellos el que más eficacia ha demostrado es la clorhexidina, que actúa contra la flora comensal de la piel (Morgan 2000).

- **povidona yodada**: a pesar de presentar una excelente eficacia desinfectante al ser aplicada sobre piel sana, en la piel quemada han aparecido problemas secundarios a su absorción sistémica (toxicidad renal, tiroidea, sobre los fibroblastos...);

- **Nitrato de cerio asociado a sulfadiacina argéntica**: presenta una actividad antimicrobiana clínica similar a la sulfadiacina (superior in vitro) pero con menos complicaciones secundarias (alteraciones electrolíticas, metahemoglobinemia...) (Morgan 2000). Otra sustancia empleada Aguacel Ag, también aporta beneficio sobre estas heridas por quemadura liberando plata durante 2 semanas (Caruso 2003). Otros apósitos impregnados con plata sería el Acticoat® (Holder 2003).

- **Antibióticos tópicos** (gentamicina, polimixina, mupirocina, nitrofurantoína...): su uso se limita a los casos de infección por gérmenes concretos. En cualquier caso, y cualquiera que sea el agente utilizado, debe aplicarse con prontitud, antes de que ocurra una invasión bacteriana de la quemadura.

- **Anticuerpos monoclonales contra la molécula de adhesión intercelular-1**: en estudios se ha visto que mejora el porcentaje de curación de heridas por quemadura (Adam, 2007).

- **Cobertura de la quemadura.**

El vendaje (con vendas o malla) debe realizarse en condiciones adecuadas de esterilidad. Deberá ser tal que cumpla los siguientes propósitos: absorber el fluido drenado por la lesión, proteger y aislar la quemadura del exterior y disminuir el dolor de la zona. La periodicidad del cambio de vendaje en un paciente ambulatorio depende de que se usen o no agentes tópicos (considerando su vida media), de la cantidad de drenaje, etc. En todo caso, nunca deberá superar las 48 horas, ya que en los pacientes externos es muy importante descartar visualmente los posibles signos de infección cada 24-48 horas.

- **Elevación del área quemada.**

Éste es uno de los procedimientos más efectivos para reducir el edema y, secundariamente, la infección de las zonas quemadas. Se recomienda realizar ejercicios con las áreas lesionadas y, cuando estén en reposo, mantenerlas

ligeramente sobre la altura del corazón. También mantener presión sobre la quemadura minimiza la cicatriz hipertrofica (Morgan 2000)

- **Profilaxis antimicrobiana.**

Todos los pacientes quemados deben recibir profilaxis antitetánica. Si no han sido vacunados en los últimos 5 años, se les debe administrar toxoide y gammaglobulina antitetánica (Karyonte 1988).

El uso de antibióticos sistémicos en pacientes ambulatorios no es necesario si no existen signos evidentes de infección. Por esta razón es muy importante la vigilancia periódica por si aparecen dichos signos: fiebre, malestar general y cambios atípicos en el aspecto o evolución de la quemadura. El uso de antibióticos profilácticos puede desencadenar la aparición de resistencias bacterianas, a pesar de lo cual, sobre todo en determinadas circunstancias desfavorables, algunos autores lo aconsejan.

- **Control del prurito.**

El prurito es una manifestación que genera gran molestia y puede interferir con todo lo anterior. Su intensidad es muy aguda inmediatamente después de la epitelización de las quemaduras. El mecanismo que lo produce no está del todo aclarado, aunque parece segura su relación con la liberación de histamina por las células cebadas. Por este motivo, los fármacos más utilizados para combatirlo son los antihistamínicos.

TRATAMIENTO LOCAL DE LAS QUEMADURAS

Objetivo del tratamiento local

Una quemadura altera las funciones normales de la piel, siendo suficiente con que el estrato córneo se altere, para que pierda su capacidad de barrera.

El tratamiento de cualquier quemadura tiene como objetivo la epitelización definitiva precoz de la misma. Idealmente, este tratamiento local (quirúrgico y no quirúrgico) debe: disminuir la pérdida de calor, electrolitos, agua, etc.; actuar como barrera frente a microorganismos impidiendo la contaminación bacteriana exógena; evitar o minimizar las secuelas funcionales y estéticas, etc. Conseguir estos objetivos tiene especial relevancia en caso de quemaduras masivas, incluso aunque estas sean dérmicas superficiales.

Manejo local inicial de la quemadura

- **Traslado a la Unidad de Quemados:** El lugar del accidente no es el escenario adecuado para realizar la primera cura de la quemadura. La actuación local inicial depende de las características de la lesión. En general, en pacientes con quemaduras masivas las únicas maniobras deberán estar encaminadas a evitar la hipotermia, cubriendo al sujeto con materiales limpios y secos. En caso de quemaduras poco extensas, se procederá a cubrir las lesiones con apósitos húmedos.
- **Primera cura:** En caso de grandes quemados, o pacientes que vayan a requerir hospitalización, la primera cura se realizará en el centro hospitalario al que se traslade el enfermo desde el lugar del accidente, y siempre que su traslado definitivo

a una unidad de grandes quemados vaya a demorarse. Si el traslado es inmediato la primera cura se realizará al ingreso en estas unidades.

Si la quemadura no requiere ingreso, la cura se realizará en el centro hospitalario al que acuda el paciente.

Esta primera cura consiste en el lavado de arrastre con agua tibia (en quemaduras superficiales de extensión inferior al 10% SCQ puede utilizarse fría), lavando posteriormente las superficies afectadas con un antiséptico jabonoso suave. Posteriormente se aclaran las superficies con suero fisiológico o agua estéril, se desbridan las flictenas y restos epiteliales y se completa la cura, que podrá ser oclusiva o expositiva dependiendo del tipo de lesión. El enfriamiento de la piel se ha visto en estudios que mejora el pronóstico como con la colocación de apósitos con suero o DRDC (hidrogel-poliuretano) (Martineau y cols., 2005, Jandera, 2000, Raine 1981)

Curas sucesivas

- Lavado y desbridamiento: La práctica de cada cura debe realizarse en condiciones de esterilidad. Igual que en la primera, hay que empezar con el lavado de la lesión para eliminar restos de crema, detritus y tejido no viable. A continuación puede realizarse un cepillado de la herida con suero fisiológico y solución jabonosa (clorhexidina o preparados de yodo), aclarándose posteriormente las superficies (Morgan, 2000).
- Oclusión/Exposición: Las quemaduras superficiales e intermedias pueden ser ocluidas con un tul graso y un almohadillado generoso para evitar la desecación de las superficies lesionadas (Papini, 2004). Constituyen una excepción las quemaduras en cara y periné, donde se realizan curas en exposición (Figuras 22 y 23).



Figura 22. Quemadura intermedia facial **Figura 23. Varias semanas con curas por exposición**

En caso de quemaduras superficiales no es necesaria la utilización de antisépticos tópicos, que incluso, podrían considerarse contraproducentes, ya que prácticamente todos estos productos retrasan la epitelización de estas lesiones térmicas. Sin embargo, en caso de quemaduras dérmicas superficiales muy extensas o en caso de afectación de áreas como cara, periné, etc., que van a ser curadas en exposición, es práctica habitual el empleo de antisépticos. La justificación de esta práctica está, en tratar de evitar infecciones que causarían un mayor retraso en la epitelización que la utilización de los antisépticos, con las consecuencias que este hecho acarrearía.

Asimismo, en las quemaduras superficiales e intermedias está indicado la cobertura con apósitos biosintéticos que resultan especialmente útiles en casos de quemaduras extensas de esta profundidad (Singer, 2007).

En quemaduras profundas, sin embargo, la aplicación de quimioterápicos tópicos es necesaria para controlar la infección local. Estos agentes pueden utilizarse extendiéndolos sobre tul graso o sobre compresas en las curas oclusivas, o bien aplicarse directamente sobre la piel quemada en las expositivas. El tratamiento expositivo en ambiente caliente y aséptico facilita la desecación de la lesión, formándose una escara que puede facilitar el desbridamiento, pero que puede en algunos casos profundizar la quemadura.

- **Prevención de secuelas:** Desde el inicio del tratamiento de un paciente quemado se deben realizar maniobras destinadas a reducir las secuelas funcionales y estéticas que presentarán en muchas ocasiones estos pacientes. El tratamiento postural con vendajes y férulas, y la colaboración con un servicio de rehabilitadores, resulta fundamental para reducir contracturas articulares en posición inadecuada, reducir cicatrices retráctiles, sinequias, etc (Schwarz, 2007). Por otro lado, un adecuado tratamiento quirúrgico minimizará la cicatrización por segunda intención y la posibilidad de cicatrización patológica causante de alteraciones. Por último, contamos con tratamientos coadyuvantes utilizados cuando se ha producido la epitelización de las quemaduras (presoterapia, láminas de silicona, etc.).
- En estudios se ha demostrado la eficacia de la introducción de un gen adenoviral en células epiteliales en quemados ha mejorado la cicatrización de las heridas por quemadura y podría utilizarse en los cultivos de queratinocitos que después se injertarían (Hirsch, 2006). Estudios previos confirmaban diferencias en el trofismo del adenovirus por las células (Gilbert y cols., 2000, Chen, 2003).

COBERTURA EN GRANDES QUEMADOS. SUSTITUTOS CUTÁNEOS

La cirugía en el paciente quemado, indicada como tratamiento de las quemaduras profundas, tiene como objetivos la eliminación del tejido dañado irreversiblemente y la realización de una cobertura definitiva de las heridas. Este tratamiento debe ser completado precozmente para minimizar el riesgo de infección, sepsis y muerte del paciente, además de reducir tratamientos dolorosos y largos en el tiempo, disminuir secuelas, etc.

Consideraciones generales preoperatorias

- Situación clínica del paciente:

En la actualidad se defiende la precocidad y la agresividad en el tratamiento quirúrgico del gran quemado. El desbridamiento quirúrgico de la quemadura debe iniciarse cuando el paciente esté estable hemodinámicamente, situación que suele alcanzarse entre el segundo y quinto día postquemadura (Horch y cols., 2005).

- Estrategia operatoria:

En quemaduras masivas no es posible realizar una escisión completa de toda el área cruenta, entre otros factores, por la excesiva pérdida hemática que se produciría: se necesitan aproximadamente 2 o 3 concentrados de hematíes por cada 10% de superficie corporal a escindir. Actualmente las superficies que se desbridan tienden a ser mayor que en el pasado, alcanzándose 25-35% de superficie corporal total, e incluso más cuando se trata de extremidades en las que se puede utilizar isquemia para reducir el sangrado. En tórax, abdomen y espalda, no se debe superar el 15% para evitar pérdidas de sangre excesivas (Demling y cols., 1999).

En quemaduras profundas masivas (>60%), la priorización de las áreas a intervenir es una cuestión objeto de debate. Algunos autores preconizan tratar primero áreas funcionales, dando prioridad a las manos y articulaciones, sobre todo del miembro superior. A continuación cara y cuello (por su importancia estética) siempre que la profundidad de la lesión esté confirmada. Las extremidades inferiores serían las siguientes, posteriormente el tórax y abdomen, y por último espalda, palmas y plantas. Otros autores sostienen que la prioridad es la escisión de los mayores porcentajes de quemadura posibles, comenzando incluso por tórax y abdomen. En este punto hay que hacer la consideración de que en quemaduras quirúrgicas muy extensas que afectan, entre otros, a miembros superiores e inferiores, estas áreas se pueden desbridar con isquemia, lo que favorece que en estas condiciones las superficies desbridadas en la primera intervención puedan acercarse al 35%. En cualquier caso, cada paciente requiere una evaluación y priorización de las áreas a operar de forma individualizada.

En cuanto a la cobertura cutánea, ésta se realizará en el mismo tiempo quirúrgico que la escisión para obtener el cierre de la herida de forma inmediata. Comentar por último que la escisión quirúrgica de las quemaduras y la cobertura de las zonas cruentas se plantea en un gran quemado de forma seriada, si su estado general lo permite, con intervalos de 2-4 días. Con este planteamiento se puede conseguir la eliminación completa de las lesiones térmicas profundas durante la primera o las dos primeras semanas postquemadura.

Tipos de escisión

- **Escisión tangencial o secuencial:**

Esta técnica consiste en extirpar de modo secuencial con un dermatomo, láminas de tejido quemado, hasta llegar a tejido subyacente sano, apto para ser injertado (Papini, 2004). El problema principal de este método es la hemorragia en sábana que se produce, especialmente si el plano viable es dérmico. En estas condiciones la mejor hemostasia es la que se obtiene por presión y vendaje compresivo, coagulación con electrocauterio o ligadura de los vasos mayores y aplicación de la cobertura (autoinjerto, homoinjerto, etc). En este punto comentar que, el colágeno expuesto del plano dérmico viable resultante de la escisión de quemaduras, estimula la coagulación, siendo un agente hemostático muy eficaz.

- **Escisión intermedia:**

La escisión del tejido se practica mediante la exéresis de todo el espesor de la piel preservando el tejido celular subcutáneo. Esta técnica está indicada especialmente en áreas donde sea importante conservar el contorno corporal, como por ejemplo, la mama femenina. En la actualidad el tejido celular subcutáneo viable no es considerado un mal lecho receptor de injertos, si bien su vascularización es peor que la de la dermis o la fascia.

Los diferentes tipos de cobertura de las heridas por quemadura se explicará en capítulos posteriores.

1.3 TRATAMIENTO DE LA PATOLOGÍA DE LA PIEL

Aquí trataremos de desarrollar las distintas formas de solventar en el servicio de cirugía plástica las diferentes patologías de la piel, refiriéndonos a los injertos y colgajos cutáneos.

1.3.1. INJERTOS CUTÁNEOS

Un injerto cutáneo consiste en epidermis y parte de dermis que se transfiere a una zona receptora, tras separarla de su aporte sanguíneo. Siendo una opción para la cobertura de pérdidas cutáneas que no permiten un cierre primario (Robert Hierner y cols., 2005).

Clasificación

Se dividen según su espesor en:

- **Injertos de espesor parcial (Ollier-Thiersch)**

Formados por epidermis más dermis de forma parcial. A su vez pueden subdividirse en finos, intermedios y gruesos, dependiendo del grosor dérmico. Normalmente su espesor varía entre 0.30 a 0.45 mm. Cuanto más delgado es el injerto, mayor será la posibilidad de que sobreviva en el lecho receptor, ya que el tejido que debe recibir nutrición es de bajo espesor; sin embargo éste tendrá una mayor fragilidad ante el traumatismo. El lecho donante de un injerto fino reepiteliza más rápidamente que uno grueso en el que no quedan elementos cutáneos accesorios (Place y cols., 1996).

- **Injertos de espesor total (Wolfe)**

Formados por epidermis más dermis de forma total. Este tipo de injerto después de su trasplante, adquiere una textura, coloración más parecida a la de la piel que lo rodea, por lo que son más usados para defectos en la cara, que generalmente son pequeños y permiten un cierre directo de la zona donante (Johnson y cols., 1992; Ratner y cols., 1998; Leibovitchs, 2005; Seung-Kyu y cols., 2005)

Supervivencia del injerto cutáneo

Depende de varios factores:

- **Vascularización**

Un injerto necesita para sobrevivir un lecho receptor bien vascularizado. Por tanto, si tenemos como lecho receptor elementos avasculares como hueso sin periostio, cartílago sin pericondrio o tendón sin paratendón, el injerto colocado en contacto con ellos no podrá nutrirse. También tejidos irradiados o bien tejido de granulación de larga evolución de características fibróticas son malos receptores de injertos.

Se han descrito 3 fases sobre la nutrición de un injerto (Clemmensen, 1964):

- Circulación plasmática: A partir del contacto del lecho con el injerto, este empieza a tomar el líquido plasmático que se absorbe por acción capilar del lecho receptor.

- Inoculación de vasos sanguíneos: Durante las primeras 48 horas se forman conductos vasculares en la red de fibrina que une el injerto con su lecho.
- Formación de nuevos capilares: A la vez que se establece flujo entre los vasos antiguos, hay neoformación de capilares entre el lecho y el injerto, junto con una red paralela de linfáticos (Place y cols., 1996).
- **Contacto lecho receptor – injerto**

Este contacto es necesario para una buena vascularización. En las primeras horas ya aparece una red de fibrina que mantiene unidas ambas superficies. Hay varios factores que influyen en este contacto:

 - Tanto una excesiva como deficiente (arrugas) tensión entre injerto y lecho receptor provoca una disminución del contacto.
 - El cúmulo de líquidos (sangre, suero y pus) separan al injerto del lecho receptor.
 - La movilidad entre ambas superficies daña capilares que crecen entre ellos.
- **Tejido de granulación del lecho receptor**

En la evolución de las heridas se forma un tejido de granulación que si es de larga evolución, se convierte en fibrótico y con mala vascularización; por lo que debe ser extirpado antes de ser injertado.

Indicaciones

Los injertos de piel pueden utilizarse para cualquier defecto con mala vascularización, que dificulte la granulación del tejido (Clemmensen, 1964). A veces los injertos pueden aplicarse de forma temporal para proteger una zona que posteriormente precisará una cobertura más estable.

- Heridas en la cara: se emplean injertos de espesor total para defectos de tamaño intermedio, debido a que son más estéticos y se puede hacer cierre directo de la zona donante (Leibovitch, 2005)
- Zonas de flexión: superficies que necesitan cuidados especiales (inmovilización) para prevenir la aparición de contracturas.
- Tratamiento de quemaduras: Los injertos de piel parcial son los preferidos para reemplazar la piel quemada de manera superficial; incluso si estos son finos se podría recoger una “nueva cosecha” de la zona donante en 2-3 semanas (Dantzer y cols., 2003). Y la utilización de apósitos con plata pura incrementa la tasa de epitelización en estos injertos de espesor parcial (Robert y cols., 2001)
- Cobertura de zona donante: cuando no reepiteliza por sí sola.
- Reemplazamiento de mucosas: Los injertos de espesor parcial son los más utilizados para cubrir defectos de mucosas como la faringe, nariz y vagina, sin embargo hay tendencia a la retracción de estos por lo que es necesario la utilización de moldes. Aunque para reemplazar defectos de conjuntiva es mejor el injerto de mucosa bucal recogido con el dermatomo de Castroviejo, evitando así irritación corneal.

- Cierre de duramadre expuesta, pericardio y pleura: Sólo los injertos de piel parcial sobreviven en estas zonas.

Zonas donantes

El color, la textura, vascularización, grosor y naturaleza de la piel varían de una zona a otra (figura 24); por tanto cuanto más cercana esté la zona donante de la receptora más se parecerán. Las zonas situadas por encima de la línea claviclar tienen más similitudes a la cara (McCarthy, 1990).

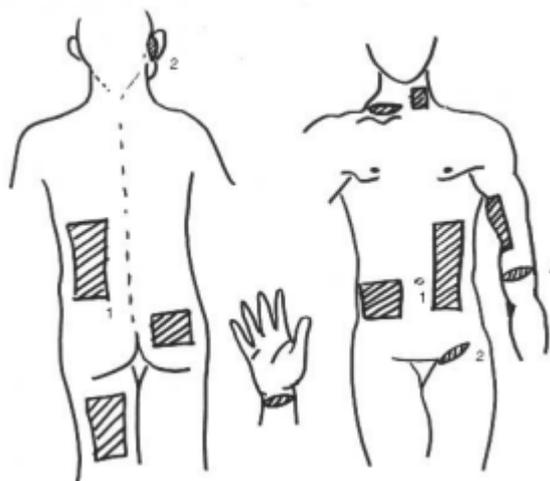


Figura 24. Zonas donantes más frecuentes de obtención de injertos cutáneos. (1) injertos de piel parcial y (2) injertos de piel total

Zonas donantes para injertos cutáneos se dividen en: (1) injertos de piel parcial (Place y cols., 1996) y (2) injertos de piel total (Delmonico y cols., 1981).

- Región **retroauricular**: excelente para suministrar injertos para la cara, pudiéndose obtener tamaños de 2 cm de diámetro con cierre directo.
- Región **supraclavicular**: casi tan buena como la retroauricular para injertos de piel total, aunque también pueden tomarse de espesor parcial.
- **Párpado superior**: puede utilizarse para pequeños defectos, ya que sólo se puede obtener una elipse pequeña para evitar deformidades.
- Zona anterior de la **muñeca**: Excelente para la toma de injertos de espesor total para cubrir pequeños defectos de los dedos, permitiendo un cierre directo de la zona donante .
- **Pared abdominal, región glútea y extremidades**: son las zonas más usuales para la toma de injertos de piel parcial. Suelen adquirir un color amarillento /pardo, pigmentándose por los rayos UV. Siempre que sea posible la zona donante la elegiremos de zonas que se puedan ocultar por la ropa.
- **Prepucio y labios mayores**: la pigmentación de esta piel la hacen la idónea para reconstrucción de areola y pezón (Rudolph y Ballantyne, 1990).

Preparación de los injertos

- **Toma de injertos de piel parcial**

Hay básicamente 3 tipos de instrumentos de forma general:

- Cuchilla de Humby: posee un calibrador por el que podemos regular el grosor del injerto. Escalpelo Blair o Ferris-Smith- grandes hojas sin calibrador. En ambos se facilita la toma tensando la piel y lubricándola con vaselina. El movimiento de la cuchilla debe ser con movimientos suaves y largos sin prestar excesiva atención al movimiento hacia delante (Place y cols., 1996).
- Dermatomo tipo tambor: D. de Padgett-Hood: es el prototipo de estos dermatomos cuya ventaja es la obtención de injertos de grosor uniforme. Consta de una hoja rotatoria que se mueve adelante y otras hacia la superficie del tambor para cortar el injerto de grosor deseado. La zona donante se prepara aplicando un cemento para que la piel se una al rodillo. Tiene como ventaja el poder cortar injertos con una forma exacta. Otros dermatomos de este tipo son el dermatomo de Reesse (más elaborado) y dermatomo Schuchardt (que se adhiere a la piel sin sustancia adhesiva).
- Dermatomos eléctricos: accionados con motor, obteniéndose con ellos tiras extensas del tronco y las extremidades. dermatomo de Brown: Posee una hoja intercambiable que se mueve de adelante y atrás como una máquina cortadora, pudiendo fijar un grosor determinado. Dermatomo de Stryker (similar al de Brown), dermatomo de Castroviejo (obtiene injertos mucosos) y dermatomo de Padgett (motor en el mango).

- **Toma de injertos de piel total**

Los injertos de piel total se obtienen cortando la piel en profundidad hasta la dermis con forma elíptica con bisturí. Cuando la piel de la zona donante es irregular es útil inyectar solución salina para identificar el plano de corte. Una vez cortado se desengrasa con tijeras curvas, y se cierra de forma directa la zona donante (Rudolph y Ballantyne, 1990).

- **Aplicación**

El injerto se puede aplicar de dos formas distintas:

- Laminar → resultado estético más aceptable aunque presenta mayor número de hematomas.
- Mallada → cubren mayor extensión. Peor apariencia estética, aunque con menor número de hematomas. Mayor dificultad para que prenda y no actúa como barrera hasta que no se produce la epitelización de la malla (figura 25).

Cuando el área de pérdida es muy extensa y la zona donante escasa se recurre al patrón en sándwich, en el que se aplican injertos ampliamente mallados sobre los cuales se colocan homoinjertos de cadáver. El objetivo de esta última cobertura es proteger los autoinjertos y actuar como barrera hasta que prenden y epitelizan las mallas (Metcalf y Ferguson. 2007).

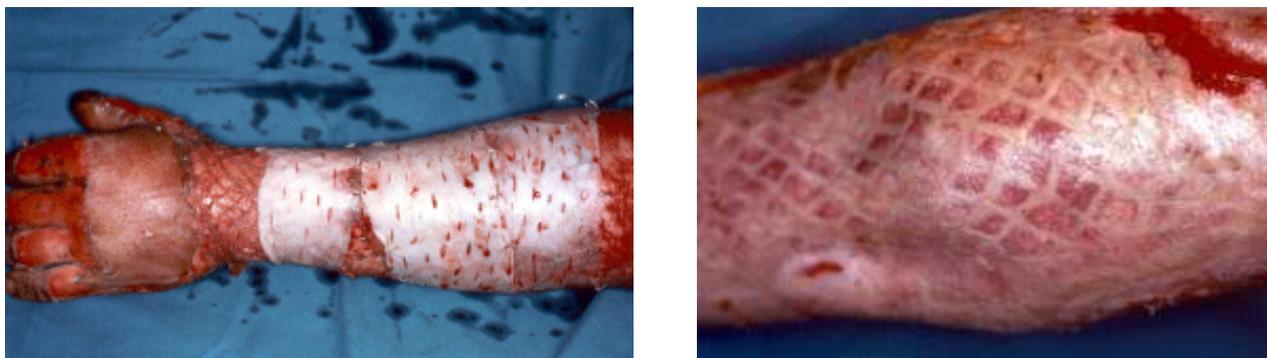


Figura 25. Quemadura 3º grado intervenida, realizando desbridamiento más cobertura con injerto de piel parcial mallado. A la izquierda se aprecia resultado postoperatorio y a la derecha a las 2 semanas tras la intervención.

1.3.2 COLGAJOS CUTÁNEOS Y FASCIOCUTÁNEOS.

INTRODUCCIÓN

Los colgajos permiten al cirujano reconstruir defectos a lo largo del cuerpo, restaurando su forma y función con garantías de éxito. Cada colgajo tiene unas características determinadas en cuanto a localización, tamaño, composición tisular, patrón circulatorio, vascularización, inervación y función. Algunas de estas propiedades pueden modificarse mediante expansión, microcirugía, composición de colgajos, prefabricación de los mismos y otras técnicas.

BASES ANATÓMICAS

Territorios vasculares

Para comprender la vascularización de los colgajos cutáneos y fasciocutáneos (aunque como veremos más tarde se puede resumir que los colgajos cutáneos son también fasciocutáneos porque dependen de las mismas perforantes) es importante describir brevemente los siguientes conceptos (figura 26) (Cormack y Lamberty, 1994):

- Territorio anatómico:

Definimos como tal el territorio que irriga un vaso y la extensión de todas sus ramas antes de que se produzca ninguna anastomosis con otros vasos vecinos. La primera descripción fue realizada por Manchot en 1889 que, tras realizar disecciones en cadáveres, enumeró las principales arterias cutáneas. Menos conocido, es el estudio realizado por Salmon, en el que también describe vasos más pequeños ya que usó radiografías de los territorios cutáneos tras inyectar un líquido radioopaco. Por último, está el trabajo de Nakajima, realizado *in vivo* en 1981 mediante arteriografías, tras producir una vasodilatación periférica del territorio a estudio con PGE1.

- Territorio dinámico:

Para comprender este concepto es básico definir la “línea divisoria” de McGregor y Morgan, que demostraron que, al ocluirse una arteria los vasos vecinos extendían su territorio hacia dicha área vascular de menor presión mediante un sistema de anastomosis. Así, cuando se inyecta una arteria cutánea específica en el cadáver en fresco, con tinte o una sustancia radioopaca, el territorio teñido es en realidad dinámico, porque se extiende también a los territorios circundantes debido a la ausencia de presión intravascular en los mismos, cambiando la extensión de los límites del colgajo sin necesidad de un procedimiento de “delay” (Reinisch y cols., 1974).

Así el patrón axial con una arteria central y su territorio puede extenderse a otros territorios circundantes, ampliando sus límites.

- Territorio potencial:

Es un área que no puede demostrarse *in vivo* ni por inyección de cadáveres, ya que incorpora un elemento aleatorio (random), incorporando una zona tras un periodo de delay. La naturaleza de los cambios vasculares en esta zona es desconocida y multifactorial, aunque podría originarse en los diferentes niveles de profundidad a la que se hallan los sistemas vasculares de la piel y sus diferentes redes anastomóticas.

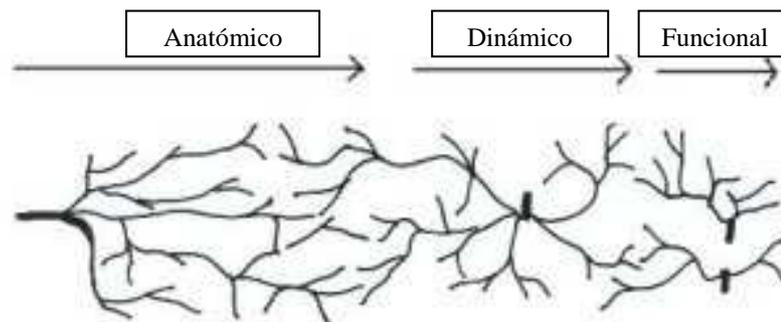


Figura 26. Territorios vasculares: anatómico, dinámico y funcional.

SISTEMAS VASCULARES

Sistema vascular cutáneo directo

Definimos este sistema de vasos como el conjunto de arterias y venas específicas que circulan en el plano graso del tejido celular subcutáneo, paralelas a la superficie de la piel y que están circunscritas a determinadas regiones del cuerpo humano. Los colgajos basados en este sistema se conocen tradicionalmente con el nombre de colgajos cutáneos de patrón axial. Según su destino pueden emplearse como colgajos pediculados, en isla o libres y así mismo pueden incluir hueso cuando las ramas profundas para el periostio derivan del mismo vaso (Ej. colgajo inguinal con cresta iliaca) denominándose colgajos osteocutáneos (McCarthy, 1990).

Sistema vascular musculocutáneo

Sistema vascular fasciocutáneo

Los colgajos fasciocutáneos se basan en arterias que pasan entre los septos intermusculares e intercompartimentales, para alcanzar la fascia profunda y posteriormente llegar hasta la fascia superficial y la piel. Este sistema de vasos recibe el nombre de sistema fasciocutáneo y es el que caracteriza a dichos colgajos, independientemente de los componentes tisulares de los mismos (Pearl y Johnson, 1998).

CLASIFICACION DE LOS COLGAJOS

Los colgajos se pueden clasificar según los tejidos que lo componen, teniendo en cuenta su tamaño y según su patrón vascular. Atendiendo a este último criterio podemos distinguir entre:

- Colgajos cutáneos axiales con vascularización directa
- Musculocutáneos
- Fasciocutáneos
- Cutáneos con patrón de vascularización aleatorio o “random”.

En el esquema que se muestra en la figura 27, tomado de Tolhurst, se ofrece una clasificación de los colgajos, con eje central en su vascularización, pero teniendo en cuenta su utilización en cirugía reconstructiva.

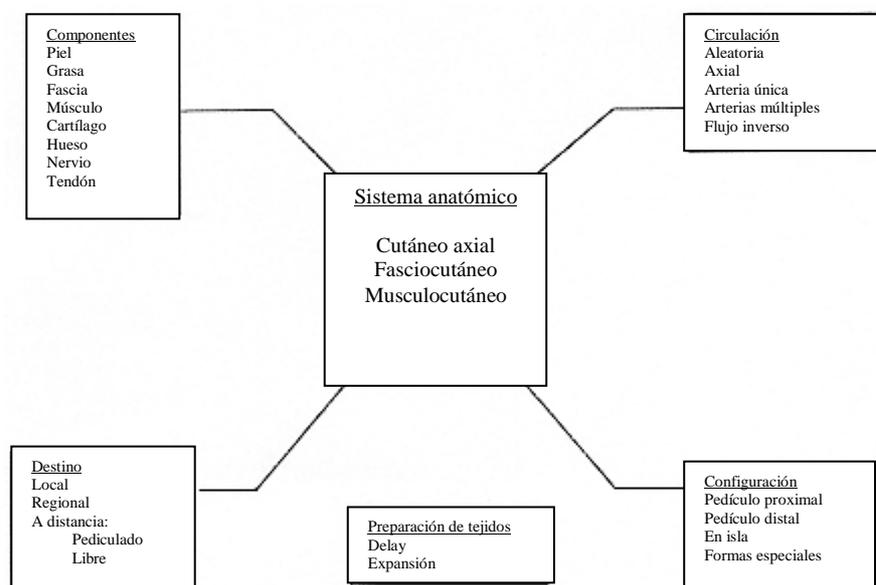


Figura 27. Clasificación de los colgajos con eje central.

Colgajos cutáneos de patrón axial

A medida que los adelantos técnicos nos han permitido ahondar en los conocimientos anatómicos de la vascularización cutánea se ha podido determinar que los vasos directos cutáneos son ramas del sistema vascular fasciocutáneo y, por lo tanto, estos colgajos pueden denominarse como tales (McCarthy, 1990).

Clásicamente se definen como colgajos de patrón axial:

- Colgajo frontal basado en la A. Supraorbitaria o en la rama frontal de la A. Temporal Superficial.
- Colgajo mediofrontal: basado en la A. Supratroclear.
- Colgajo de cuero cabelludo: basado en la rama parietal de la A. Temporal Superficial o en la A. Occipital.
- Colgajo Postauricular: basado en la A. Postauricular.
- Colgajo Deltopectoral: basado en la 2ª y 3ª perforante de la A. Torácica Interna o en la rama cutánea del eje Toracoacromial.
- Colgajo mamaria externa: basado en la A. Torácica Lateral.
- Colgajo axilar toracodorsal: basado en la rama cutánea del eje toracoacromial.
- Colgajo hipogástrico: basado en la A. epigástrica Superficial Inferior o superior.
- Colgajo inguinal: basado en la A. Circunfleja Superficial de la Ilíaca.
- Colgajo SEPA y peneano: basados en la A. Pudenda superficial externa.
- Colgajo dorsal del pie: basado en la A. Dorsal del pie.

Todos estos colgajos pueden emplearse con flujo directo, tal y como se describieron, y con flujo inverso, ya que las anastomosis garantizan su supervivencia.

Características fundamentales a tener en cuenta en la reconstrucción mediante un colgajo axial.

- Grosor: son más delgados que otro tipo de colgajo
- Color.
- Pelo.
- Defecto que se deja en la zona donante.
- Hay que tener en cuenta las posibles variaciones en cuanto a tamaño y recorrido del vaso principal.
- Dependencia: tener en cuenta la incapacidad para la vida cotidiana que genera el uso de estos colgajos, por ejemplo un colgajo pediculado que impida el uso de una mano durante 3 semanas.

Colgajos fasciocutáneos

En cuanto a la sistematización de los colgajos fasciocutáneos hay cierta controversia, tanto en terminología como en su clasificación, por lo que voy a exponer los trabajos más importantes según su autor:

Cormack y Lamberty:

Localizan las perforantes fasciocutáneas (denominadas septocutáneas por Carriquiry y Vasconez) junto a los músculos largos, mientras que donde predominan los músculos

planos (tórax y abdomen) se hallarían las perforantes musculocutáneas. Basan dicha afirmación en el hecho de que no hay una verdadera fascia profunda en el tronco, considerando la contribución del sistema fasciocutáneo a la vascularización de la piel muy limitada, siendo de consideración únicamente a nivel de las ramas horizontal y paraescapular de la A. Escapular Circunfleja.

Los vasos fasciocutáneos no se dividen, en general, hasta que no han perforado la fascia profunda, constituyendo dos plexos diferentes, el profundo y el superficial. El plexo profundo está formado por una serie de capilares y arteriolas que se orientan en la misma dirección de las fibras de colágeno de la fascia, adaptándose a las variaciones de la misma con el movimiento, así los vasos están orientados de manera diferente según su localización. El plexo superficial se compone de vasos de mayor calibre y longitud, y muchas ramas acompañan a los nervios cutáneos, orientándose la mayor parte de las veces en el eje longitudinal del miembro (figura 28).

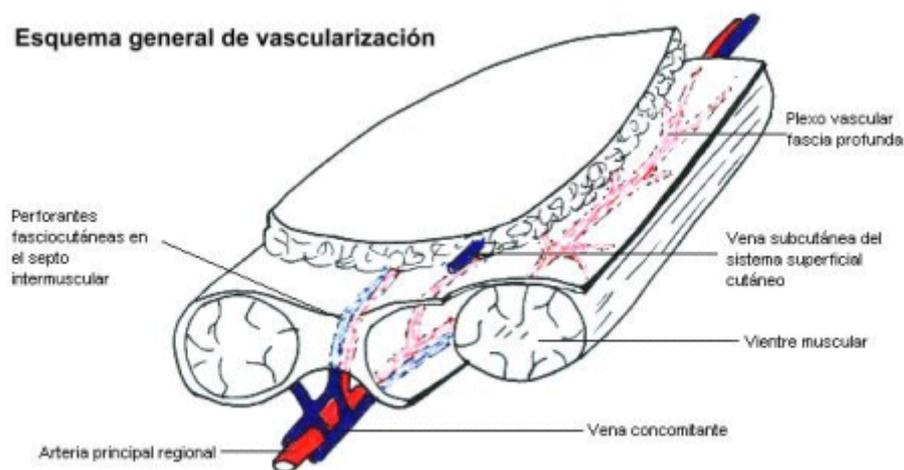


Figura 28. Vascularización general de los colgajos fasciocutáneos.

Estos autores clasifican los colgajos fasciocutáneos en tres tipos según su vascularización:

- **Tipo A:**

Son colgajos que se nutren de múltiples vasos fasciocutáneos pequeños procedentes de diferentes ramas cutáneas musculocutáneas y septocutáneas, orientándose en paralelo al eje del plexo fascial en dicha zona. Corresponden a los colgajos fasciocutáneos randomizados de Hallock, descritos por Ponten como superflaps. Tienen un gran potencial para ser usados en todo el organismo ya que no necesitan ningún vaso específico que nutra el colgajo, basta con preservar la integridad de la fascia con su red vascular como parte del mismo. Esto limita el arco de rotación y su empleo como colgajos libres, pero su gran versatilidad los convierte en una buena opción para defectos de pequeño o moderado tamaño (figura 29).

Estos colgajos se han denominado aleatorios ya que no es necesario identificar un pedículo vascular, aunque en sentido estricto serían aquellos que no requieren ningún conocimiento de la vascularización de la zona, lo que no es real ya que se orientan paralelos al eje del plexo fascial (McCarthy, 1990).

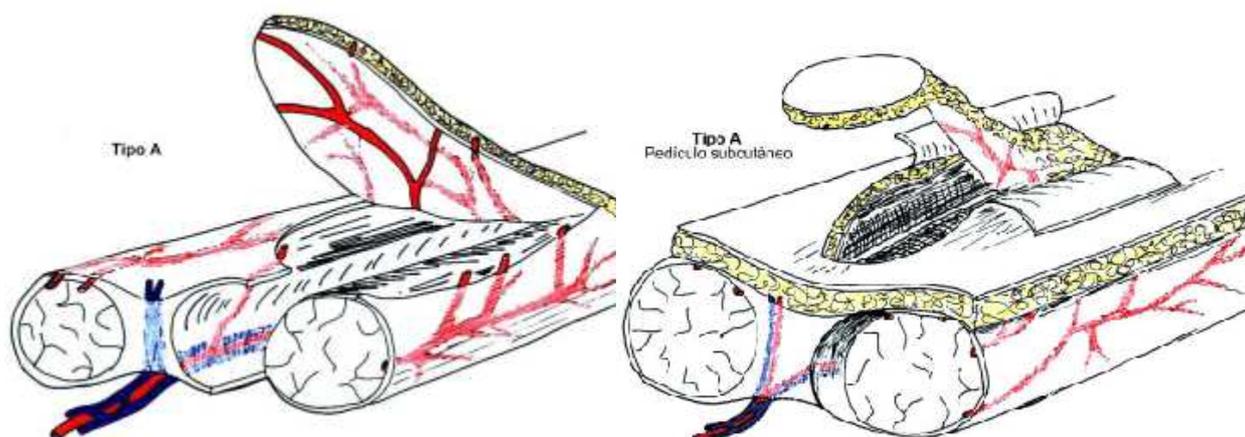


Figura 29. Colgajos fasciocutáneos tipo A según la clasificación de Cormack y Lamberty

- **Tipo B:**

Se basan en una perforante única, de tamaño moderado y que es constante en presencia y localización. Pueden usarse como colgajos pediculados, en isla o libres. Se describió una variante en la cual la perforante se disecciona hasta alcanzar el vaso principal del que es rama para facilitar la microanastomosis al aumentar la longitud y calibre del pedículo (figura 30).

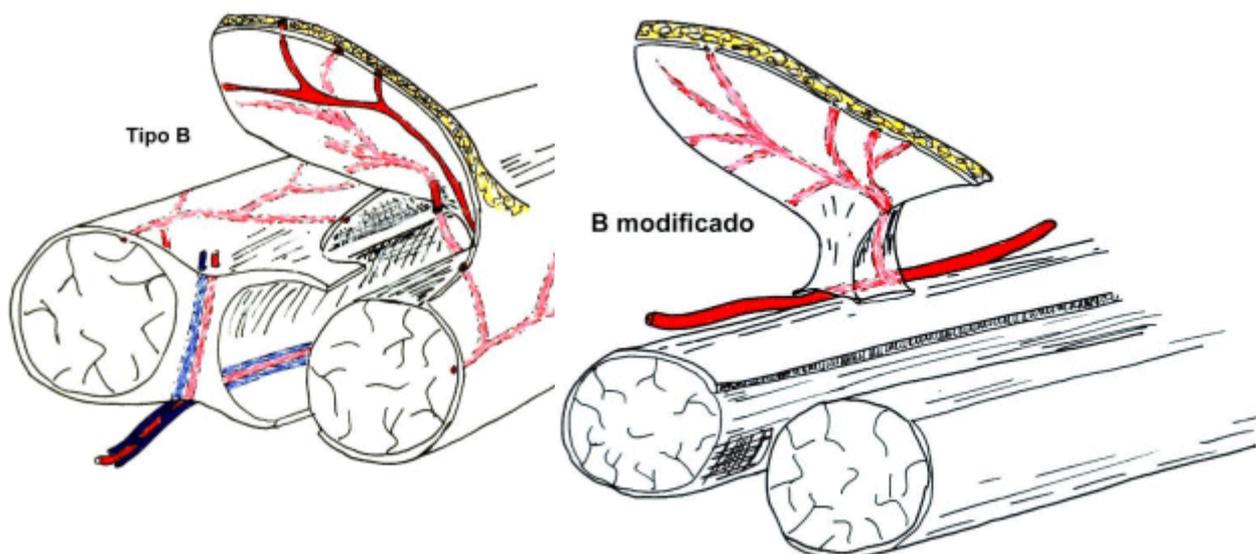


Figura 30. Colgajos fasciocutáneos tipo B según la clasificación de Cormack y Lamberty

- **Tipo C:**

Están basados en múltiples perforantes pequeñas a lo largo de toda su longitud, pero incorporan no solo el septo por donde circulan sino también una porción del vaso principal del cual derivan (Song los llamó septocutáneos). Pueden combinarse con hueso, ya sea porque la misma arteria segmentaria que es el origen de las perforantes cutáneas dé ramas para suplir el periostio del hueso adyacente, dando lugar a un colgajo fascioperióstico, o bien porque la rama que

nutre la piel proporcione una arteria nutriente que penetre en la diáfisis del hueso vecino, formando en este caso un colgajo Fascioendóstico (McCarthy, 1990) (figura 31).

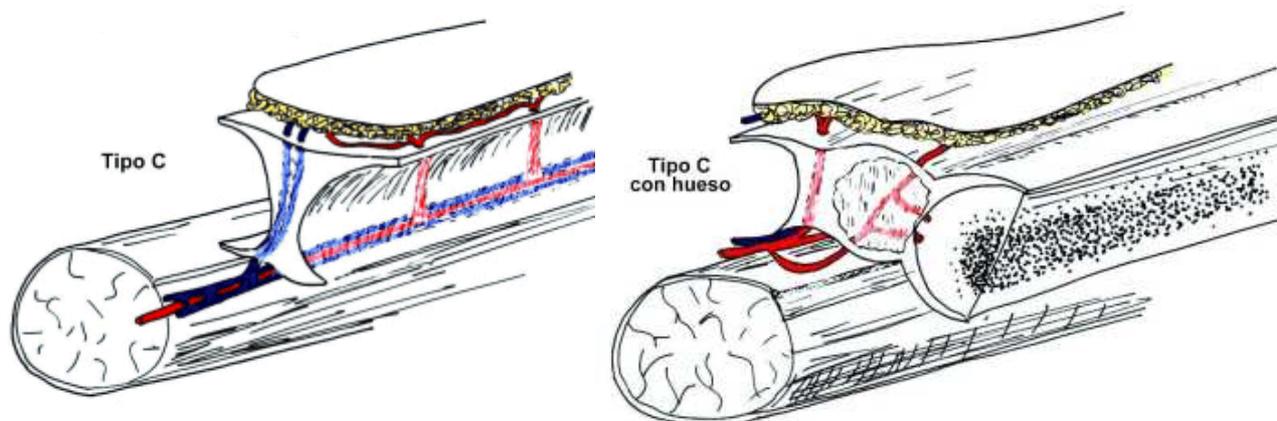


Figura 31. Colgajos fasciocutáneos tipo C según la clasificación de Cormack y Lamberty

Los tres tipos de colgajos pueden usarse también como de flujo inverso.

Otra clasificación de colgajos fue realizada por **Mathes y Nahai** (figura 32) y se describe a continuación:

- **Tipo A:** cutáneos directos.

En ellos se demuestra un pedículo con origen en un vaso regional importante, que discurre inicialmente por debajo de la fascia profunda y posteriormente superficial a la misma, para dar un buen número de perforantes cutáneas. Frecuentemente se denomina colgajo axial. Durante el curso superficial del pedículo puede detectarse por palpación o Doppler.

- **Tipo B:** septocutáneos (Intermusculares)

Todos los colgajos fasciocutáneos cuyo pedículo vascular circule entre músculos desde su origen hasta la piel, tanto si lo hace en un septo reconocido como tal o simplemente entre los vientres musculares.

- **Tipo C:** musculocutáneos.

En ciertas regiones las perforantes musculocutáneos entran en la fascia profunda y contribuyen a la irrigación tanto de la fascia como de la piel, y se puede diseñar un colgajo basado en las mismas sin incorporar el músculo subyacente. Aunque si es necesario aumentar la longitud del pedículo puede ser necesaria la incorporación de todo o parte del músculo en el colgajo.

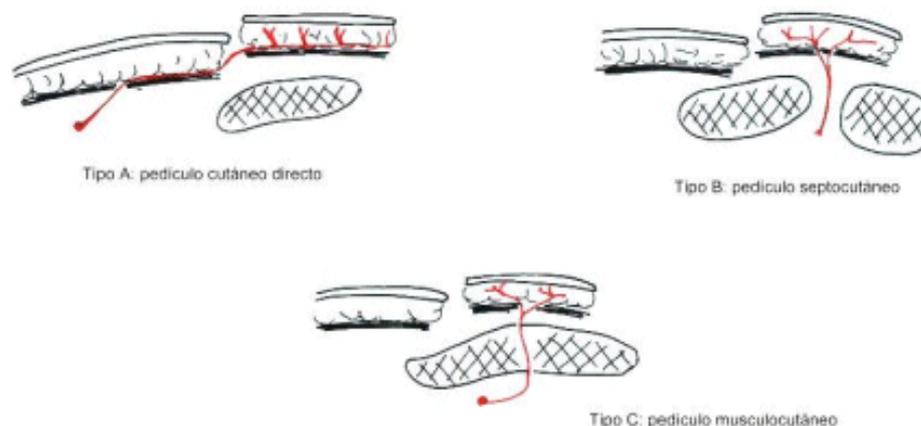


Figura 32. Clasificación de los colgajos realizada por Mathes y Nahai.

Kunert:

Propone un modelo teórico basado en el análisis de la morfología vascular, con tres patrones vasculares elementales que se relacionan con los diferentes tipos de colgajos:

- Vasos largos horizontales que darían lugar al patrón axial
- Ramas ascendentes verticales en relación con los colgajos segmentarios
- Redes vasculares en dos o tres dimensiones que darían lugar a colgajos reticulares.

Sistema atómico de Tolhurst:

Consiste en dos partes principales, un núcleo en el que hallaríamos los tejidos componentes del colgajo, y unas características secundarias: pedículo, preparación especial, destino, vascularización y forma. Posteriormente se realizó una modificación situando en el núcleo la vascularización.

Más que una clasificación es un sistema de definir un determinado colgajo.

Colgajos cutáneos aleatorios o randomizados

Podríamos definirlos como aquellos que se elevan sin explotar la axialidad de los vasos locales. Fueron los colgajos de los pioneros ya que inicialmente el plexo subdérmico se consideró el nutriente fundamental de la piel. Esta red vascular es paralela a la superficie de la piel y permite elevar colgajos de forma rectangular de tejido celular subcutáneo con un ratio longitud/anchura de 1.5:1 hasta 3:1 en la cara donde hay una mayor vascularización (Baker, 1996).

Limitaciones:

- Tienen un arco de rotación pequeño
- Están próximos a la herida y la zona circundante que puede estar lesionada.
- Resistencia bacteriana escasa.
- Por eso se ideó el sistema de “delay” con los colgajos pediculados tubulares, que podían, de ese modo, ser transferidos a distancia.

Colgajos compuestos

Este término implica que contienen más de una clase de tejidos, unidos por una base vascular común. Pueden clasificarse según la dependencia que mantengan los diferentes tejidos entre sí (McCarthy, 1990).

- Colgajos compuestos simples: Los diferentes tejidos son interdependientes y están físicamente unidos por su pedículo vascular.
- Colgajos quimera: Corresponde a dos o más tejidos diferentes, que se irrigan por dos ramas diferentes del mismo tronco principal.
- Cadena: Se usa para denominar dos colgajos separados unidos mediante microcirugía en un eje vascular común.
- Colgajos siameses: Son colgajos físicamente unidos por algún punto, pero con pedículos vasculares separados.

Modificaciones

Para adaptar los colgajos a determinados problemas reconstructivos, se pueden realizar diferentes modificaciones como expansión, transposición de colgajos segmentariamente, colgajos de hueso vascularizado, colgajos basados distalmente, transposiciones inversas, combinaciones de colgajos, colgajos con demora y prefabricados.

- Expansión tisular: Es un método efectivo para aumentar el territorio cutáneo de colgajos musculares y fasciocutáneos localizados superficialmente, aunque también puede aplicarse a fascia y nervios periféricos. El periodo de expansión generalmente, se extiende entre 6 semanas y 3 meses.
- Fenómeno delay o demora: Es una técnica para aumentar la circulación del colgajo y asegurar su supervivencia. Puede realizarse por medios químicos y también por láser, pero usualmente se lleva a cabo mediante una manipulación quirúrgica del colgajo (Baker, 1996). Requiere entre 10 a 14 días de intervalo entre intervenciones. Puede hacerse de dos maneras:
 - Por medio de una incisión en la periferia del territorio cutáneo y elevación parcial del colgajo.
 - Ligadura selectiva de algún pedículo vascular para aumentar la vascularización en el pedículo que vamos a utilizar como eje.

Desventajas:

- Se requiere una intervención preliminar
- Es posible lesionar el pedículo inesperadamente
- El tejido cicatricial que se forma puede dificultar la posterior manipulación y situación del colgajo.

PRINCIPALES COLGAJOS FASCIOCUTANEOS POR REGIONES

En la descripción de los colgajos fundamentales vamos a utilizar la clasificación de Mathes y Nahai porque consideramos que es la más sencilla de entender y se puede aplicar a la totalidad de los territorios anatómicos.

Hemos realizado un esquema en el que se enumeran los colgajos fasciocutáneos, para describir posteriormente las principales características, utilidades y técnica quirúrgica, de manera resumida, de los colgajos más empleados tanto en la reconstrucción como en cobertura de defectos. Aunque somos conscientes de que solo aporta una orientación y que es necesario el estudio de otros textos más extensos, en los que se basa este capítulo para comprender y ejecutar dichos colgajos.

Detrás de cada colgajo se apunta el tipo de vascularización según la clasificación de Mathes y Nahai.

Cabeza y Cuello (Leatherbarrow y cols 2006)

- Mediofrontal C/Axial
- Frontal standard A/Axial
- Nasogeniano C
- Scalp A/Axial
- Fascia temporoparietal A/axial
- Auricular posterior

Región anterior torax (Hwang, 2007)

- Deltopectoral C
- Torácico lateral A

Región posterior tronco

- Escapular B
- Transverso espalda C

Miembro superior

- Deltoideo B
- Lateral de brazo B
- Medial de brazo B
- Interóseo posterior B
- Radial B
- Recurrente radial B
- Recurrente cubital B

Mano

- Arteria digital A
- Arteria dorsal metacarpiana A
- Pulgar A
- Segundo dedo A

Abdomen

- Arteria pudenda profunda externa A
- Inguinal A

- Muslo-pudenda A
- SEPA (superficial external pudenda artery) A
- SIEA (superficial internal epigastric artery) A
- Toracoepigástrico C

Muslo

- Anterior lateral de muslo ByC
- Anterolateral de muslo
- Posterior o posterolateral de muslo
- Lateral de muslo B
- Medial de muslo B

Pierna

- Safeno A
- Tibial anterior B
- Arteria peronea B
- Tibial posterior B
- Sural A
- Lateral supramaleolar

Pie

- Dorsalis pedis B
- Lateral plantar B
- Medial plantar B

COLGAJO DE ROTACION

Se aplica preferentemente a defectos triangulares, siendo el lado más corto parte del colgajo y el más largo el radio del círculo. Si hay demasiada tensión puede darse un corte en la base del semicírculo y si hay tejido redundante puede extirparse un triángulo de Burow para que sea mejor el acoplamiento (wu, 2006).

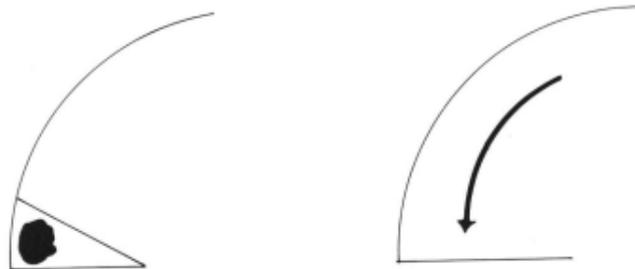


Figura 33. Colgajo de rotación

COLGAJO DE TRANSPOSICION

En este caso el colgajo es rectangular y tiene los bordes redondeados. El ángulo máximo de transposición es de 90°. La línea de máxima tensión es diagonal al colgajo, donde pueden aparecer problemas de necrosis si la tensión de cierre es excesiva (Baker, 1996).

COLGAJO DE AVANCE

Estos colgajos tienen un diseño muy simple que consiste en avanzar los bordes de una escisión hasta que se unen. La tensión máxima es perpendicular a la línea de incisión. Pueden ser rectangulares, doble avance rectangular y en V-Y (Baker, 1996).

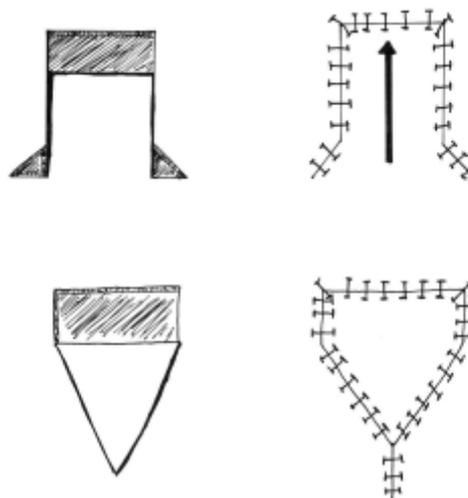


Figura 34. Colgajo de avance

COLGAJO ROMBOIDAL (LIMBERG)

Es un colgajo romboidal diseñado para cubrir un defecto del mismo tamaño y forma. Tiene dos ángulos de 60° y dos de 120°, siendo todos los lados de la misma longitud.

El punto de máxima tensión está en el cierre de la zona donante. Puede diseñarse doble o triple (Baker, 1996).



Figura 35. Colgajo romboidal

COLGAJO DE DUFOURMENTEL

Es una modificación del colgajo romboidal, con unos ángulos agudos de 30° y de 150° los mayores. Se trazan las diagonales dentro de la figura, prolongando la diagonal corta y uno de los lados, estas líneas forman un ángulo que se divide por la mitad, con una longitud igual a uno de los lados y a partir de ésta una línea paralela a la diagonal larga. Este colgajo aporta más tejido que el romboidal simple.

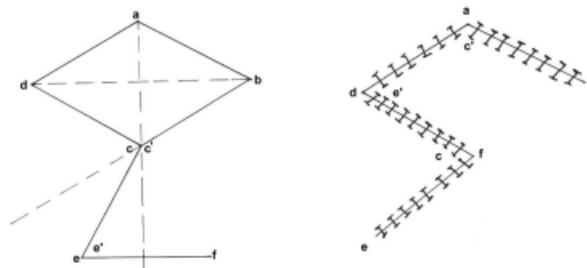


Figura 36. Colgajo de Dufourmentel

COLGAJO BILOBULADO

El colgajo bilobulado clásico consiste en dos colgajos a 90° uno del otro con una rotación total de 180°. Dependiendo del área en que se emplee pueden disminuirse los ángulos a 45-50° con una rotación total de 90 ó 100°, lo que disminuye la tensión en la sutura y la formación de orejas de perro.

El primer colgajo se diseña cercano al defecto con un tamaño aproximadamente igual o ligeramente inferior y el segundo colgajo un 25% o 50% más pequeño que el primero. Es muy útil en la reconstrucción de pequeños defecto en el ala nasal (Baker, 1996).

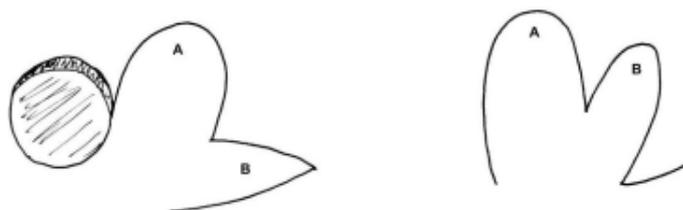


Figura 37. Colgajo bilobulado

COLGAJO EN NOTA

Es un colgajo triangular que se ha diseñado para cobertura de un defecto circular, haciendo pasar una tangente al defecto de 1.5 veces la longitud del diámetro del mismo, y a unos 50° o 60° otra incisión del mismo tamaño del diámetro del defecto a cubrir. Puede desepitelizarse la punta del colgajo para acoplarlo mejor al defecto. Es útil en defectos de 1.5 a 2 cm de diámetro.

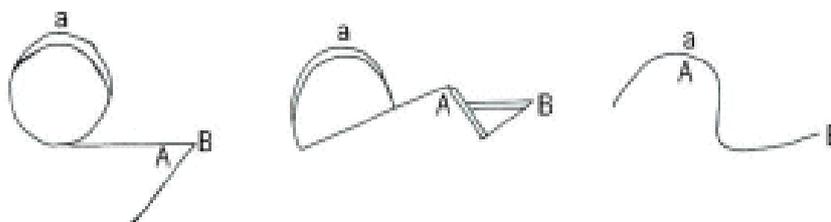


Figura 38. Colgajo en nota

2. INGENIERÍA TISULAR

2.1 INTRODUCCIÓN

La pérdida de estructura o función de los tejidos y órganos ha supuesto un motivo de preocupación continua que se intenta solventar mediante trasplantes, injertos autólogos, prótesis y regeneración tisular (Falke y Atala, 2000). Si bien desde el punto de vista médico, la utilización de órganos para trasplantes ha supuesto una alternativa real para muchos pacientes, en la actualidad esta técnica se ve limitada por el escaso número de donantes. Esta creciente necesidad de órganos, ha llevado a los investigadores a buscar nuevas alternativas para la reparación/reconstrucción de órganos y tejidos, tratando al mismo tiempo de solventar el problema inmune asociado a todo trasplante.

En este contexto, hoy en día se acuña el término de **Medicina Regenerativa**, la cual implica la actuación conjunta, multidisciplinar, de diversos campos de la investigación biomédica. Esta nueva disciplina trabaja con una metodología propia e incluye tres campos fundamentales: la **Regeneración Tisular Guiada**, la **Terapia Celular** y la **Ingeniería Tisular**, cuyas herramientas básicas son células, soportes y señales (Ikada, 2006; Park y cols., 2008; Jayasinghe, 2008; Nolan, 2008).

a. Regeneración Tisular Guiada. Esta técnica consiste en la reparación de defectos tisulares utilizando la capacidad de regeneración del propio tejido o de los tejidos circundantes. Normalmente, la regeneración tisular guiada induce el crecimiento y la diferenciación celular mediante la utilización de factores de crecimiento o soportes más o menos activos que incorporen o no diferentes señales moduladoras del proceso de reparación.

b. Terapia Celular. La terapia celular utiliza la célula como medicamento. En general, las células que se pueden utilizar en terapia celular son de origen autólogo (del propio individuo) o heterólogo (de un donante), pudiéndose aplicar de forma sistémica o local (terapia *in situ*).

c. Ingeniería Tisular. La creación de “equivalentes tisulares o constructos” de diseño a medida en el laboratorio es uno de los retos más innovadores y al mismo tiempo más complejos de la medicina actual. La ingeniería tisular, basada en el conocimiento de los procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario, pretende simular todos los pasos que conducen a la obtención de un tejido vivo, metabólicamente activo, con capacidad de adaptación. Por y por ello precisa no sólo disponer de los componentes básicos (las células y las matrices extracelulares) sino además, del conocimiento de los factores a los que este tejido va a estar sometido, como fuerzas biomecánicas, estrés y envejecimiento que, además, han de ir sincronizados con el resto de las estructuras corporales (Ikada, 2006).

En estos momentos, la consecución de tejidos artificiales en laboratorio es una de las metas que permitirán acelerar el proceso de regeneración de los tejidos dañados. Estos tejidos, al ser colocados en el lugar del implante *in vivo*,

encontrarán el medio ambiente adecuado para diferenciarse y constituir un tejido definitivo o adulto similar al que se pretende sustituir.

En los comienzos de la ingeniería tisular, la fuente celular más preciada eran las células autólogas. Sin embargo, esto no siempre es posible, ya que muchos pacientes se encuentran en una fase comprometida por el fallo del órgano en cuestión y la disponibilidad de células autólogas es escasa. Además, en otras situaciones, puede aparecer otro obstáculo, como es la inherente dificultad del tipo celular nativo del órgano dañado para expandirse *ex vivo*. Este problema ocurre con frecuencia en órganos que poseen una alta capacidad regenerativa *in vivo* (Atala, 2004), tal es el caso de la piel.

2.2 LAS CÉLULAS MADRE

En general, se define una célula madre, como toda célula capaz de llevar a cabo la división asimétrica, esto es, una célula madre es capaz de generar otra célula con idénticas características a la célula original (y que permanece como célula madre) y una segunda célula que se diferenciará para originar una célula adulta (Rao y Mattson, 2001). Las principales características de las células madre son la capacidad de autorrenovación y automantenimiento, un escaso nivel de diferenciación y la capacidad para diferenciarse a distintos tipos celulares.

En ocasiones, las células madre pueden sufrir apoptosis y no participar más en desarrollos posteriores. Este es el caso de tejidos como el cerebro donde la renovación de células diferenciadas (neuronas y células gliales) es muy escasa.

En otras situaciones, las células madre pueden transdiferenciarse, término referido a las células que no siguen su proceso de diferenciación ortotípico, sino que pueden diferenciarse hacia otros tipos de células adultas. La capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos celulares, se denomina plasticidad (Bianchi y cols., 2001).

El número de células madre y el proceso de diferenciación, están regulados según las demandas de cada momento, manteniéndose una cantidad adecuada de células precursoras indiferenciadas y de progenie diferenciada. Además, las células precursoras indiferenciadas que resulten de los procesos de división, pueden permanecer quiescentes hasta estadios tardíos del desarrollo o estar disponibles para situaciones de estrés (Rao y Mattson, 2001).

Atendiendo a su origen, las células madre se pueden clasificar en células embrionarias y células adultas, como se expondrá a continuación.

2.2.1 CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

El encuentro del material genético paterno y materno durante el proceso de fecundación, se continúa con una serie regulada de divisiones mitóticas denominadas segmentación, formándose un número cada vez mayor de células denominadas blastómeros, las cuales poseen peculiaridades que las hacen singulares. Desde el punto de vista morfológico, estos blastómeros no van acompañados de crecimiento, sino que cada vez se convierten en células de menor tamaño. Sin embargo, estas

células, al igual que el cigoto del cual proceden (figura 39), son **totipotenciales**, es decir, poseen todas las capacidades para originar el desarrollo embrionario completo (embrión y cubiertas). En la especie humana, después de la 3ª división mitótica (estadio de 8 a 12 células), las divisiones se vuelven asincrónicas y las células se transforman en **pluripotenciales**, formando una masa compacta de 32 a 128 células llamada mórula.

Conforme la mórula avanza a lo largo de la trompa de Falopio, las células continúan dividiéndose, formándose una esfera hueca llamada blastocisto, en cuya pared podemos distinguir “trofoblasto” y “embrioblasto”. Las células de la masa celular interna del blastocisto (embrioblasto) son células madre pluripotentes (Stocum, 2001) ya que pueden diferenciarse hacia todos los tipos de células y tejidos que constituyen un organismo adulto, pero no se consideran totipotenciales pues carecen de la capacidad de originar tanto membranas extraembrionarias como de contribuir a la formación de la placenta, función que asume el trofoblasto. Estas células procedentes de la masa celular interna del blastocisto han sido utilizadas por distintos autores para la generación de líneas de células madre embrionarias, las cuales están sometidas a numerosos problemas de carácter ético y legal.

Para conseguir la propagación *ex vivo* de las células madre embrionarias (figura 40) y para mantenerlas en estado indiferenciado, son indispensables la presencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF) y una lámina sustento de fibroblastos murinos (Smith y cols., 1998; Williams y cols., 1998). La diferenciación *ex vivo* de células madre embrionarias humanas, se puede lograr tras la retirada del LIF o de la capa sustento de fibroblastos. Seguidamente, se inicia la formación de agregados en suspensión que se denominan cuerpos embrionarios. La formación de cuerpos embrionarios también sucede si no se utilizan frascos de cultivo adherentes en los que se favorezca una suspensión celular. Los cuerpos embrionarios son capaces de dar lugar a tipos celulares de las tres líneas germinales (Sadiq y Gerber, 2004), y se componen de células diferenciadas y precursoras provenientes de diversas líneas distribuidas al azar, que se parecen a embriones postimplante precoces (Henningson y cols., 2003).

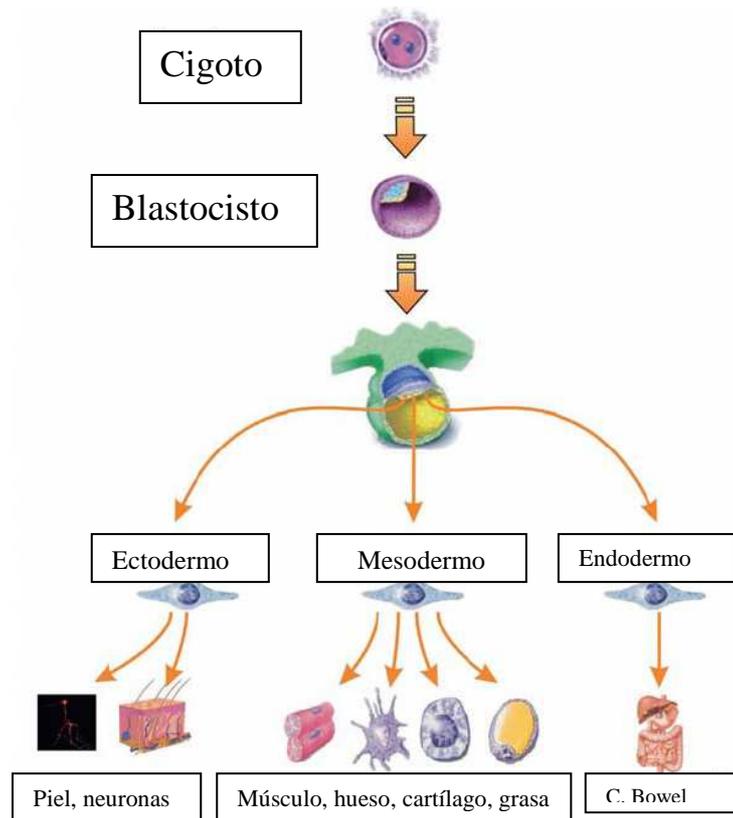


Figura 39. Esquema del desarrollo desde la etapa de cigoto hasta células adultas maduras (piel, neuronas, músculo, etc)

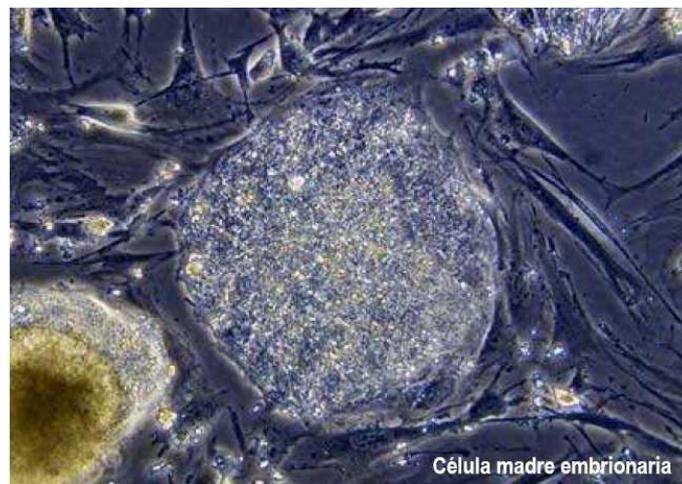


Figura 40. Imagen de una célula madre embrionaria.

2.2.2 CÉLULAS MADRE ADULTAS

Las células madre adultas son aquéllas que proceden de un individuo adulto, incluyendo el niño y el recién nacido. Estas células residen en nichos específicos o compartimentos tisulares, cuya función es el mantenimiento de la integridad tisular (Vats y cols., 2002). Se consideran además, directamente implicadas en la reparación tisular ante una agresión o lesión, siendo las encargadas de la regeneración de cada uno de los tejidos existentes en un organismo adulto.

Los fenómenos de reparación tisular implican el reemplazo de los tipos celulares dañados con el fin de reestablecer la función e histoarquitectura tisulares. Existen tres teorías para explicar los fenómenos de reparación tisular en los individuos adultos:

1. Teoría de la desdiferenciación.

Propuesta en 1971 por Toole y Gross, en base a los estudios realizados en anfibios para explicar la regeneración completa de una extremidad tras su pérdida traumática. Estos autores afirman que esta regeneración completa ocurre por un proceso de desdiferenciación de las células presentes en el tejido dañado. Esta teoría partía de la base de la no existencia de las células madre dentro de los tejidos adultos o de su no participación dentro de los procesos de reparación tisular. Las células diferenciadas dañadas durante el trauma inicial, revierten a un estado indiferenciado más primitivo antes de su proliferación y posterior rediferenciación para restaurar los tejidos perdidos (Stocum, 1998; Tsai y cols., 2002).

2. Teoría de la transdiferenciación.

Esta teoría ofrece una explicación alternativa. Propone que cada tejido en el individuo adulto contiene un único tipo de células madre específicas cuya función se limita al mantenimiento y reparación del tejido en el que residen (Donovan y Gearhart., 2001). La transdiferenciación ocurre durante la reparación tisular cuando las células progenitoras tisulares específicas derivadas de un órgano, son “reprogramadas” para formar tejidos de otro órgano (Forbes y cols., 2002a; Poulsom y cols., 2002).

3. Activación de células quiescentes precursoras de reserva.

Propone que existen poblaciones precursoras de reserva en los compartimentos tisulares conectivos y que estas poblaciones están formadas por: a) células progenitoras tisulares específicas, b) células madre de línea germinal y c) células madre pluripotenciales:

a) Células progenitoras tisulares específicas. Se ha postulado que estas células residen en los tejidos del cuerpo y que están implicadas en el mantenimiento “rutinario” de esos tejidos. Ejemplos característicos de ello son las células epiteliales basales de la mucosa gastrointestinal (Bjerknes y Cheng, 2002), las células satélite del músculo estriado (Grounds y cols., 1992; Beauchamp y cols., 2000), así como las células epiteliales de la capa basal de la epidermis. Por otra parte, sugiere que las otras dos poblaciones de los compartimentos tisulares (células madre pluripotentes y células madre de línea germinativa), experimentarían activación, proliferación y diferenciación para colaborar con las células progenitoras tisulares cuando fuera necesario, en la restauración o reemplazo de los tejidos perdidos o dañados (Young, 2004 a).

En particular, estos últimos autores, han desarrollado durante años y hasta la actualidad, diferentes trabajos para demostrar la existencia de células madre pluripotentes y células madre de línea germinativa dentro de los tejidos (figura 41). En estos trabajos se apoyan los fundamentos de esta tercera teoría.

b) Células madre de línea germinal. Diversos estudios sugieren la presencia de una población de células madre de línea germinal en los tejidos humanos. Estas células se propagan más de 200 veces sin perder el potencial de diferenciación (Young, 2000; Young y cols., 2001a y b), permanecen quiescentes en medio sin suero y en ausencia de factor inhibidor de leucemia (LIF), no expresan marcadores de célula madre embrionaria como el antígeno específico del estado embrionario, antígeno carcinoembrionario o molécula de adhesión carcinoembrionaria y, en presencia de factores proliferantes, muestran inhibición por contacto en la confluencia y un cese de la proliferación cuando una única capa de células cubre la superficie de cultivo (Young y cols., 2001a).

c) Las células madre pluripotenciales derivadas de tejidos adultos conectivos humanos, se diferencian de las anteriores en que expresan marcadores de célula madre embrionaria y generan tipos celulares de las tres líneas germinales (Young y cols., 2004b). Cuando el tejido es alterado en su estructura básica a través de un fenómeno lesivo y se requiere de diversos tipos celulares para su reparación, se pueden activar células pluripotenciales para restaurar el estado tisular previo a la lesión (Weissman y cols., 2001) (figura 41).

Finalmente estos autores proponen que la activación de células quiescentes precursoras, junto con la desdiferenciación y la transdiferenciación, podrían dar una explicación a los procesos de reparación tisular (Young y cols., 2004b).

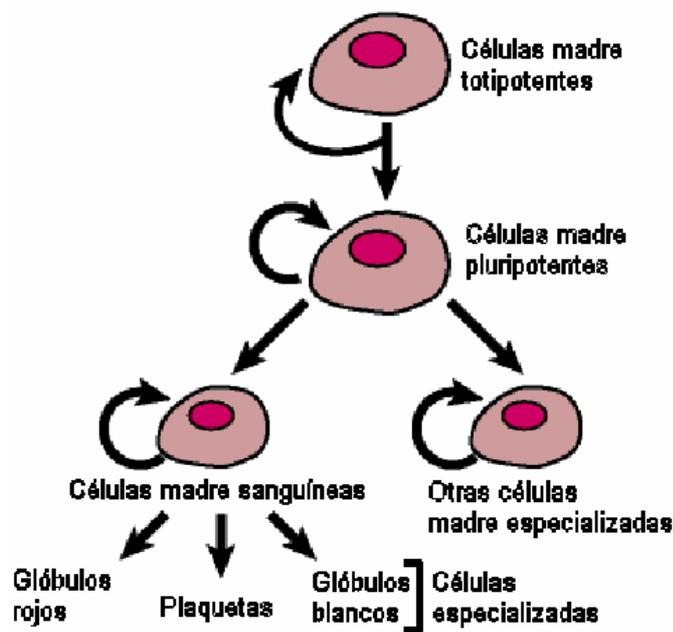


Figura 41. Esquema de diferenciación desde células madre totipotentes, pluripotentes, células madre de un órgano (tejido sanguíneo) y para dar por último células especializadas (glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos).

Un grupo importante de células madre adultas son las células madre de la epidermis o, en general, las células madre de la piel (figura 42). Estas células se localizan en el estrato epidérmico basal y dan origen a los queratinocitos maduros, vía células aceleradoras de tránsito que se dividen de tres a cinco veces antes de originar la célula diferenciada (Potten, 1981; Watt, 1998). Al ser la epidermis un tejido que experimenta una renovación constante, la utilización de estos “intermediarios” puede protegernos de posibles transformaciones neoplásicas (Janes y cols., 2002).

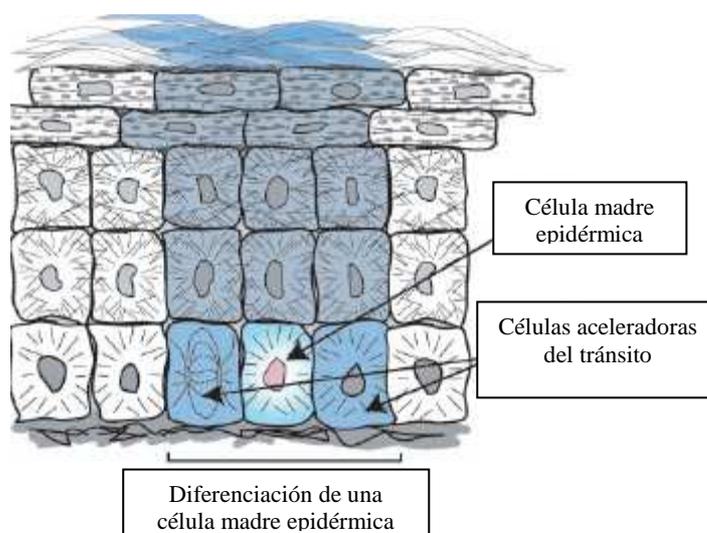


Figura 43. Proceso de diferenciación de una célula madre del estrato basal de la epidermis.

2.3 INGENIERÍA TISULAR DE LA PIEL HUMANA

La necesidad de solucionar los problemas que aparecen cuando han fallado los tratamientos convencionales de la pérdida de sustancia en la piel hace necesaria la búsqueda de alternativas basadas en la generación de sustitutos artificiales de la piel humana generados mediante ingeniería tisular (Horch y cols., 2005). En concreto, hasta el momento se han diseñado distintos tipos de sustitutos de la piel, incluyendo coberturas cutáneas sintéticas y biológicas, aunque ninguno de ellos ha logrado reproducir fielmente la estructura y las funciones de la piel humana nativa.

2.3.1.- COBERTURAS SINTÉTICAS

Las coberturas dérmicas sintéticas consisten en biomateriales no reabsorbibles y exentos de células vivas que se pueden utilizar como cubiertas temporales o como agentes inductores de la reparación tisular guiada. Estos sustitutos tisulares artificiales e inertes están indicados en quemaduras menores (dérmicas superficiales no muy exudativas) o en zonas donantes. Sus características fundamentales son:

- No aportan ningún producto antibacteriano, pero suelen actuar como barrera que impide el paso de bacterias y otros organismos patógenos.
- Su utilización implica la aparición de un exudado que dificulta, si no se posee mucha experiencia, diferenciar entre infección local y la degradación normal del hidrocóide.
- Los apósitos hidrocoloides ejercen un efecto de absorción y mantenimiento del exudado, creando un microclima de humedad que favorece la cicatrización.

La cobertura sintética más utilizada hasta el momento es el Omiderm, tal como se muestra a continuación:

2.3.1.1. Omiderm

Lámina sintética temporal de poliuretano que permite, de forma semipermeable, intercambiar con el medio ambiente distintas sustancias, pero deteniendo el ritmo de evaporación y la penetración bacteriana (figura 43).

A medida que crece el tejido hacia la lámina de omiderm, ésta aumenta su adherencia, su elasticidad y su transparencia. Permite una aplicación fácil, movimientos completos de las articulaciones, y facilidad para inspeccionar las heridas (gracias a su transparencia). Suele usarse para proteger sitios donadores, quemaduras de segundo grado, e injertos mallados, previniendo resequead y deslizamiento de los mismos (Canter y cols., 2004).

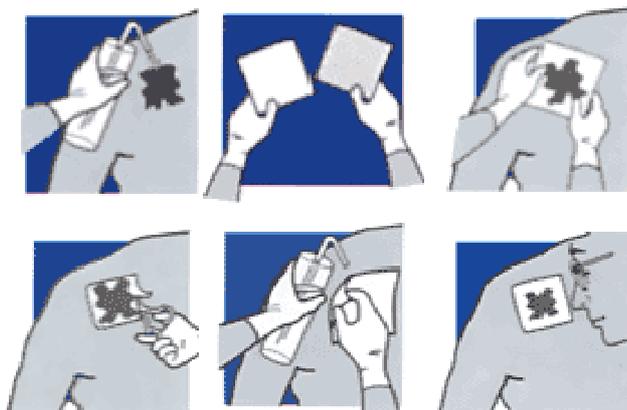


Figura 43. Cobertura sintética Omiderm

2.3.2. COBERTURAS BIOSINTÉTICAS

Este tipo de sustitutos de la piel consisten en un biomaterial de origen sintético no reabsorbible que se asocia a materiales de origen humano o animal biocompatibles y biointegrables. En ausencia de tejido autólogo, éstos son los sustitutos biológicos de primera elección en quemaduras superficiales extensas y en zonas donantes. Se caracterizan porque su uso:

- Alivia el dolor.
- Aminora la pérdida de agua, electrolitos, calor...
- Actúa como barrera mecánica frente a infecciones.
- Favorece la reepitelización.

2.3.2.1. Biobrane

Sustituto de piel biosintético temporal desarrollado en 1979. Está formado por:

- Lámina de silicona (análoga a la epidermis) que actúa como una barrera epidérmica protectora. La silicona presenta pequeños poros que permiten la eliminación de desechos y la permeabilidad para antibióticos de uso tópico (Yonezawa y cols., 2005).
- Tejido irregular tridimensional (análogo a la dermis) de filamentos de nylon al cual se adhiere colágeno tipo I (figura 44).

La adherencia inicial de Biobrane a la herida se consigue gracias a la unión entre el colágeno de la membrana con la fibrina presente en la superficie de la herida. La segunda fase de adherencia se debe a las células epidérmicas que proliferan entre los filamentos de la matriz de nylon (figura 45).

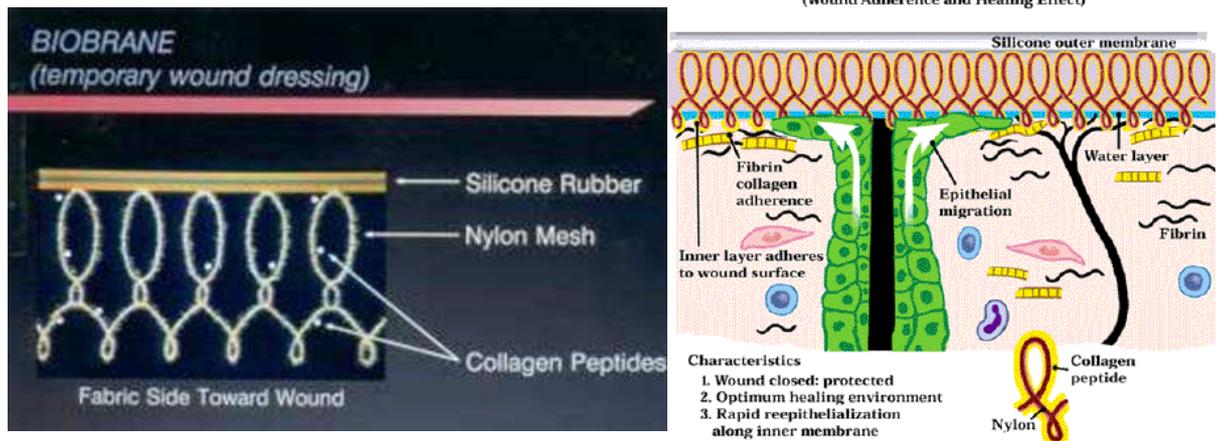


Figura 44. Estructura de la cubierta temporal biosintética Biobrane.

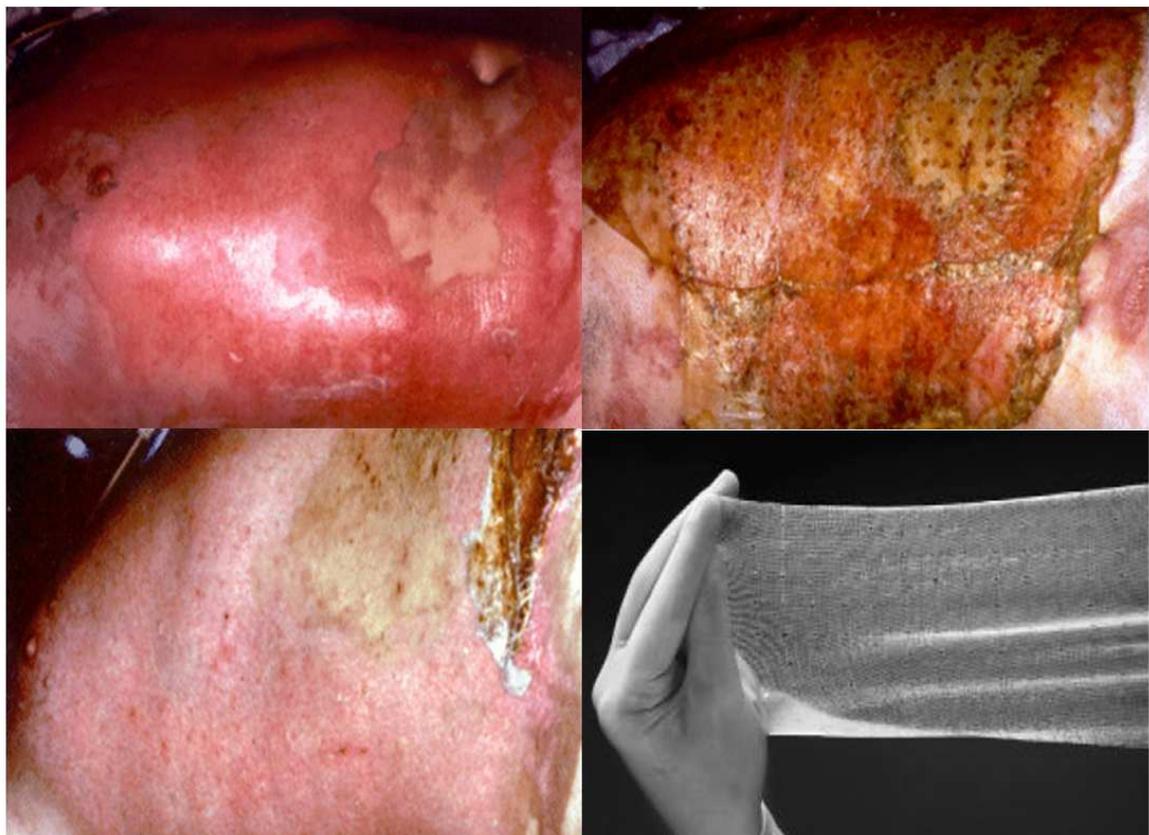


Figura 45. Arriba a la izquierda, quemadura 2º grado superficial; arriba a la derecha cobertura mediante Biobrane; abajo a la izquierda, resultado tras retirar Biobrane a la semana; abajo a la derecha aspecto macroscópico de una lámina de Biobrane.

Así, tras la colocación y fijación de Biobrane, el nuevo epitelio celular se desarrolla a lo largo de la malla sintética de nylon, usada como medio de adhesión, siendo necesaria una fina capa de agua en la superficie de Biobrane para facilitar la migración de las células epidérmicas. Una vez que se completa la reepitelialización, se retira el Biobrane.

Su uso consigue aliviar el dolor, disminuye el tiempo de hospitalización, aminorar la pérdida de agua, electrolitos, calor, etc, además de actuar como barrera mecánica frente a infecciones y favorecer la reepitelización. Actualmente se considera como cobertura de primera elección en quemaduras dérmicas superficiales extensas y en zonas donantes, aunque no se puede usar universalmente debido a su costo y aumento en el número de infecciones. Aun así, comparado con otras coberturas resulta de las mas baratas (Yonezawa y cols., 2005).

2.3.2.2. Transcyte®

Sustituto biosintético temporal. Inicialmente está formado por 2 capas:

- Externa → lámina de silicona.
- Profunda → malla de nylon, en la que se introducen los fibroblastos neonatales.

Esa estructura inicial es tratada en el laboratorio durante 3 semanas para que, sobre ella, los fibroblastos neonatales produzcan una matriz extracelular y factores de crecimiento. Seguidamente, se somete el producto a un proceso de criopreservación, con lo que se destruyen los fibroblastos, y quedan en el tejido la matriz proteica, los factores de crecimiento y la lámina de silicona superficial que constituyen, en conjunto, el producto final denominado Transcyte® (Kumar y cols., 2004; Amani y cols., 2006).

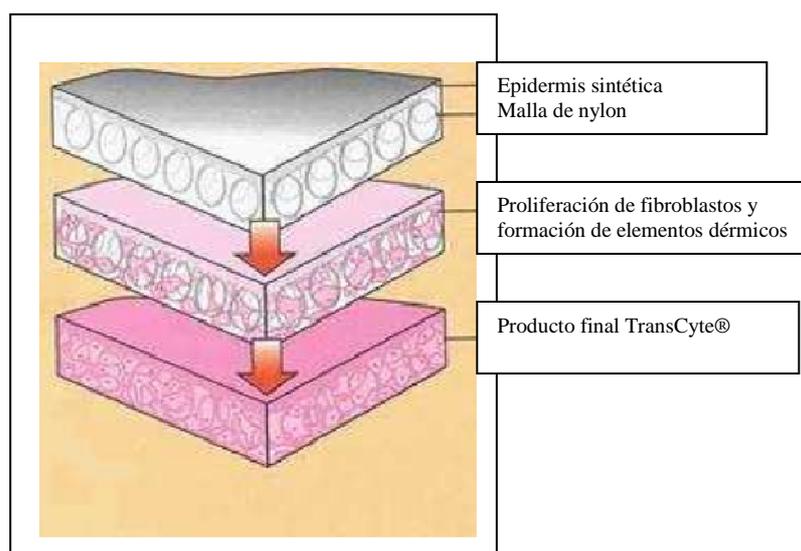


Figura 46. Estructura del sustituto biosintético temporal Transcyte®

2.3.2.3. Integra®

Fue el primer sustituto cutáneo comercializado y con capacidad de regenerar la dermis en 1981 (figuras 46 y 47). Está formado por 2 capas:

- Externa → membrana de silicona que va a aislar la zona dañada.
- Interna → matriz de colágeno de origen bovino con glicosaminoglicanos, condroitin 6 sulfato y factores de crecimiento (Violas y cols., 2005).

Este sustituto cutáneo se coloca sobre el lugar de la herida, entrando en contacto la dermis dañada con la capa profunda de Integra®, cuyos factores de crecimiento van a estimular tanto la regeneración cutánea como la angiogénesis. Aproximadamente a las 3 semanas de la colocación de Integra, se retira la membrana externa de silicona y es sustituida por un autoinjerto que suele evolucionar hacia la regeneración total de la estructura tisular de la zona dañada (Jeng y cols., 2006; Wisser y cols., 2004).

Así, Integra® tiene 2 funciones:

- Piel artificial → proporciona una cobertura fisiológica después de la lesión, disminuyendo el estrés metabólico.
- Regenerador epidérmico → genera una neodermis similar a la original, que ayudará a mejorar la calidad estética y funcional de la cicatriz (figuras 46 y 47).

En este sentido, la capa dérmica del Integra® comportaría como definitiva facilitando que la capa epidérmica que se utilizase (autoinjertos o cultivos) prendiera, con la ventaja de no transmitir enfermedades (Sang-Soo Kim y cols., 2007).

Esta cobertura estaría indicada en pérdidas cutáneas de espesor total. Sus principales desventajas son: su escasa resistencia a infecciones, la necesidad de utilizar otra cobertura para sustituir la epidermis y su elevado precio.

Tras la operación se usan prendas de presión con silicona mínimo 6 meses para evitar la aparición de cicatrices queloides (Violas y cols., 2005), ya que se han obtenido buenos resultados comparados con otros tratamientos en cuanto a cicatrices hipertróficas y queloides se refiere (Clayman y cols., 2007).



Figura 46. Tratamiento con lámina de Integra® en una pérdida de sustancia en dorso 2º dedo, con unos buenos resultados funcionales y estéticos

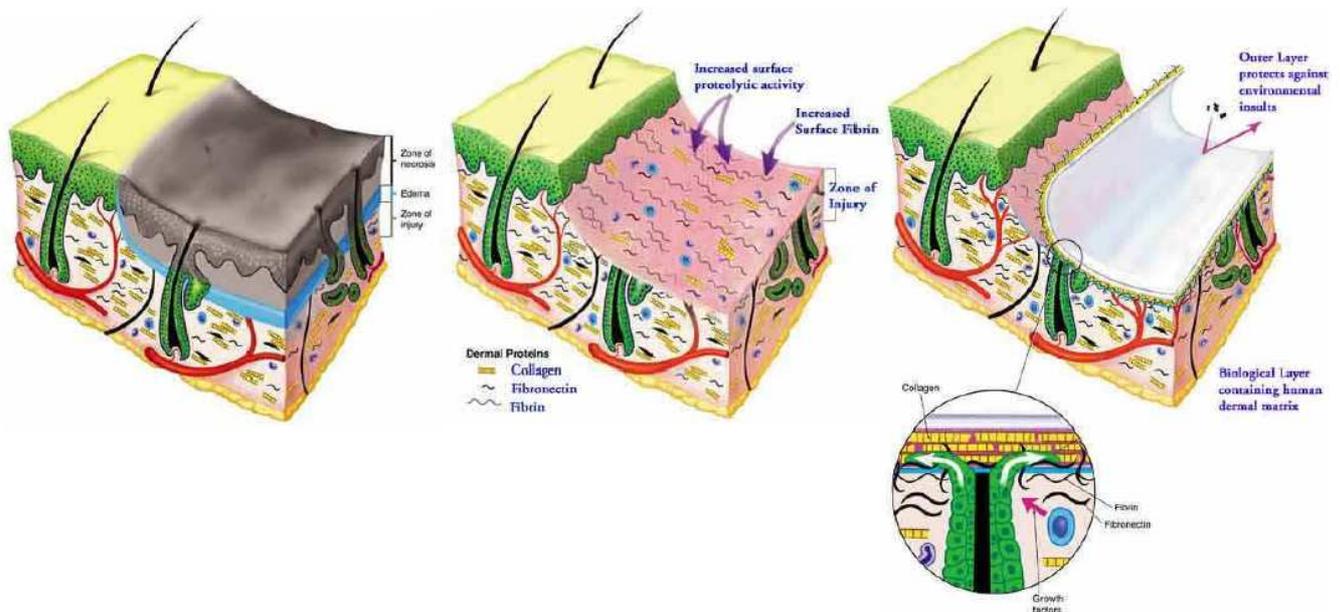


Figura 47. Esquema del mecanismo de funcionamiento de las láminas de Integra®

2.3.3. COBERTURAS BIOLÓGICAS

Las coberturas biológicas consisten en la utilización de piel humana nativa o bien de sustitutos biológicos de la piel humana en los que existen células vivas y matrices extracelulares que tratan de reproducir la estructura de la piel humana normal.

2.3.3.1. Autoinjertos

Como se describió anteriormente, los autoinjertos de piel nativa constituyen la técnica de elección en el tratamiento de los defectos de la piel que requieren cobertura cutánea. Debido a su carácter autólogo, no existe posibilidad de que estos injertos sean rechazados por el sistema inmunológico del receptor.

2.3.3.2. Aloinjertos

Los aloinjertos son una de las mejores coberturas cutáneas disponibles en ausencia de la posibilidad de utilizar piel de origen autólogo. Estos injertos pueden actuar de modo muy eficiente como barrera (figura 48). En cuanto al tratamiento preoperatorio, los aloinjertos pueden ser:

- Criopreservados → el homoinjerto será viable (células vivas).
- Preservados en glicerol → el homoinjerto será inviable (células no viables).

Uno de los principales inconvenientes que plantea su empleo es la posible transmisión de enfermedades virales del donante al receptor (hepatitis, VIH...), especialmente en los aloinjertos criopreservados.

Los aloinjertos más comúnmente empleados a nivel cutáneo pueden tener dos orígenes:

1- **Membrana amniótica humana** → se adhiere pobremente a la herida y debe ser cubierta con apósitos oclusivos. Aunque promueve la angiogénesis y la densidad capilar, su uso se hace difícil debido a su friabilidad y efectos secundarios (licuefacción y promoción de infecciones por crecimiento bacteriano). Algunas ventajas e inconvenientes derivados del uso de la membrana amniótica son:

Ventajas:

- Actúa como barrera fisiológica.
- Fácil de aplicación y remoción.
- Transparente.

Desventajas:

- Dificultad para el almacenamiento.
- Necesita renovarse cada 2 días.
- Se desintegra con facilidad.
- Existe riesgo de transferir enfermedades.

2- **Piel de cadáveres humanos** → se usa como cobertura temporal. La principal desventaja es el insuficiente suministro para atender el total de las demandas debido a la escasez de donantes de órganos.

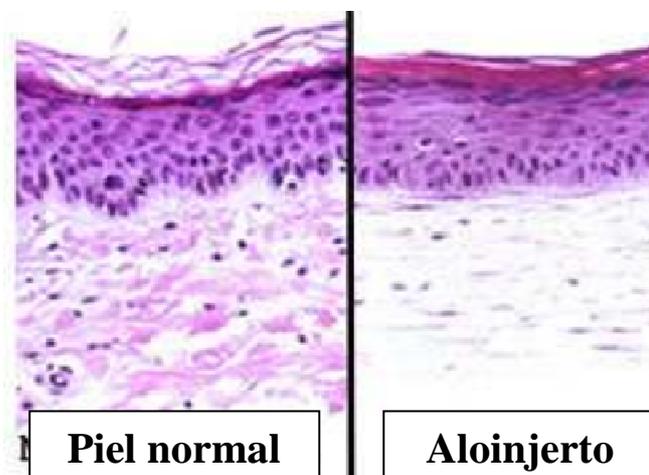


Figura 48. Comparación piel normal y aloinjerto visto con microscopía óptica (200x) y tinción H-E.

Un tipo de aloinjerto especial y comercial es el **AlloDerm®**. Se trata de una matriz proteica formada por alodermis o dermis de donante criopreservada y liofilizada (con lo que se destruye la totalidad de las células) que no incluye la capa epidérmica.

Alloderm está diseñada para servir de matriz biológica para reformar el tejido normal. Contiene tanto la estructura como la información bioquímica necesaria para dirigir la revascularización normal (a través de canales preestablecidos) y la repoblación celular, de colágenos, proteoglicanos y elastina (Zienowicz y cols., 2007) (Figura 49).

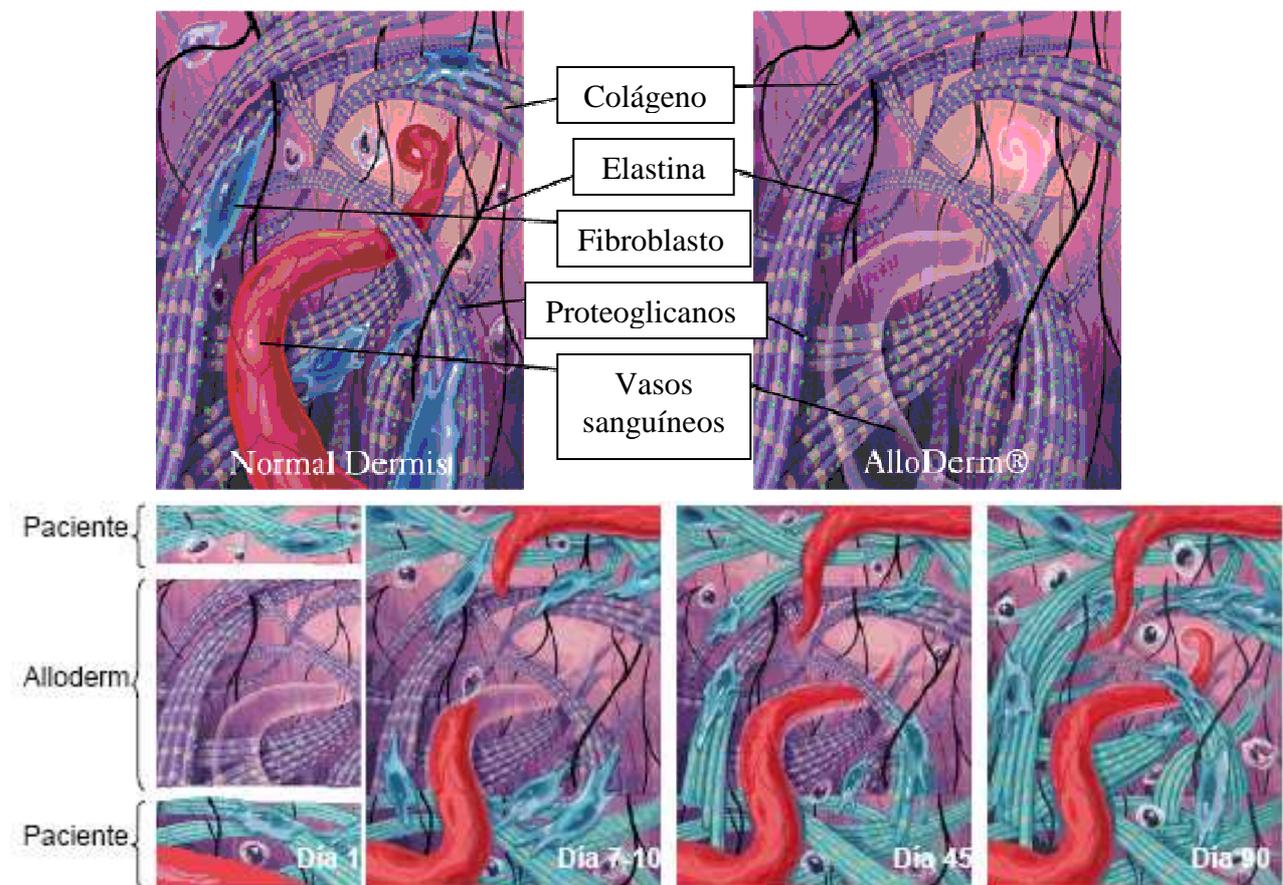


Figura 49. Arriba, estructura del AlloDerm®; abajo, evolución del AlloDerm® con el tiempo, en cuanto a revascularización, repoblación celular, colágeno, proteoglicanos y elastina, se refiere.

2.3.3.3. Apligraf[®]

El Apligraf[®] constituye un equivalente cutáneo que, de la misma manera que la piel humana, está formado por células vivas y proteínas estructurales organizadas en una bicapa:

- Epidermis externa → formada por queratinocitos humanos que primero se multiplican y después se diferencian hasta constituir una estructura de aspecto análogo al de la epidermis humana.
- Dermis → formada por colágeno bovino tipo I y fibroblastos, encargados de producir las distintas proteínas de la matriz.

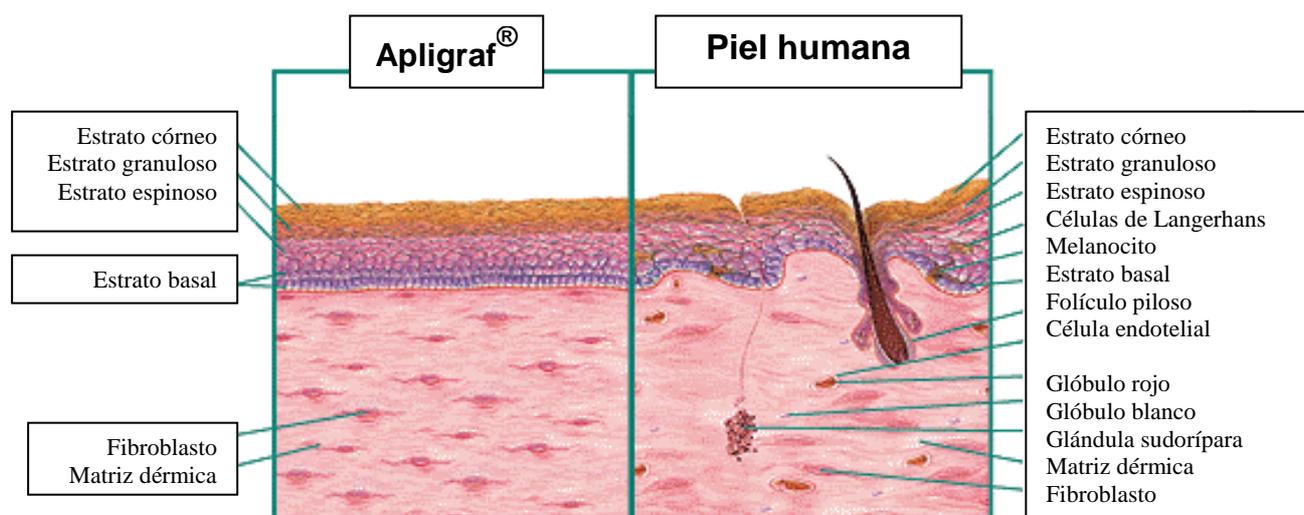


Figura 50. Imagen comparativa de Apligraf[®] con la piel humana en cuanto a estructura y composición.

A diferencia de la piel humana, Apligraf[®] no contiene melanocitos, células de Langerhans, macrófagos y linfocitos, u otras estructuras como vasos sanguíneos, folículos pilosos o glándulas sudoríparas (figura 50).

Las **ventajas** de Apligraf[®] son:

- Es el primer sustituto de piel que presenta varias capas.
- Es un sustituto de piel bastante duradero.
- Formado por componentes sintéticos y biológicos activos.
- El tratamiento es bastante rápido, pues el Apligraf[®] puede utilizarse desde el momento en que se produce la lesión.

Las **desventajas** son:

- Las células de cadáver o donante empleadas deben ser analizadas para evitar la transmisión de enfermedades o la infección por VIH, hepatitis, VDRL, citomegalovirus, toxoplasma, *brucella spp...*
- Su utilidad es temporal, puesto que se trata de un aloinjerto.
- Las técnicas de obtención de Apligraf[®] son complicadas.
- Elevado coste (1000 dólares cada lámina de 50 cm²) (Hu y cols., 2006).

2.3.3.4. Xenoinjertos

El uso de los xenoinjertos es muy limitado, ya que acarrearán multitud de complicaciones postoperatorias, entre las que destaca el rechazo en, aproximadamente, unas 72 horas. Los xenoinjertos de piel más comunes proceden del cerdo, siendo el Faison la especie porcina comúnmente más usada.

El Xenograft[®] se emplea como un producto reconstituyente, que consta de dermis de porcinos homogeneizados, que son moldeados en hojas y redes; esa dermis presenta una superficie de colágeno capaz de asociarse a la superficie de la herida (figura 51).

Se usa para cubrir temporalmente heridas limpias (como quemaduras de segundo grado), y proporciona un control excelente del dolor mientras la herida sana. Se suele combinar con plata para prevenir y evitar las infecciones (Metcalf y Ferguson, 2007).



Figura 51. Imagen a nivel macroscópico de la cobertura cutánea Xenograft[®]

2.3.3.5. Cultivos de piel

Los cultivos celulares de la piel se desarrollan en los **bancos de piel** en los que, actualmente, se pueden procesar, almacenar y elaborar distintos tipos de coberturas cutáneas.

Para fabricar un sustituto biológico eficaz de la piel humana, es necesario contar con una fuente adecuada de células epiteliales y de células estromales inmersas en una matriz extracelular similar a la de la dermis.

En este contexto, el cultivo de células epiteliales de la piel (queratinocitos) se inició en 1975 cuando Rheinwald y Green describieron por primera vez un método que permitía mantener en cultivo este tipo de células (Rheinwald y Green, 1975). Las células empleadas para el cultivo de queratinocitos procedían de pequeñas biopsias obtenidas de un fragmento de piel humana normal. Hoy en día, los avances técnicos han optimizado esta técnica y permiten obtener grandes cantidades de queratinocitos cultivados a partir de pequeñas biopsias de piel de 10-12 mm² procedentes de donantes vivos, incluso del propio paciente o almacenadas en el Banco de Tejidos. Estas biopsias son sometidas a un tratamiento mecánico y enzimático para liberar los queratinocitos más inmaduros del tejido (células madre queratinocíticas). Las células obtenidas de este modo se cultivan en diferentes condiciones, lo que permite obtener, a partir de una misma biopsia, un gran número de células (Moroi y cols., 2004; Meana y cols., 1998; Del Rio y cols., 2002; Llames y cols., 2004; Llames y cols., 2006) (figura 52).

Los diferentes bancos de piel existentes a nivel mundial difieren en su modo de actuar (local, regional, nacional e internacional), en las técnicas empleadas en la conservación y almacenamiento de la piel humana, en el tipo de sustituto que desarrollan (cultivos de queratinocitos, piel artificial celular autóloga, etc), etc.

Otros autores han diseñado modelos de piel en los que se utilizan cultivos de queratinocitos alogénicos como cobertura temporal (Yonezawa y cols., 2007). La razón de su uso es que estos queratinocitos segregan sustancias que estimulan los lechos receptores, mejorando las condiciones locales de las superficies cruentas mientras se realiza la cobertura definitiva, además de favorecer la epitelización desde los bordes sanos (Wood y cols., 2006). Sin embargo, es bien sabido que los queratinocitos son células muy inmunogénicas, pues poseen un gran número de antígenos en su superficie. Por ese motivo, la utilización de queratinocitos alogénicos siempre supone una solución temporal, puesto que estas células acaban siendo rechazadas por el paciente receptor.

Actualmente, todos los cultivos de queratinocitos (autólogos y alogénicos) también pueden conservarse criopreservados y, además de su utilización en la cobertura de grandes quemados, se han empleado en el tratamiento de úlceras crónicas (decúbito, venosas, diabéticas...), epidermolisis ampollas, escisión de nevus congénitos gigantes, etc. (Kashiwa y cols., 2004) (figura 53 y 54).

En cualquier caso, la aportación innegable de los cultivos de queratinocitos ha sido el hecho de abrir un amplio abanico de posibilidades en el mundo de la cobertura cutánea al desarrollarse una tecnología, que posiblemente, será la base de la cobertura definitiva ideal futura (Metcalf y Ferguson, 2006).

Los **inconvenientes** derivados de las coberturas así obtenidas son: escasa resistencia mecánica, sus “exigencias” en lo que al lecho receptor se refiere, su incompatibilidad con el uso de la mayoría de los antisépticos, el retraso en su disponibilidad (tardan, al igual que los cultivos de queratinocitos, 3-4 semanas), su alta susceptibilidad a infecciones locales bacterianas (Atiyeh y Costagliola, 2007), su elevado precio, el uso de materiales antigénicos (suero, diversos aditivos, células xenogénicas...) (Johnson y cols., 1990, 1991; Cairns y cols., 1995), la inestabilidad del injerto, lo cual puede llevar a obtener malos resultados en zonas de excesiva presión (espalda, hombros...) (O'Connor y cols., 1990), etc.

Las **ventajas** serían: la baja tasa en infecciones virales, la posibilidad de una gran expansión (hasta 10.000 veces el total de queratinocitos obtenidos a partir de pequeñas biopsias) (Pomahac y cols., 1998; Boyce y cols., 2002), la mejora de la tasa de epitelización y maduración de heridas comparadas con tratamiento control (Magnusson y cols., 2005), la posibilidad de utilizarse incluso en grandes quemados (figura 54) en los que no existe apenas superficie sana, la posibilidad de generar una piel 100% autóloga y los buenos resultados estéticos en pérdidas de sustancia en la cara (Kim y cols., 2007).

Aunque el cultivo de queratinocitos de la piel supuso un gran avance, su utilización clínica es muy limitada debido al hecho, fundamentalmente, de su escasa consistencia, su difícil manipulación y su enorme fragilidad. Por ese motivo, distintos investigadores diseñaron diferentes modelos tridimensionales en los que los queratinocitos cultivados se asociaban a un modelo artificial de estroma dérmico, generándose de este modo una auténtica piel completa tridimensional. Son, sin duda, estos injertos compuestos cultivados los que más expectativas están creando actualmente, siendo su ventaja fundamental el ser el único sustituto que ofrece los dos componentes de la piel de forma definitiva. En esta piel, la unión dermoépidermica se inicia *in vitro*, disminuyendo la inestabilidad de la cobertura. También se puede diferenciar *in vitro* el estrato córneo, necesario para que el sustituto cutáneo sea eficaz como barrera (figura 53).

Entre los distintos materiales que se han utilizado hasta el momento para generar un sustituto artificial del estroma, destacan el colágeno, la fibrina y otros materiales, tal como se describe a continuación:

1. Colágeno. Utilizando soportes de colágeno, se pueden generar dermis artificiales que contienen fibroblastos viables en su interior. Posteriormente, se siembran los queratinocitos en su superficie, lográndose muy buenos resultados *in vitro*. Lo más frecuente es el cultivo de fibroblastos humanos en matrices extracelulares de colágeno bovino tipo I, habiéndose cultivado los queratinocitos e incluso los melanocitos sobre esta matriz (Souto y cols., 2006), (Metcalf y Ferguson, 2006).

Uno de los modelos de piel artificial biológica en los que se utiliza colágeno como matriz extracelular es el producto denominado **Graftskin**[®]. En esta cobertura, que está compuesta por células alogénicas de prepucio neonatal, la capa dérmica son fibroblastos humanos y colágeno bovino, estando formada la epidermis por queratinocitos alogénicos estratificados y cornificados.

2. Fibrina. Uno de los modelos más utilizados para sustituir la dermis es el que utiliza fibrina humana, originalmente desarrollado por Meana y cols. (Meana y cols., 1998). Así, la matriz dérmica se obtiene empleando plasma humano de un donante, el cual se mantiene congelado hasta su uso. Para la producción de la dermis artificial, el plasma se mezcla con los fibroblastos cultivados y se induce la reacción de coagulación mediante la adición de sales de calcio. La mezcla se introduce en un frasco de cultivo y se deja a 37°C hasta que se solidifica; en ese momento, se recubre de medio de cultivo y se siembran los queratinocitos en su superficie, generalmente de origen autólogo. El gel de plasma permite que las células cultivadas (tanto fibroblastos como queratinocitos) mantengan un adecuado ritmo de crecimiento, incluso si se han sembrado a muy baja concentración. En 10-12 días de cultivo, el gel presenta una capa de epitelio confluyente en su superficie, así como un gran número de fibroblastos en su interior. En ese momento, la lámina se extrae del frasco mediante la fijación a un tul no graso estéril, y está lista para trasplantarse al paciente (Kashiwa y cols., 2004; Meana y cols., 1998; Del Rio y cols., 2002; Llamas y cols., 2004; Llamas y cols., 2006) (Figura 53).

3. Otros materiales. Con menor frecuencia, se han utilizado otros tipos de matrices extracelulares para sustituir el tejido conectivo de la piel. Los principales tipos de materiales utilizados hasta el momento son los siguientes:

- Ácido poliglicólico. El ácido poliglicólico puede manipularse en laboratorio para generar mallas tridimensionales biodegradables, habiéndose utilizado hasta el momento para sustituir distintos tipos de tejidos de tipo conjuntivo, incluyendo la dermis (Priya y cols., 2008).
- Ácido poli-láctico-poli-glicólico (PLGA). Al igual que el ácido poliglicólico purificado, los geles mixtos de PLGA se han utilizado en ingeniería tisular en diferentes tipos de sustitutos tisulares (Ng y cols., 2006).
- Quitósán. Se trata de un componente de la quitina que recubre a los artrópodos y que se puede purificar para formar geles biocompatibles (Liu y cols., 2007; Boucard y col., 2007; Norazril y cols., 2004; Gingras y cols., 2003).
- Policaprolactona (Dai y cols., 2004).
- Agarosa. Hasta el momento, la agarosa ha sido utilizada para la generación de sustitutos del cartílago (Miyata y cols., 2008), la córnea (Alaminos, 2006) y la mucosa oral humana (Alaminos y cols., 2007; Sánchez-Quevedo y cols., 2007; Garzón y cols., 2008), aunque no existe experiencia previa en el uso de este biomaterial para la fabricación de piel artificial.

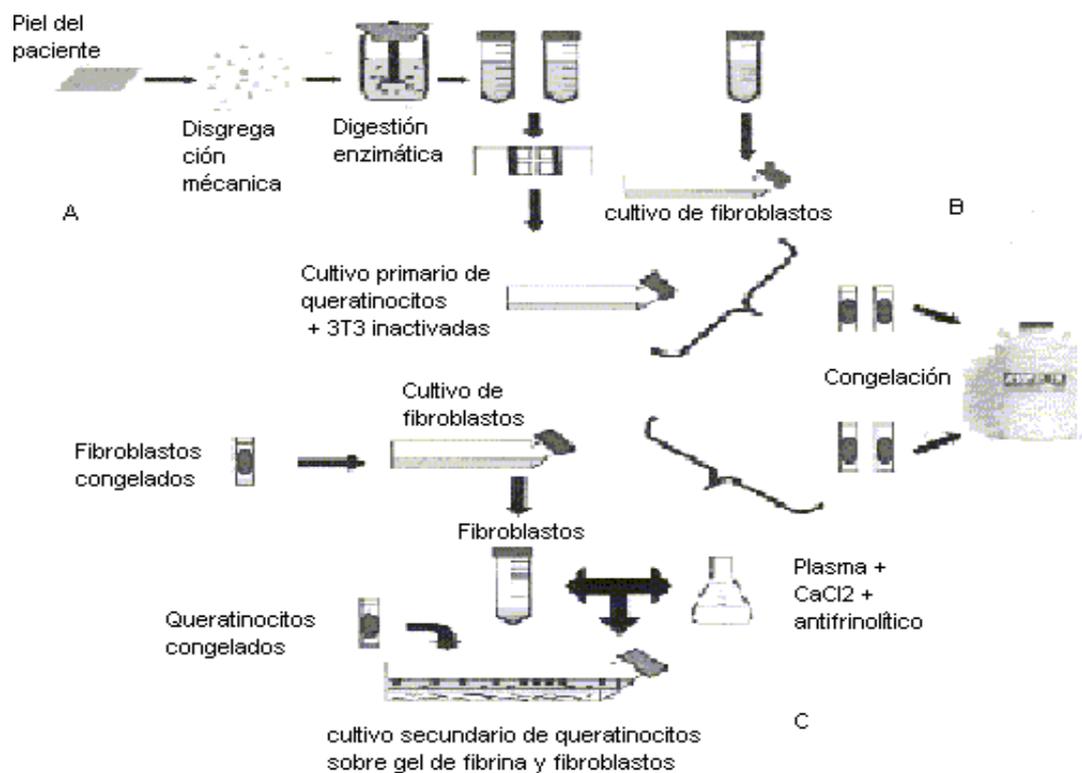


Figura 52. Esquema del cultivo primario y secundario de queratinocitos, así como el cultivo de fibroblastos

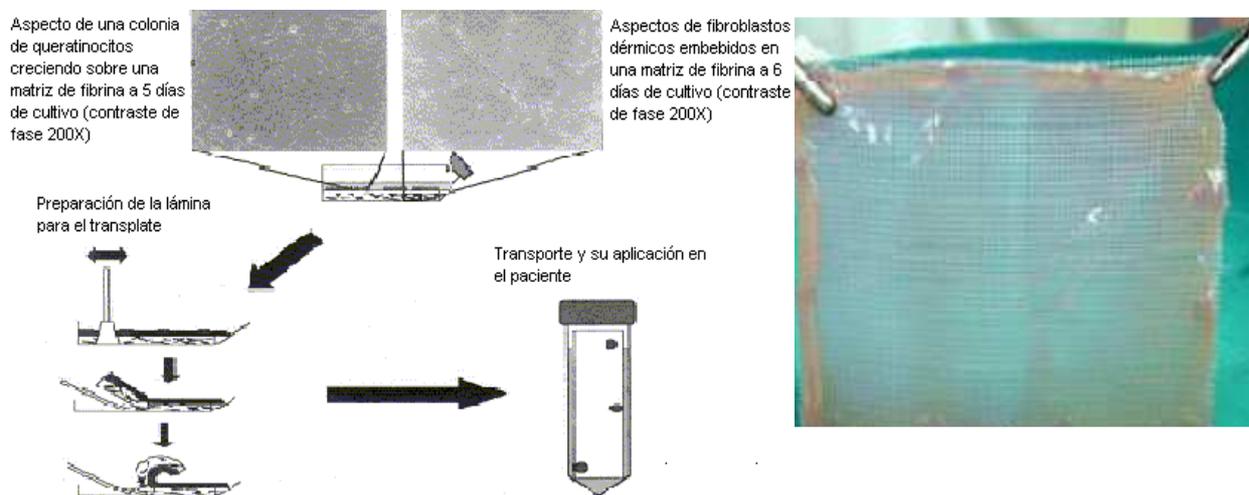


Figura 53. Resultado final del cultivo de piel humana. Preparación y transporte para aplicación en el paciente.



Figura 54. Arriba a la izquierda, pérdida de sustancia secundario a quemadura de 3º grado; arriba a la derecha, desbridamiento más cobertura con piel artificial procedente del cultivo de biopsias obtenidas del propio paciente; abajo a la izquierda, resultado tras dos semanas del tratamiento; abajo a la derecha, resultado tras 4 meses de evolución, se observa una piel con una buena calidad.

A la ingeniería tisular de la piel se le añaden las mejoras introducidas por la modificación genética de las células; estas mejoras van encaminadas a la eficacia y objetivo de la terapia génica como la transferencia génica a las células madre consiguiendo una regeneración constante del tejido epidérmico y el desarrollo de nuevos biomateriales. Además los avances en la regulación de los vectores el control espacial y temporal de la expresión génica por señales fisiológicas o exógenas, puede facilitar la administración farmacológica o terapéutica a través de la ingeniería genética de la piel (Andreadis, 2007).

El futuro podría estar en conseguir una cobertura temporal alogénica modificada genéticamente que produjese factores de crecimiento tisular que favoreciesen la curación de los lechos cruentos, y en el desarrollo de un sustituto cutáneo permanente compuesto por las dos capas de la piel, que fuese resistente a infecciones, presentase tasas de prendimiento elevadas, y de disponibilidad inmediata. Recientemente la ingeniería tisular se ha utilizado en conjunto con la **terapia génica** para producir células de distintos tejidos regeneradas en un ambiente de regulación de la expresión proteica óptima para trasplante de piel, cartílago o hueso. Incluye la transferencia de determinados genes en las células de un tejido para que así produzcan niveles terapéuticos de proteínas que necesitamos en el sitio del daño o inflamación. Este

proceso de transfección es mediante dos clases de vectores: viral y no viral. En la viral los genes son insertados en un genoma viral truncado. Las partículas víricas infectan las células diana, donde son transportados al núcleo e integrados en los cromosomas; el mensaje es transcrito a RNA y traducido a proteínas de factores de crecimiento por los ribosomas y liberados para hacer sus efectos en los tejidos deseados (Ding y cols., 2005), (Goessler y cols., 2006) (figura 55).

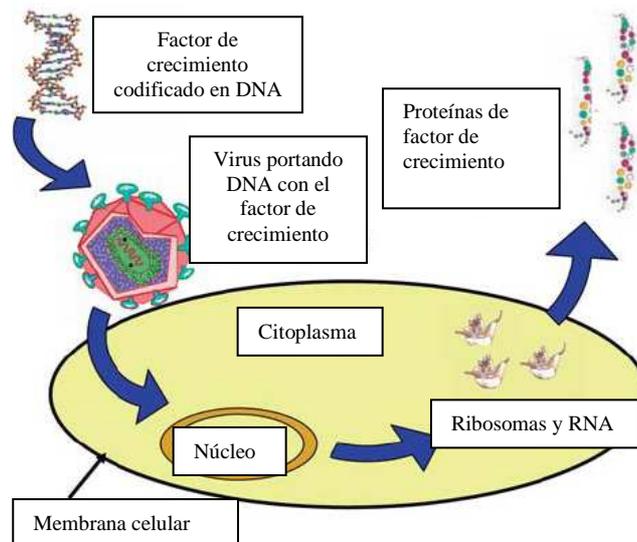


Figura 55. Terapia génica consistente en transfección con vector viral en el DNA de la célula diana y producción de proteínas de factor de crecimiento para realizar sus efectos en los tejidos deseados.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general:

Construir mediante ingeniería tisular un **sustituto equivalente de piel humana** de espesor completo para su uso experimental y terapéutico y evaluar su utilidad en un modelo animal.

Objetivos específicos:

- 1.- Cultivo en laboratorio de los distintos tipos de células de la piel humana (en especial, **fibroblastos** y **queratinocitos**) y determinación de las condiciones óptimas de cultivo y expansión celular para dichas células.
- 2.- Generación en laboratorio de un sustituto de piel humana mediante ingeniería tisular, utilizando biomateriales de **fibrina** y **agarosa** y células humanas viables (fibroblastos y queratinocitos).
- 3.- Evaluación de la **viabilidad *in vivo*** de los sustitutos de piel humana artificial mediante implante en ratones inmunodeficientes.
- 4.- Evaluación **histológica** de los tejidos artificiales implantados en ratones inmunodeficientes.
- 5.- Evaluación con **inmunofluorescencia** de los tejidos artificiales implantados en ratones inmunodeficientes.

*MATERIAL Y
MÉTODOS*

MATERIAL Y MÉTODOS

Un amplio abanico de enfermedades y/o de estados fisiológicos, influyen de forma negativa sobre la reparación de heridas de la piel, lo cual conlleva en muchos casos con la formación de una cicatriz antiestética y retráctil. Por ello, conseguir una reparación rápida y eficaz que permita integrar sin gran demora al paciente a su estado funcional previo en individuos afectados con determinadas patologías, sigue siendo una encrucijada sin resolver en la práctica médica.

Una de las alternativas más novedosas, es la Ingeniería Tisular. Es decir, la utilización de células y tejidos artificiales como tratamiento médico, para la reparación /regeneración de las lesiones de la piel. Este tipo de terapia permitirá colocar las bases celulares necesarias para restaurar la solución de continuidad deseada con mayor rapidez y eficacia.

El desarrollo de esta alternativa terapéutica, se ha encontrado con la necesidad de buscar fuentes celulares como herramienta de tratamiento. Esto ha llevado a desarrollar nuevas estrategias que ayuden a conseguirlas.

1.-OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PIEL HUMANA

Se ha contado con 4 muestras de piel de espesor total (epitelio y dermis) obtenidos de 4 pacientes sanos sometidos a diferentes procedimientos de Cirugía Plástica ambulatoria bajo anestesia local y locoregional. Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron tratados en el Servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y todos los procedimientos quirúrgicos asociados se llevaron a cabo en los quirófanos con que dicho Servicio cuenta en el Hospital. En todos los casos, se contó con el consentimiento firmado del paciente una vez que éste había sido pertinentemente informado del procedimiento (Anexo 1). En el momento de la obtención, ninguno de los pacientes seleccionados presentaba enfermedad sistémica grave, proceso neoplásico asociado o enfermedad infectocontagiosa. En ningún caso se extirpó más tejido del necesario para el tratamiento de la patología quirúrgica que presentaba el paciente.

Una vez obtenida la muestra de forma estéril con la ayuda de unas tijeras se eliminó el tejido graso subcutáneo hasta dejar expuesta la capa de dermis, tras lo cual los tejidos extraídos fueron introducidos inmediatamente en medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (**DMEM**) (Sigma-Aldrich Ref. D5796, Saint- Quentin-Fallavier, Francia) suplementado con **antibióticos** (500 U/ml de penicilina G y 500 µg/ml de estreptomocina) y **antimicóticos** (1,25 µg/ml de anfotericina B) (Sigma-Aldrich Ref. A5955) para evitar una eventual contaminación de la muestra. La composición del medio de cultivo DMEM se muestra a continuación en la tabla 3.

Estas muestras de piel humana se utilizaron, por un lado, como controles histológicos de piel humana normal y, por otro lado, para la generación de cultivos celulares primarios de fibroblastos y queratinocitos.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo DMEM y HAM-12 utilizados en este trabajo. Todos los valores están expresados en gramos por litro de medio de cultivo.

COMPONENTE	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Nutrient Mixture F12 (Ham)
SALES INORGÁNICAS		
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.265	0.0441
CuSO ₄ •5H ₂ O	—	0.0000025
Fe(NO ₃) ₃ •9H ₂ O	0.0001	—
FeSO ₄ •7H ₂ O	—	0.000834
KCl	0.4	0.224
MgCl•6H ₂ O	—	0.123
MgSO ₄	0.09767	—
Na ₂ HPO ₄	—	0.14204
NaCl	6.4	7.599
NaH ₂ PO ₄	0.109	—
NaHCO ₃	3.7	1.176
ZnSO ₄ •7H ₂ O	—	0.000863
AMINOACIDOS		
Glycine	0.03	0.00751
L-Alanine	—	0.009
L-Arginine•HCl	0.084	0.211
L-Asparagine•H ₂ O	—	0.01501
L-Aspartic Acid	—	0.0133
L-Cystine•2HCl	0.0626	0.035
L-Glutamic Acid	—	0.0147
L-Glutamine	0.584	0.146
L-Histidine•HCl•H ₂ O	0.042	0.02096
L-Isoleucine	0.105	0.00394
L-Leucine	0.105	0.0131
L-Lysine•HCl	0.146	0.0365
L-Methionine	0.03	0.00448
L-Phenylalanine	0.066	0.00496
L-Proline	—	0.0345
L-Serine	0.042	0.0105
L-Threonine	0.095	0.0119
L-Tryptophan	0.016	0.00204
L-Tyrosine•2Na•2H ₂ O	0.10379	0.00778
L-Valine	0.094	0.0117
VITAMINAS		
Choline Chloride	0.004	—
D-Pantothenic Acid•½Ca	0.004	0.00048
Folic Acid	0.004	0.00132
Hypoxanthine	—	0.00408
Linoleic Acid	—	0.0000084
myo-Inositol	0.0072	0.018
Niacinamide	0.004	0.000037
Pyridoxine•HCl	0.004	0.000062
Riboflavin	0.0004	0.000038
Thiamine•HCl	0.004	0.00034
Thioctic Acid	—	0.00021
Thymidine	—	0.00073
Vitamin B-12	—	0.00136
OTROS		
D-Glucose	4.5	1.802
Phenol Red•Na	0.0159	0.0013
Pyruvic Acid•Na	—	0.11
Putrescine•HCl	—	0.000161

2.- DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS

Transcurrido el periodo de transporte, todas las muestras fueron lavadas dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomicina y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente) para eliminar todos los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a las muestras. En primer lugar, para separar la dermis del epitelio, las muestras se mantuvieron en una solución estéril con **dispasa II** a 37°C que degrada la membrana basal sobre la cual se ancla el epitelio a la dermis, por lo que tras esto se consiguió separar mecánicamente por un lado el epitelio y por otro la dermis.

Una vez separado, el epitelio correspondiente a la epidermis se cubrió con una solución de **tripsina-EDTA** y se trocó con tijeras hasta obtener pequeños fragmentos de epitelio. Con la ayuda de una pipeta empapada en tripsina-EDTA se transfirió el epitelio a un frasco con agitador magnético previamente esterilizado. Se añadieron unos 2,5 ml de tripsina-EDTA al frasco con agitador y se incubó a 37°C durante 10 minutos para separar enzimáticamente los queratinocitos de la epidermis. Transcurrido este tiempo, se recogió la tripsina que contenía los queratinocitos individualizados en un tubo cónico de 50 ml con ayuda de una pipeta, procurando no arrastrar con ella fragmentos de epitelio. Se añadió tripsina-EDTA recogida en el tubo de 50 ml se neutralizó con igual cantidad de medio de cultivo suplementado con un 10% de suero bovino fetal y se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm. El pellet resultante que contenía gran cantidad de queratinocitos individualizados se resuspendió en 2-3 ml de medio de cultivo (QC, medio de cultivo de queratinocitos) (De Diego y cols., 2004; Llamas y cols., 2004), el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales sobre los fibroblastos. El medio QC estaba compuesto por 3 partes de medio DMEM rico en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) y una parte de medio Ham F-12 (Sigma-Aldrich Ref. N6658), todo ello suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Sigma-Aldrich Ref. F9665), antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B; (Sigma-Aldrich Ref. A5955), 24 µg/ml de adenina (Sigma-Aldrich Ref. A9795) y distintos factores de crecimiento: 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich Ref. H0888), 5 µg/ml de insulina (Sigma-Aldrich Ref. I2767), 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF) (Becton-Dickinson Ref. 354052, Lincoln Park, Nueva Jersey, EEUU), 1,3 ng/ml de triyodotironina (Sigma-Aldrich Ref. T5516) y 8 ng/ml de toxina colérica (Sigma-Aldrich Ref. C3012).

Para llevar a cabo la digestión de la matriz extracelular de la dermis de la piel y conseguir la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz, las muestras fueron incubadas a 37°C en una solución estéril de **colagenasa tipo I** de *Clostridium histolyticum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 6 horas. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos estromales. Para la obtención de cultivos primarios de fibroblastos, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos la solución de digestión que contenía las células estromales disgregadas de la dermis,

recogiéndose el pellet celular correspondiente a los fibroblastos en frascos de cultivo de 15 cm² de superficie. Como medio de cultivo, se utilizó DMEM enriquecido en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. D5796) suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0,25 µg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos MF (medio de fibroblastos).

En todos los casos, las células fueron incubadas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

3.- SUBCULTIVO DE LAS CÉLULAS PROCEDENTES DE CULTIVOS PRIMARIOS DE PIEL

Una vez alcanzada la confluencia celular, los distintos cultivos celulares de fibroblastos o queratinocitos se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1-3 ml de una solución de **tripsina** 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma-Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos y en **colagenasa** tipo I de Clostridium hystolicum (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 6 horas, respectivamente. Esta solución es capaz de digerir el colágeno de la dermis y liberar los fibroblastos estromales.

Así se consigue disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo de sendos queratinocitos y dermis.

Para el caso de la dermis, una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 10 ml de medio de cultivo MF. La presencia de abundantes proteínas séricas QC es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina. En los queratinocitos, se utilizó el medio de cultivo QC.

Posteriormente, sendas soluciones de queratinocitos y dermis en las cuales se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener un pellet o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El pellet celular se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de medio MF o QC y estas células se cultivaron en frascos de cultivo de 15, 25 o 75 cm² de superficie.

Habitualmente, los cultivos de queratinocitos se expandieron hasta aproximadamente cinco veces en nuevos frascos de cultivo. Los cultivos de fibroblastos se expandieron aproximadamente unas quince veces en frascos de cultivo antes de su uso para fabricar los sustitutos de tejido conectivo.

En todos los casos, y para asegurar una adecuada viabilidad celular, la elaboración de sustitutos de piel se llevó a cabo utilizando células correspondientes a los cuatro primeros subcultivos.

4.-CONGELACIÓN DE CÉLULAS

Una vez alcanzada la confluencia de los cultivos, se procedió a congelar las células para su conservación a largo plazo. Para ello, los fibroblastos y queratinocitos se trataron con una solución de **tripsina** 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma-Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para despegarlos de la superficie del frasco de cultivo. Para neutralizar la tripsina, se añadió una cantidad equivalente de medio de cultivo MF o QC (ambos contienen un 10% de SBF), obteniéndose las células separadas mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. Tras esto, las células se mantuvieron sobre hielo y se resuspendieron en medio de congelación para queratinocitos (10% de glicerol, 15% de SBF y 75% de DMEM) o para fibroblastos (10% de DMSO, 10% de SBF y 80% DMEM) en viales especiales para ultracongelación. Para evitar un choque térmico demasiado brusco, las células incluidas en el medio de congelación se congelaron a -20°C durante las primeras 12-24h, pasándose a continuación a una temperatura de -60° durante 24h y finalmente, a un tanque con nitrógeno líquido (inicialmente en fase vapor y después en fase líquida), donde se almacenaron a largo plazo.

Generalmente, los queratinocitos fueron congelados a una densidad 1/10. Esto significa que con un frasco de cultivo celular de 75 cm² se prepararon 10 crioviales para congelar. Cada uno de estos crioviales servirá más adelante para sembrar un frasco de cultivo de 75 cm². Para los fibroblastos, se utilizaron dos crioviales por cada frasco confluyente de 75 cm².

5.- CONSTRUCCIÓN DE SUSTITUTOS DE PIEL HUMANA MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR

La construcción de sustitutos de piel humana de espesor completo, se llevó a cabo de modo **secuencial**. Para ello, en primer lugar se elaboró un sustituto de estroma de piel y, en segundo tiempo, se fabricó un equivalente epitelial en la superficie del mismo. Además, para garantizar una correcta diferenciación y estratificación del epitelio construido, se utilizó la técnica de cultivo denominada **interfase aire-líquido** (Reichl y Müller-Goymann, 2003). Para ello, los constructos de piel se elaboraron en insertos porosos de **cultivo Transwell®** con membranas porosas de $0,4\ \mu\text{m}$ (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU). Estos sistemas de cultivo están compuestos por una placa estéril de 6 pocillos en el interior de los cuales se aloja una pieza de plástico móvil cuya base está formada por una membrana porosa y permeable de nylon o policarbonato (Figura 56). El tamaño de estos poros permite a los nutrientes pasar a través de la membrana de la placa pero evita la migración de las células de un compartimento a otro.



Figura 56. Sistemas de cultivo Transwell® con membranas porosas de $0,4\ \mu\text{m}$ (Costar, Corning, Nueva York, EEUU).

La construcción de los sustitutos de piel se llevó a cabo, en primer lugar, elaborando un equivalente o sustituto estromal directamente en los insertos porosos anteriormente descritos, utilizando para ello un modelo de geles de agarosa y fibrina que se detalla a continuación:

Para la elaboración de geles de agarosa y fibrina al 0,1%, se utilizó **plasma sanguíneo humano** congelado procedente de donantes sanos (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería, CRTS, España) siguiendo las normas y recomendaciones de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (*American Association of Blood Banks*, 1990). La fabricación de sustitutos estromales de la dermis se llevó a cabo utilizando una modificación de la técnica previamente descrita por Meana y colaboradores (Meana y cols., 1998; Llamas y cols., 2004) previamente utilizada por nuestro grupo de investigación para el desarrollo de sustitutos artificiales de la mucosa oral y la córnea (Alaminos y cols., 2006, 2007; Sánchez-Quevedo y cols., 2007; Garzón y cols., 2009). Para ello, se utilizaron 100.000 fibroblastos procedentes de los cultivos primarios, resuspendidos en 750 μ l de medio de cultivo DMEM, a los cuales se añadieron unos 7,6 ml de plasma sanguíneo humano. Para evitar la fibrinólisis espontánea de los geles de fibrina, se añadieron 150 μ l de **ácido tranexámico** (Amchafibrín[®], Fides Ecofarma, Valencia, España). Finalmente, la reacción de coagulación de la fibrina se precipitó mediante la adición de 1 ml de **Cl₂Ca** 1% (p/v) a la mezcla, añadiéndose justo después 0,5 ml de **agarosa** tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045) disuelta al 2% (p/v) en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión. La concentración final de agarosa en el gel fue del 0,1% (p/v). Una vez mezclados todos los componente, y evitando un trauma físico excesivo, estos geles se alicuotaron cuidadosamente en los insertos porosos o en placas de Petri (Figura 57) y se dejaron en el incubador a 37°C con un 5% de CO₂, durante 2 horas para que coagularan. Después de este tiempo se cubrieron con 10 ml de medio de cultivo QC.

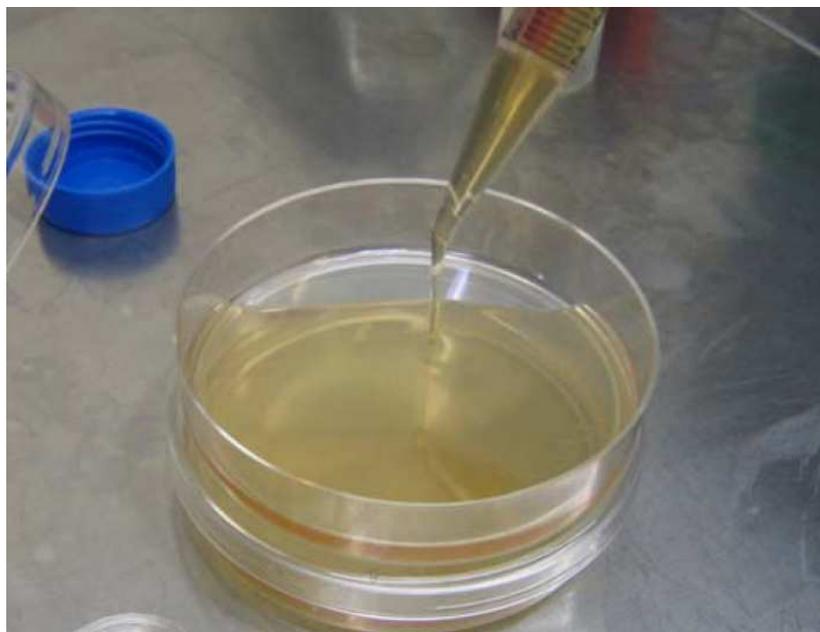


Figura 57. Preparación de sustitutos estromales de fibrina humana. La mezcla que contenía el plasma, los fibroblastos, el agente antifibrinolítico, la agarosa y el cloruro cálcico se alicuotó en placas de Petri antes de que comenzara la reacción de coagulación del plasma.

En segundo lugar, 24 horas más tarde, se **tripsinizaron** los cultivos primarios de queratinocitos, subcultivándose las células epiteliales individualizadas sobre la superficie de los sustitutos estromales en medio QC. Finalmente, 15 días después de establecer el cultivo epitelial, se utilizó la **técnica aire-líquido**, para lo cual se añadió medio de cultivo QC al depósito inferior del sistema, pero no al superior que se expuso directamente al aire. Esta técnica aire-líquido se mantuvo durante 15 días más.

Todo el proceso descrito se muestra de forma esquemática en la figura 58.

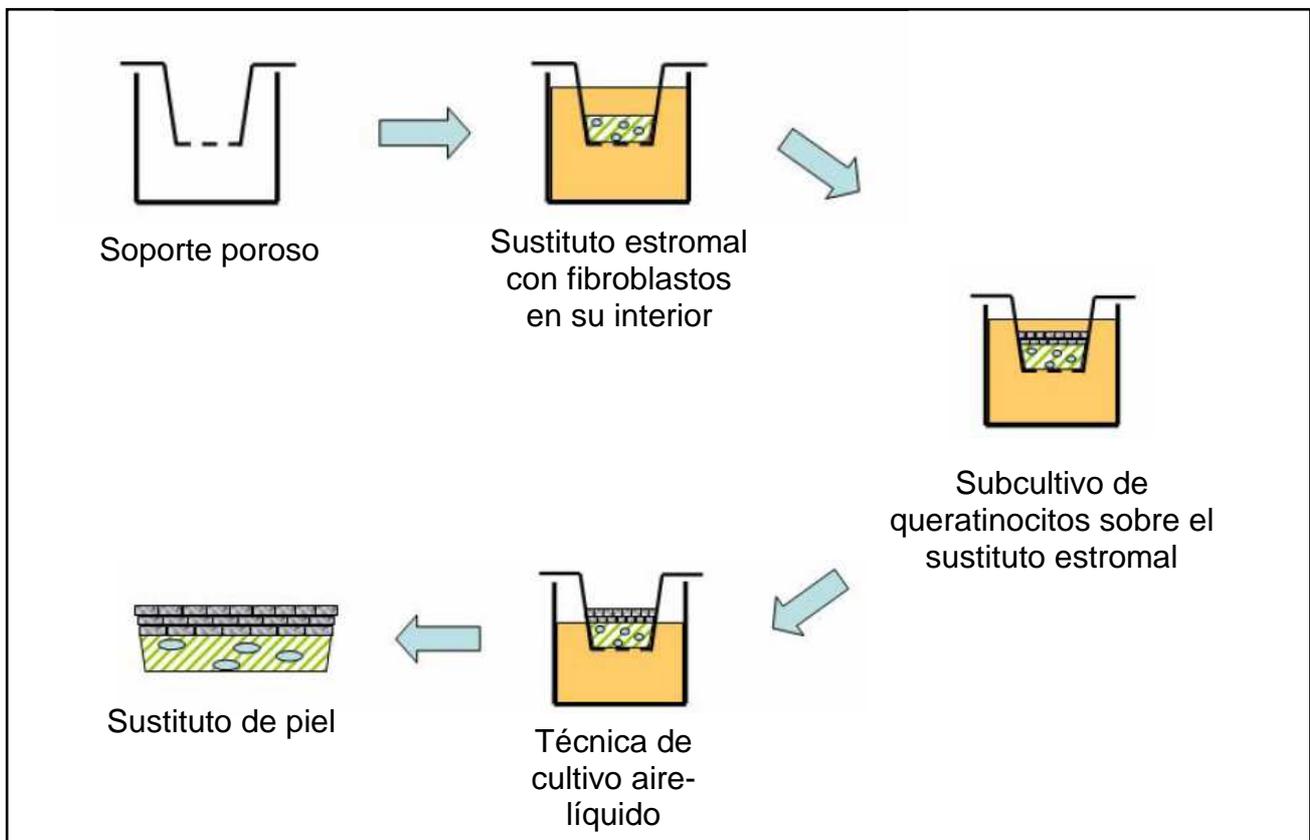


Figura 58. Elaboración de sustitutos de mucosa oral utilizando una técnica secuencial sobre sistemas de cultivo Transwell®.

6. MÉTODO ANESTÉSICO Y QUIRÚRGICO

La evaluación *in vivo* de los sustitutos de piel humana se llevó a cabo en la Unidad de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada, utilizando ratones atímicos desnudos e inmunodeficientes de seis semanas de vida (Fox 1^{nu/nu} *immunodeficient athymic mice*, Harlan, USA), los cuales exigían que el entorno fuera estéril, así como el pienso, agua y todo el material que se pusiera en contacto con los animales. También a la hora de la manipulación era necesario mantener todas las condiciones de esterilidad con la utilización de guantes y batas estériles, así como mascarilla y gorro. Los animales se controlaron dentro de **cámaras de flujo laminar** estéril, las cuales mantenían adecuados niveles de temperatura y humedad (figura 59). Las intervenciones fueron realizadas dentro de cabinas de seguridad biológica en un área quirúrgica específica, con paños y material quirúrgico esterilizado (figura 60).

En cuanto a la técnica anestésica (figura 61) se utilizó el siguiente protocolo:

- Atropina 0,05 mg subcutánea por kg peso del ratón.
- Calmoneosan[®] (acepromacina) 1 mg intraperitoneal por kg peso del ratón.
- Imalgene[®] (ketamina) 150mg intraperitoneal por kg peso del ratón.

La técnica quirúrgica consistió en una incisión en la región dorsal del animal (figura 62) con lo que se consiguió extirpar un colgajo de piel de morfología cuadrangular de aproximadamente 1,5 cm x 1,5 cm de dimensiones (figura 63). El colgajo era de piel total por lo que incluía tejido celular subcutáneo, el cual se reseco hasta la fascia de la musculatura paravertebral, respetando ésta. Posteriormente, se colocó el constructo de piel artificial humana sobre el área del defecto cutáneo del ratón (figura 64). Se fijó a la piel mediante sutura cutánea con puntos simples de seda de 4/0 (figura 65), colocándose finalmente una lámina transparente de plástico poroso estéril fijada con puntos de seda 4/0 para proteger el implante (figura 66).

Para valorar el resultado clínico de los injertos de piel generada mediante ingeniería tisular, se procedió a la evaluación macroscópica diaria de los animales, determinándose los siguientes parámetros en cada uno de los casos:

- Tamaño del injerto.
- Evolución de la herida: Signos de cicatrización, granulación, fenómeno de contracción de la herida, etc.
- Presencia de complicaciones: hemorragia, signos de infección, dehiscencia, etc.
- Presencia de costras, exudados, etc.

Para su análisis histológico, los animales se sacrificaron tras 10, 20, 30 ó 40 días de evolución utilizando una sobredosis de anestésicos en inyección intraperitoneal.



Figura 59. Cámaras de flujo laminar aisladas en el animalario de la Unidad de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada.



Figura 60. Área de intervención quirúrgica dentro de una cabina de seguridad biológica en la Unidad de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Granada.



Figura 61. Inyección intraperitoneal del anestésico.

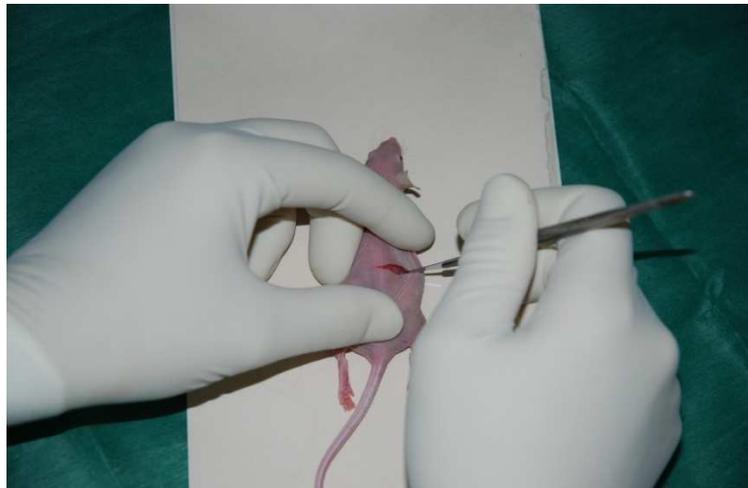


Figura 62. Incisión en el dorso del ratón con bisturí nº11.



Figura 63. Extirpación de un fragmento de piel en el dorso.



Figura 64. Implantación de los sustitutos de piel (constructos) en el dorso del animal.



Figura 65. Fijación del constructo mediante puntos simples.



Figura 66. Colocación de un plástico estéril de protección.



7. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL

7.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

Para el análisis de los tejidos mediante microscopía óptica, tanto las muestras control como los constructos de piel artificial se fijaron en formaldehído al 4% tamponado y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%). A continuación, el etanol se sustituyó por xileno y las muestras fueron incluidas en bloques de parafina. Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 4 μm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico mediante el microscopio óptico.

7.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Para el estudio de los tejidos mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C durante 4-6 horas, lavándose a continuación dos veces en tampón fosfato 0,1 M (pH 7.2) a 4°C. Posteriormente, las muestras se incluyeron en resina de Spurr durante 24 h a 4°C, utilizando como agente intermedio el óxido de propileno. Tras este periodo de tiempo, se procedió a la polimerización de la resina durante 2 h a 60°C. Finalmente, se realizaron cortes ultrafinos de 100 nm de espesor de las muestras incluidas en resina, utilizando para ello un ultramicrotomo Reichert Ultracut.

El montaje de las secciones ultrafinas se realizó sobre rejillas de cobre de malla 300 y teñidas con acetato de uracilo al 2% en agua destilada durante 10 minutos y citrato de plomo durante 5 min, de acuerdo con la metodología descrita por Reynolds (1963).

La observación se llevo a cabo con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 (Oberkochem, Alemania).

7.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Para el análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de barrido, las muestras se fijaron, lavaron y deshidrataron como se describió para microscopía electrónica de transmisión. Tras la fijación, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 95 y 100%), desecándose por completo mediante el método del punto crítico (Fernández-Segura, 1999). Este método consiste en la sustitución de la acetona tisular, junto con cualquier resto de agua que pudiese quedar en las muestras, por CO₂ líquido en frío. A continuación, el CO₂ es evaporado a baja presión, aumentándose progresivamente la temperatura, hasta que la muestra queda desecada por completo. Una vez desecados, los tejidos fueron recubiertos por átomos de oro y paladio y analizados en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 utilizando el modo de alto vacío.

8. INMUNOFLUORESCENCIA

La detección de proteínas específicas de citoqueratinas, involucrinas y filagrinas humanas se llevó a cabo utilizando secciones transversales de 4 μm de espesor de los diferentes tejidos incluidos en parafina (controles de piel normal y muestras de piel artificial obtenidas mediante ingeniería tisular e implantadas en ratones atímicos).

Para llevar a cabo la inmunofluorescencia, las muestras tisulares seccionadas y depositadas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina se desparafinaron en xileno, se lavaron en alcohol y se rehidrataron con agua. A continuación, se preincubaron durante 20 minutos en una solución de albúmina sérica bovina al 2% con un 10% de suero de caballo en PBS, utilizándose posteriormente esta misma solución para diluir los diferentes anticuerpos primarios, incubándose las muestras durante 2 h a 37°C con estos anticuerpos. Las diluciones utilizadas para los anticuerpos primarios se muestran en la tabla 4. Tras ello, se lavaron las muestras en PBS y se aplicó durante una hora un anticuerpo secundario anti-anticuerpo de ratón o anti-anticuerpo de conejo marcado con un pigmento fluorescente (FITC o Cy3), lavándose con PBS a continuación. Tras contrateñir los núcleos con DAPI, se cubrieron las muestras con cubreobjetos de vidrio y se analizaron las mismas en un microscopio fluorescente Nikon Eclipse 90i.

La evaluación de los resultados se realizó determinando la presencia de señales positivas a dos niveles:

1- **Localización** de la señal de expresión:

- *homogénea*, si existe expresión de la proteína en todo el espesor del epitelio,
- *basal*, si existe expresión a nivel del estrato basal,
- *suprabasal*, incluyendo en ésta el estrato espinoso, granuloso, hialino y córneo.

2- **Intensidad** de expresión de la proteína:

- (-) Nula expresión,
- (+) levemente positiva,
- (++) positiva,
- (+++) fuertemente positiva.

Tipo de Anticuerpo	Anticuerpo	Dilución	Origen	Laboratorio Comercial	Referencia
Primarios	Anti-Pancitoqueratina	Prediluido	Mouse	Master diagnostica, Granada, España.	001607QD
	Anti-CK1	1:500	Rabbit	Sigma	HPA017917
	Anti-CK10	Prediluido	Mouse	Master diagnostica, Granada, España.	000150QD
	Anti-involucrininas	1:500	Mouse	Sigma	I9018
	Anti-filagrininas	1:50	Mouse	ABCam	SPM181
Secundarios	Anti-mouse Ig-G	1:500		Sigma	I9137
	Anti-rabbit Ig-G	1:500		Sigma	C2306

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios usados en este trabajo y la dilución correspondiente para los ensayos de inmunofluorescencia.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS Y ELABORACIÓN DE SUSTITUTOS DE PIEL HUMANA DE ESPESOR COMPLETO

El tratamiento enzimático de las muestras de piel humana demostró ser efectivo en las muestras de biopsias que se procesaron, obteniéndose abundantes células en todos los casos. Morfológicamente estas células se observaron al microscopio óptico como elementos esféricos de pequeño tamaño (alrededor de 2 μm de diámetro) que permanecían en suspensión en el medio de cultivo durante las primeras horas posteriores a su aislamiento.

En cuanto al cultivo primario de queratinocitos resultó ser más lento que el de los fibroblastos, de manera que la expansión de las mismas se estableció de forma evidente a partir del séptimo día, observándose la presencia de pequeñas colonias o islas constituidas por 4 ó 5 células redondeadas, con citoplasma muy poco refringente (figura 67 A). Estas colonias, esparcidas a lo largo de todo el cultivo, presentaron un diámetro medio de 1 mm y fueron aumentando progresivamente de tamaño hasta hacerse confluentes llegando a ocupar toda la superficie del frasco de cultivo después de 21 días (figura 67 C y D). En este momento, el análisis mediante microscopía óptica, pone de relieve la existencia de una población celular continua de queratinocitos, configurando una monocapa celular en la superficie de los frascos de cultivo, constituida por células irregularmente poliédricas con un núcleo voluminoso en el que se pueden apreciar hasta tres nucleolos y un citoplasma rico en retículo endoplásmico de consistencia hialina, así como las uniones intercelulares (figura 67).

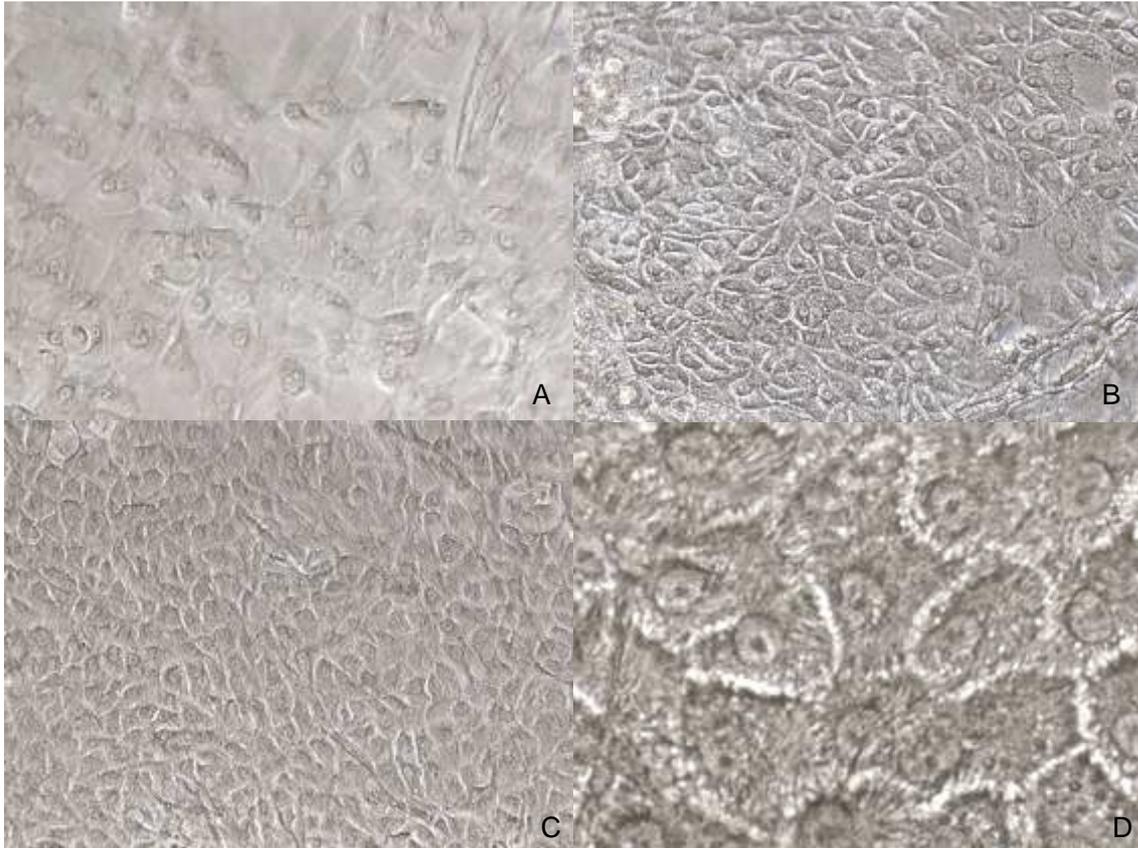


Figura 67. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de cultivos de queratinocitos. Evolución de la confluencia. A) Cultivos de queratinocitos a los 7 días, se está formando una isla de células epiteliales (M.O. 100x). B) Cultivos de queratinocitos a los 15 días (M.O. 100x). C) Cultivos de queratinocitos a los 21 días, se observa la confluencia de las células (M.O. 100x). D) Detalle de cultivo de queratinocitos a los 21 días (400x)

El cultivo primario de fibroblastos mostró un crecimiento celular muy rápido a partir de los primeros días (figura 68). A las 24h, la mayor parte de las células se encontraban adheridas al fondo del frasco de cultivo y comenzaron a emitir pequeñas prolongaciones a modo de pseudópodos (Figura 68 A). El crecimiento de los fibroblastos se evidenció entre las 48 y 72 horas de cultivo (Figura 68 B), configurándose en el 5º día (Figura 68 C) una trama celular formada por células con abundantes nucleolos, señal de alto metabolismo celular, y con largas prolongaciones, que acaba, a partir del 7º día, por convertirse en una masa de células fusiformes que ocupaban toda la superficie del cultivo (cultivos confluentes) y que rellenaban prácticamente todo el frasco de cultivo (Figura 68 D).

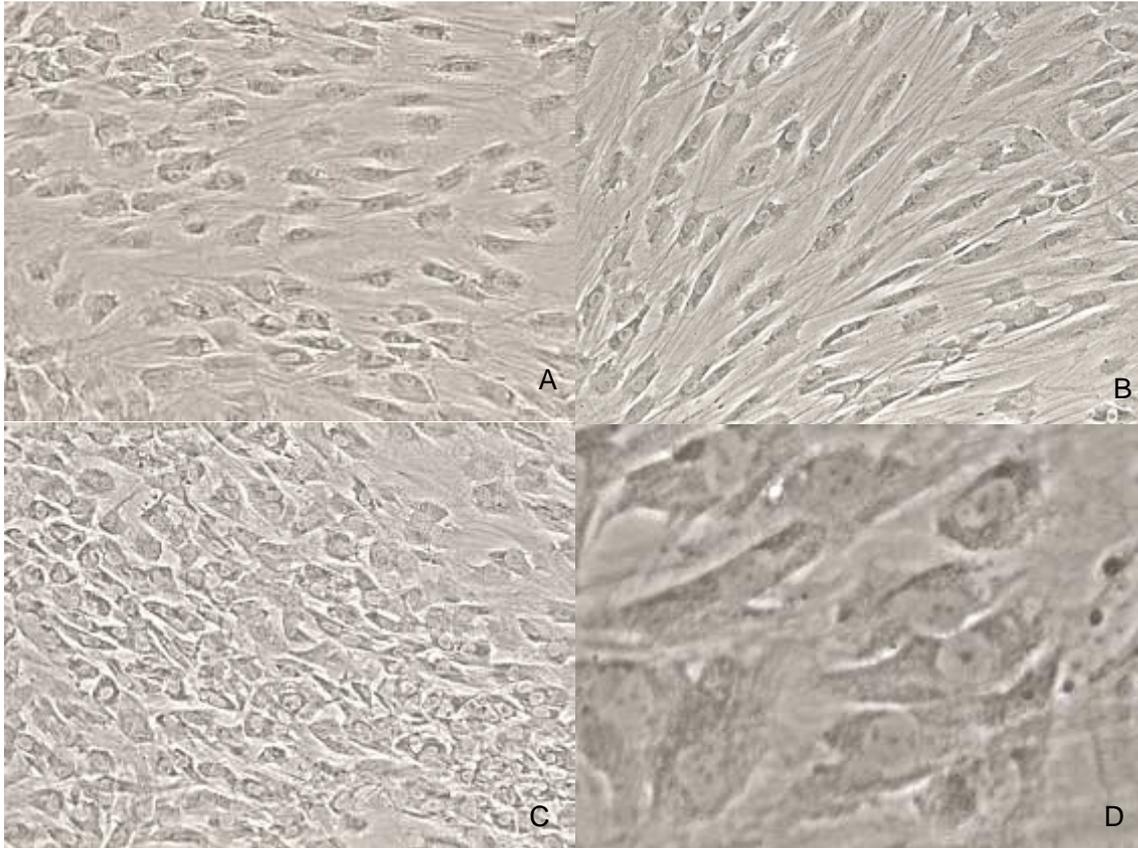


Figura 68. Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases de cultivos de fibroblastos (M.O. 100x). Evolución de la confluencia. A) Cultivos de fibroblastos a las 24h (M.O. 100x). B) Cultivos de fibroblastos a las 48h (M.O. 100x). C) Cultivos de fibroblastos a los 5 días, se observa la confluencia de las células (M.O. 100x). D) Detalle de cultivo de fibroblastos a los 7 días con pseudópodos y gránulos, así como la presencia de abundantes nucleolos, señal de alto metabolismo celular (M.O. 400x)

Tras el cultivo primario, se elaboraron sustitutos o equivalentes de piel de espesor completo (Figura 69), los cuales se desarrollaron siguiendo la técnica de **cultivo secuencial** expuesta en el apartado Material y Métodos de esta Tesis Doctoral. Para asegurar una adecuada inmersión del cultivo, así como una correcta diferenciación y estratificación del epitelio del constructo, se utilizó una técnica de cultivo en **interfase aire-líquido**, para lo cual se emplearon soportes porosos sobre los que se logró un adecuado crecimiento y adhesión a los mismos de las células epiteliales, lo que sugiere que los nutrientes y factores de crecimiento del medio de cultivo cruzaron de forma efectiva la membrana y migraron hacia el compartimiento superior de los soportes porosos, donde se encontraban las células, evitando al mismo tiempo la migración celular hacia otro compartimento.



Figura 69. Sustituto de piel elaborado en el laboratorio dentro de un sistema de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0,4 μm (Costar, Corning, Nueva York, EEUU).

Los queratinocitos mantenidos en cultivo se subcultivaron en la superficie de geles de fibrina y agarosa que presentaron una buena consistencia a lo que se unió una adecuada resistencia lo cual facilitó el manejo y la manipulación de los mismos. Los fibroblastos mostraron adecuados índices de proliferación en el interior de los sustitutos estromales. Después de 2 días de cultivo, los queratinocitos incorporados en la superficie de los geles de fibrina y agarosa mostraron una morfología elongada o estrellada, apareciendo extendidos por toda la superficie de la malla estromal. En ninguno de los casos se apreció contracción o pérdida de volumen de los geles de fibrina y agarosa después de generar los sustitutos de piel.

2. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL DE ESPESOR COMPLETO

La evaluación de los constructos de piel artificial mediante implante en la zona dorsal de los ratones inmunodeficientes se pudo realizar con éxito en todos los casos, apreciándose una excelente tolerancia de todos los animales al proceso anestésico-quirúrgico.

En lo que respecta a la evolución temporal del injerto, todos los animales respondieron adecuadamente al implante del mismo, existiendo una progresiva integración de éste, tal como se describe a continuación:

- A los **seis días** tras la colocación del implante, la mayoría de los ratones aún conservaban el plástico protector del injerto, a través del cual se podía apreciar que el ratón había comenzado el proceso de cicatrización, ya que presentaba tejido de granulación y cicatricial a este nivel. En este momento, todos los animales presentaban un exudado amarillento sobre el constructo implantado (figura 70 A).
- A los **diez días**, los animales presentan una lesión costrosa, dura, de color anaranjado, sobreelevada, cuyas dimensiones eran 1 cm x 1 cm. De igual modo, en este momento se apreció una disminución de tamaño del injerto debido a la contracción de los bordes de la herida quirúrgica, fenómeno habitual en la fase de cicatrización correcta correspondiente con esta fecha (figura 70 B).
- A los **veinte días** del injerto, se apreciaba en el área del implante un fenómeno de contracción importante, delimitando la región del implante a unos 6 x 8 mm, presentando una piel algo más deprimida, de coloración rosado (más intenso que la piel circundante) con una costra central mínima, por lo que la herida está totalmente cerrada, sin dehiscencias, ni signos de infección ni otras complicaciones (figura 70 C).
- A los **treinta días** observamos igualmente una depresión del área de implante con contracción de bordes de la herida algo mayor que en el caso anterior y con una coloración cutánea muy similar a la de su alrededor sin presencia de costras, dehiscencias ni otras complicaciones (figura 72).
- A los **cuarenta días** postimplante, se aprecia un correcto cierre del defecto cutáneo con presencia de una mínima cicatriz con depresión central de apenas 6-8 mm, sin complicaciones apreciables (figura 73).



Figura 70 A. Implante a los seis días



Figura 70 B. Implante a los diez días. A la derecha detalle de la costra formada.



Figura 70 C. Implante a los veinte días



Figura 72. Implante a los treinta días



Figura 73. Implante a los cuarenta días

3. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL DE ESPESOR COMPLETO

El análisis de los constructos de piel se realizó tanto mediante microscopía óptica como mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión, según se describe a continuación.

3.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

La evaluación de los sustitutos de piel artificial reveló que la estructura de éstos dependía directamente del tiempo de evolución de cada constructo, así como de la localización del mismo (constructos *ex vivo* o constructos *in vivo*). A modo esquemático, se muestra la estructura de los distintos tejidos en la figura 73.

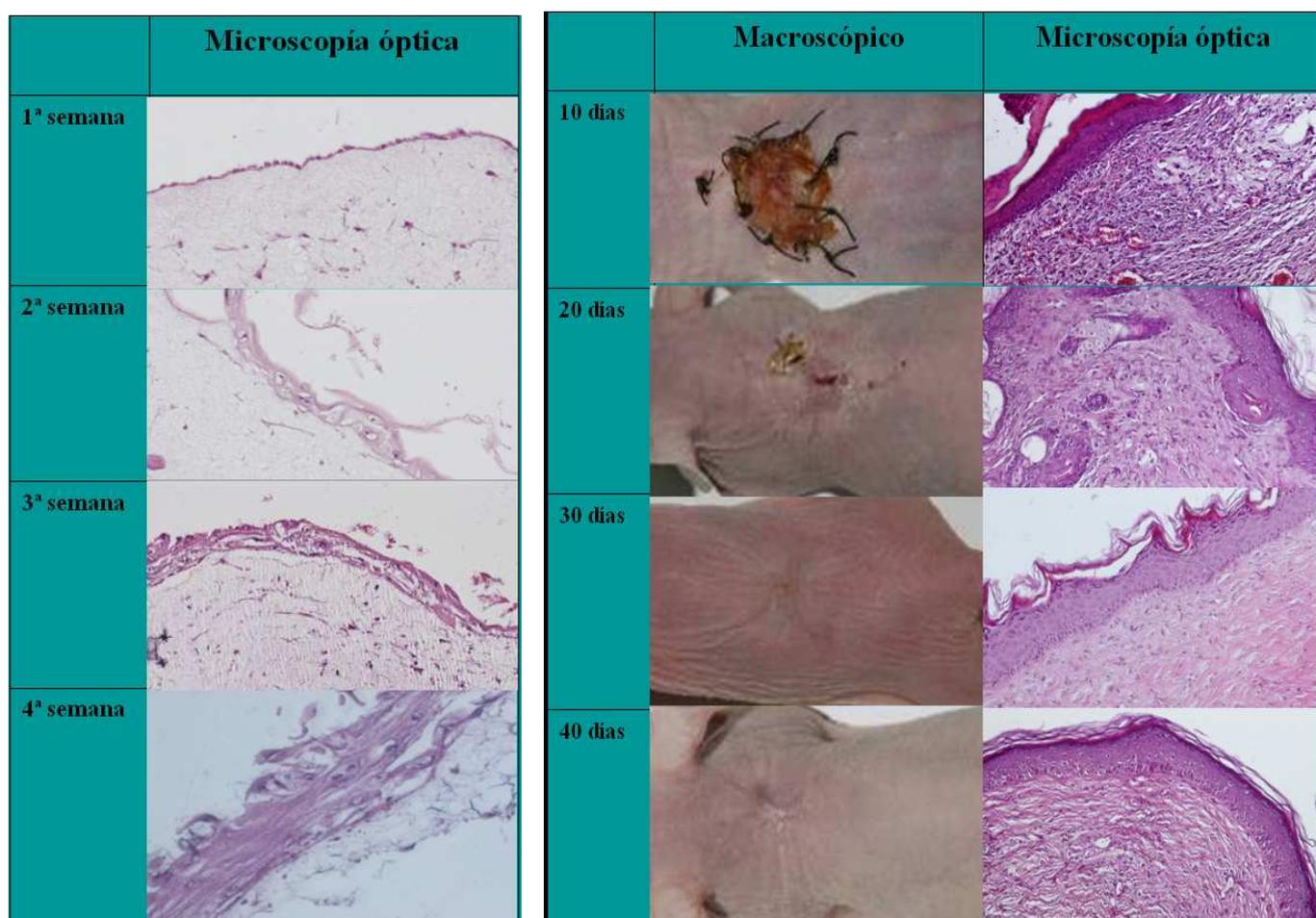


Figura 73. A la izquierda la tabla muestra la evolución del constructo de piel obtenida a partir de ingeniería tisular en la 1ª, 2ª, 3ª y 4ª semanas observados con microscopía óptica. A la derecha se muestra la evolución a nivel macroscópico y microscopía óptica de los implantes de piel artificial a los diez, veinte, treinta y cuarenta días tras la implantación del mismo sobre el dorso del ratón atímico

3.1.1. Evaluación ex vivo:

El análisis *ex vivo* del constructo generado en laboratorio mediante microscopia óptica mostró la formación de un adecuado sustituto de la piel, el cual presentaba escasos niveles de diferenciación tisular. En concreto, el análisis de muestras mantenidas en cultivo durante cuatro semanas reveló lo siguiente:

- Los constructos evaluados a la **semana** de su elaboración presentaron una gruesa capa estromal en la que existe una abundante población de fibroblastos en proliferación. Sobre la superficie de este sustituto estromal, se apreció una única capa de células epiteliales (figura 74).
- En la **segunda semana** de desarrollo en cultivo, se observó un mayor número de células en el estroma, así como una estratificación inicial del epitelio, formándose una o dos hileras de queratinocitos en su superficie (figura 75).
- A partir de este momento continúa la proliferación de queratinocitos, observándose en la **tercera semana** una nueva hilera de células en el epitelio (figura 76).
- En la **cuarta semana** existía un total de 3 a 4 hileras de células, pero no fue posible distinguir los distintos estratos del epitelio. No se apreciaron papilas, anejos cutáneos o estrato córneo (figura 77).

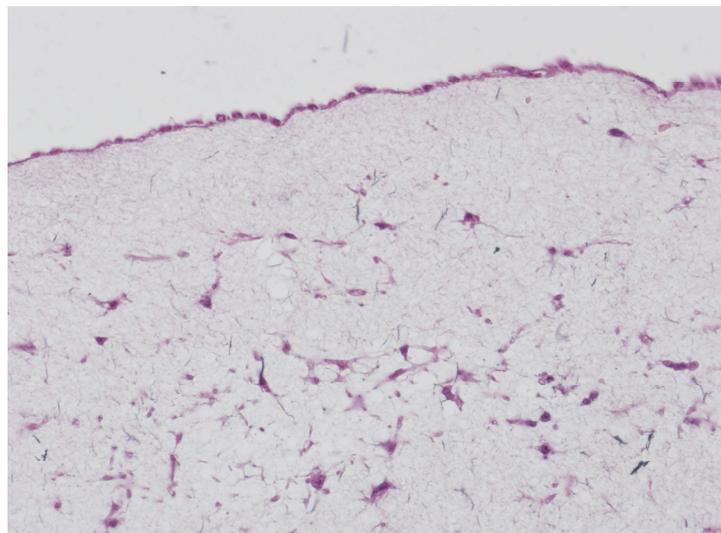


Figura 74. Constructo 1ª semana (M.O. 100x)

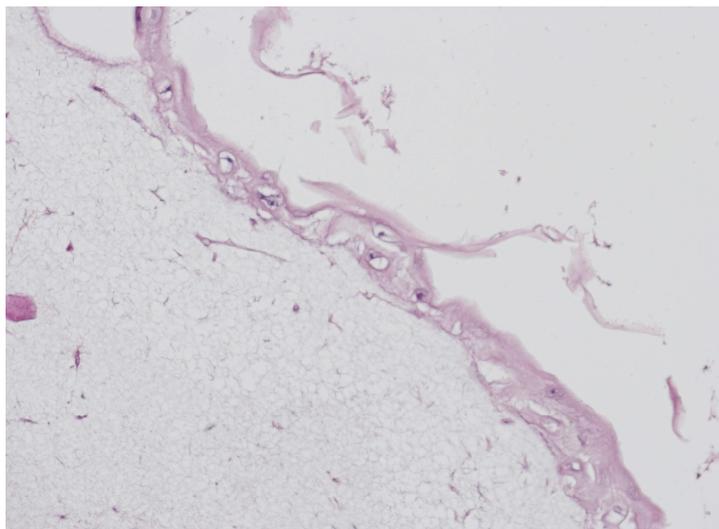


Figura 75. Constructo 2ª semana (M.O. 100x)

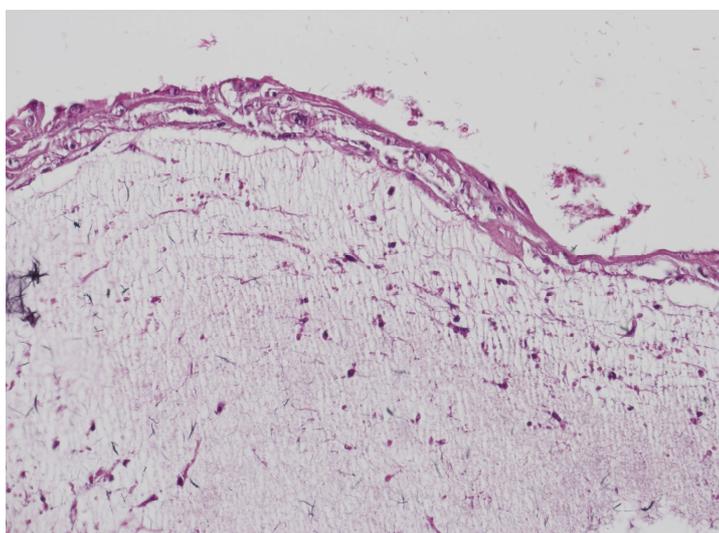


Figura 76. Constructo 3ª semana (M.O. 100x)

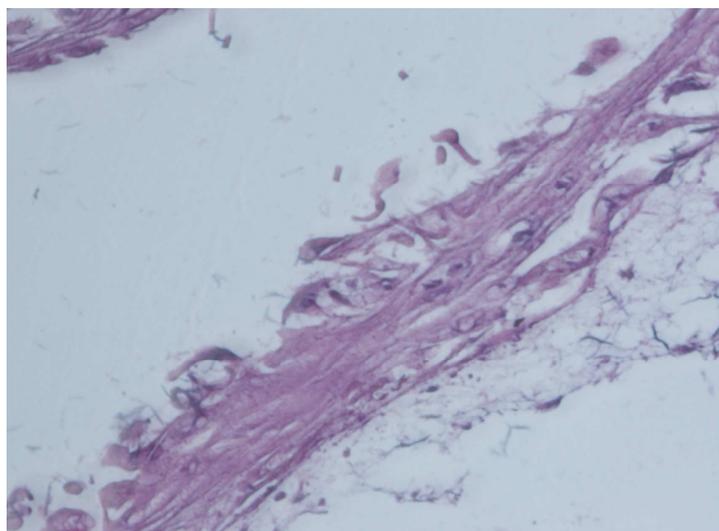


Figura 77. Constructo 4ª semana (M.O. 200x)

3.1.2. Evaluación *in vivo*:

Al contrario de lo que se observó en los constructos mantenidos en cultivo, los sustitutos de piel implantados en un modelo animal presentaron muy adecuados niveles de estructuración y diferenciación tisular, tal como se describe a continuación.

- En el **día diez** (figura 78) tras haber realizado la implantación del constructo en el ratón se pudo observar la presencia de una dermis muy rica en células y con algunas fibras y material extracelular desorganizado. Destaca la presencia de infiltrados leucocitarios en la dermis, así como la neoformación de un tejido vascular importante comprendiendo arteriolas, vénulas y capilares. A nivel epitelial, se observan entre tres y cinco capas celulares, no apreciándose de forma clara los estratos espinoso y granuloso, aunque sí el basal y un estrato córneo incipiente. De igual modo, se evidencia una línea dermoepidérmica homogénea, aunque sin la presencia de papilas ni anejos cutáneos.
- Tras **veinte días** del implante en los animales atímicos (figura 79), se apreció una disminución en la concentración de fibroblastos y leucocitos de la dermis, así como un aumento significativo del contenido fibrilar en la dermis. De igual modo, se observó la existencia de entre cuatro y seis capas de queratinocitos epidérmicos, distinguiéndose en este momento cuatro estratos diferenciados: basal, espinoso, granuloso y córneo, siendo el estrato espinoso el menos evidente de los cuatro. Al igual que a los diez días de evolución, se aprecia una línea dermoepidérmica homogénea, aunque sin la presencia de papilas ni anejos cutáneos.
- En la muestra del **día treinta** (figura 80) se observó un mayor contenido fibrilar en la dermis que días anteriores, apreciándose ya gran cantidad de estratos en el epitelio, existiendo entre seis y nueve capas de queratinocitos, con una clara diferenciación de estratos epiteliales (basal, espinoso, granuloso y córneo). Tampoco se apreciaron papilas ni anejos cutáneos.
- El **día cuarenta** de evolución *in vivo* (figura 81), se observó un mayor contenido en fibras en el estrato dérmico, estabilizándose el número de capas de queratinocitos del epitelio (entre seis y nueve). No se evidenciaron papilas en unión dermoepidérmica ni anejos cutáneos.

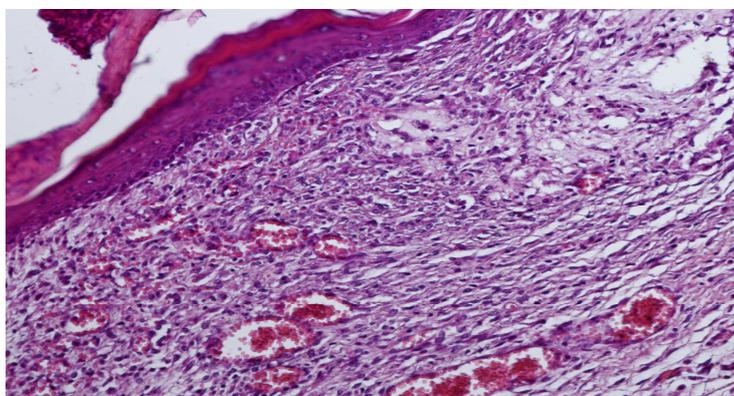


Figura 78. Implante día diez (M.O. 100x).

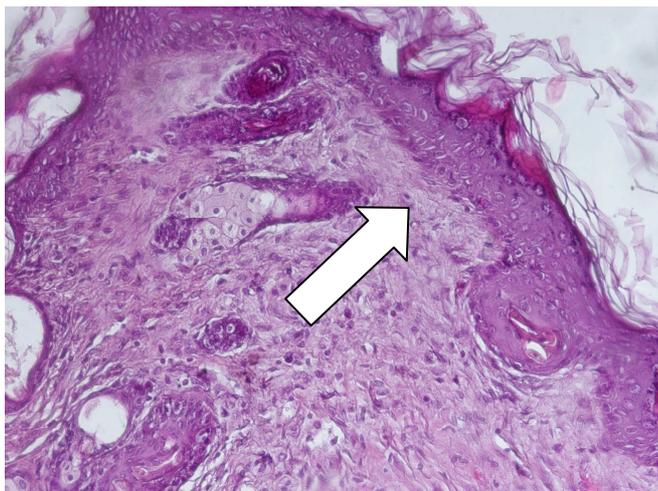


Figura 79. Implante día veinte (M.O. 100x) La flecha marca la transición entre la piel del ratón y la piel artificial implantada

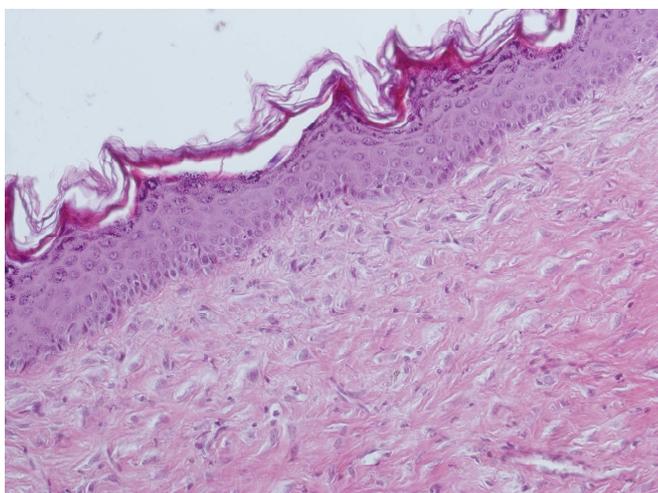


Figura 80. Implante día treinta (M.O. 100x)

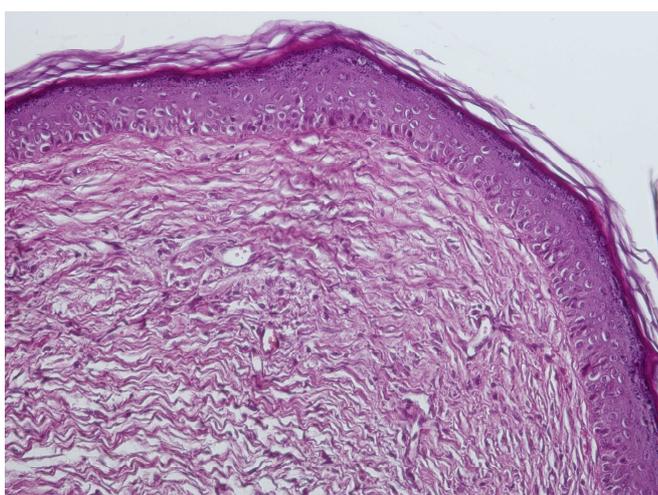


Figura 81. Implante día cuarenta (M.O. 100x)

3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

El análisis ultraestructural de los tejidos implantados en los ratones inmunodeficientes confirmó la adecuada diferenciación de los tejidos implantados, aunque el nivel diferenciativo fue directamente dependiente del tiempo durante el cual el injerto se mantuvo en el animal.

- Las muestras evaluadas *in vivo* tras **diez días** del injerto revelaron la existencia de un estroma dérmico artificial muy rico en células, incluyendo numerosos fibroblastos y células endoteliales de capilares sanguíneos (figura 82), existiendo muy pocas fibras colágenas. De hecho, la mayor parte de la matriz extracelular de la dermis estaba ocupada por fibras de fibrina y por agarosa (figura 83). A nivel del epitelio, se observó la formación de uniones intercelulares tipo desmosoma (figura 88), así como la presencia de abundantes gránulos y filamentos de queratina en el interior de los queratinocitos (figura 84).

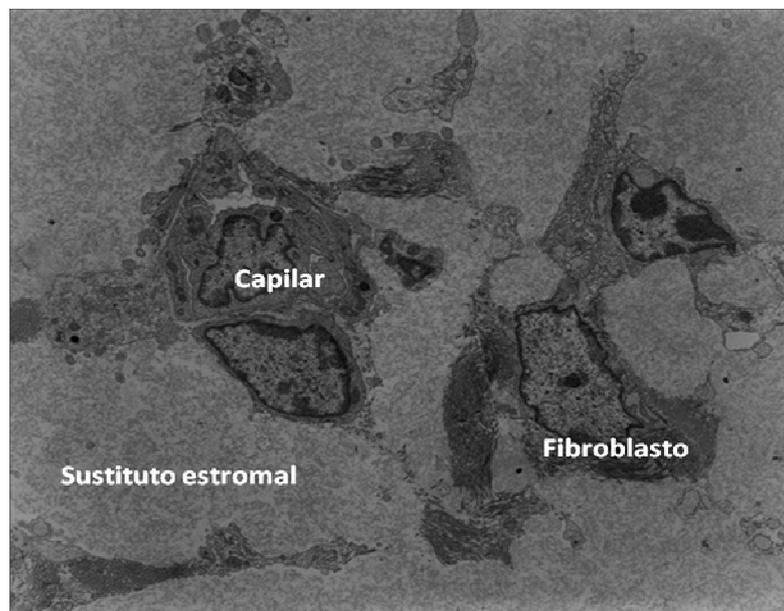


Figura 82. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia la dermis a los diez días con la presencia de fibroblastos y células endoteliales formando capilares sanguíneos

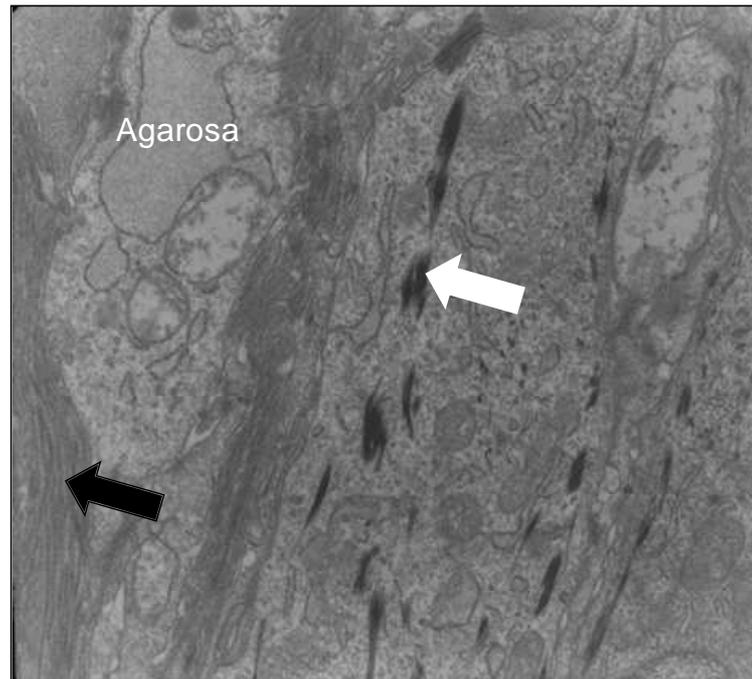


Figura 83. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia la dermis a los diez días con la presencia de fibrina (flecha blanca), restos de agarosa y filamentos de colágeno (flecha negra)

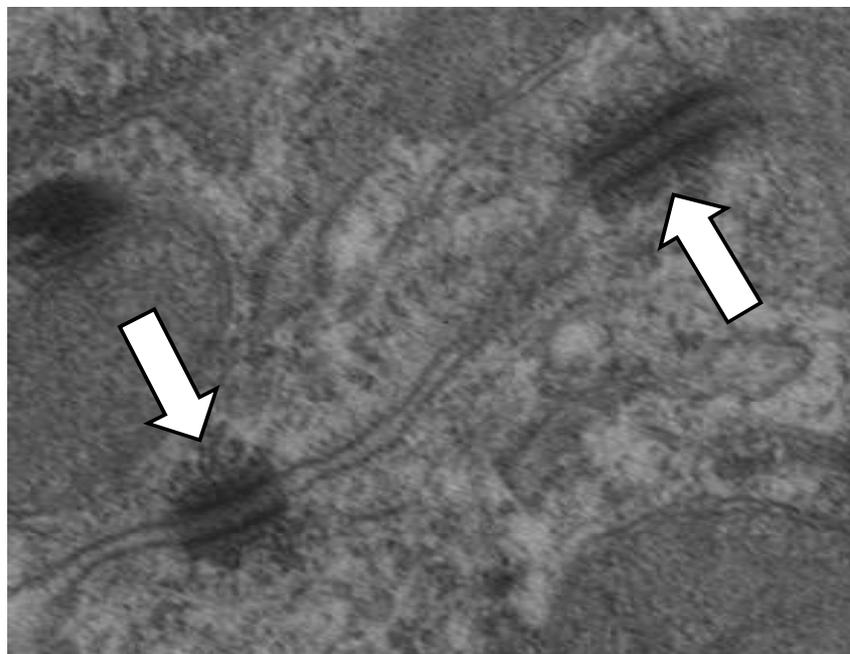


Figura 84. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia el epitelio a los diez días con la presencia de desmosomas de unión (flechas)

- A los **veinte días** del injerto, los sustitutos de piel humana implantados *in vivo* mostraron gran número de vasos sanguíneos, con la presencia de abundantes fibras de colágeno en la matriz extracelular (figura 85). Cuando se analizó el epitelio, se comprobó la existencia de alrededor de cinco capas de queratinocitos muy aplanados, los cuales presentaban abundantes gránulos y fibras intracelulares de queratina (figuras 86 y 87).

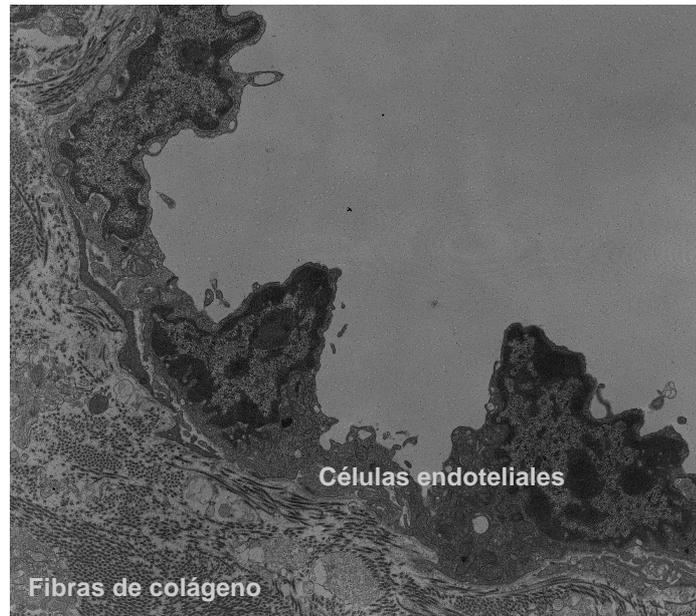


Figura 85. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia la dermis a los veinte días con la presencia de fibras de colágeno y células endoteliales de capilares sanguíneos

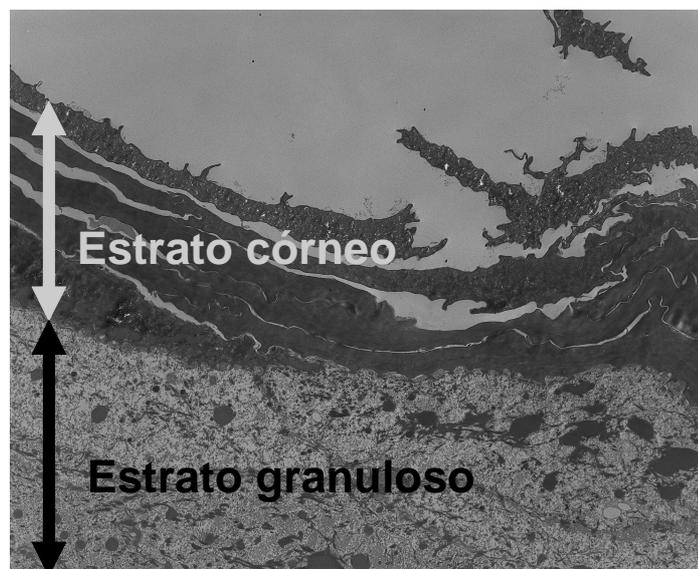


Figura 86. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia el epitelio a los veinte días con la presencia de los estratos granuloso y córneo. Los queratinocitos del estrato granuloso presentan numerosos gránulos y filamentos de queratina en su interior

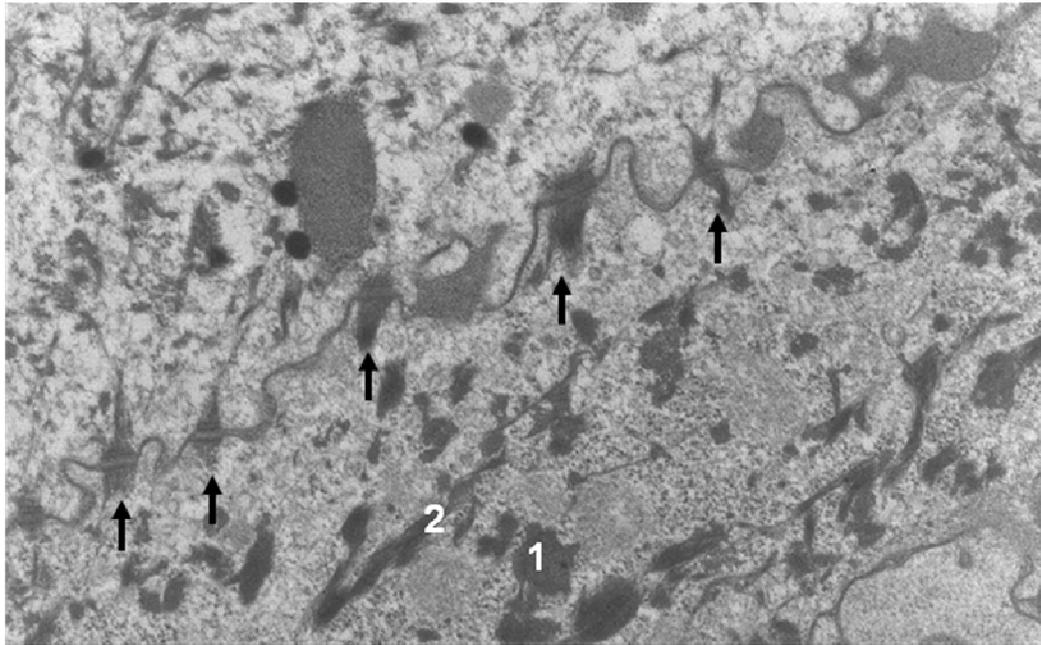


Figura 87. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia el epitelio a los veinte días con la presencia de desmosomas (flechas) y gránulos (1) y filamentos de queratina (2) en el interior de los queratinocitos

- Cuando se evaluaron los constructos mantenidos durante **treinta días** en el animal de experimentación, se comprobó la coexistencia de las fibras de colágeno neoformadas en el sustituto estromal junto con las fibras de fibrina en proceso de degradación por parte de los fibroblastos (figura 88). Igualmente, en el epitelio se apreció un gran número de fibras de queratina y queratohialina, especialmente en la capa granulosa de la epidermis (figura 89).

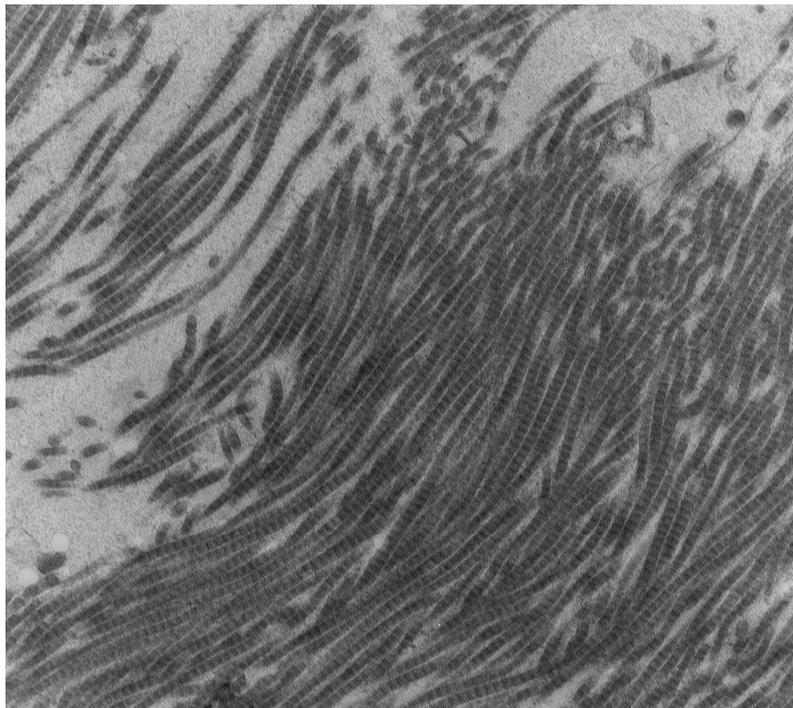


Figura 88. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia la dermis a los treinta días con la presencia de abundantes fibras de colágeno

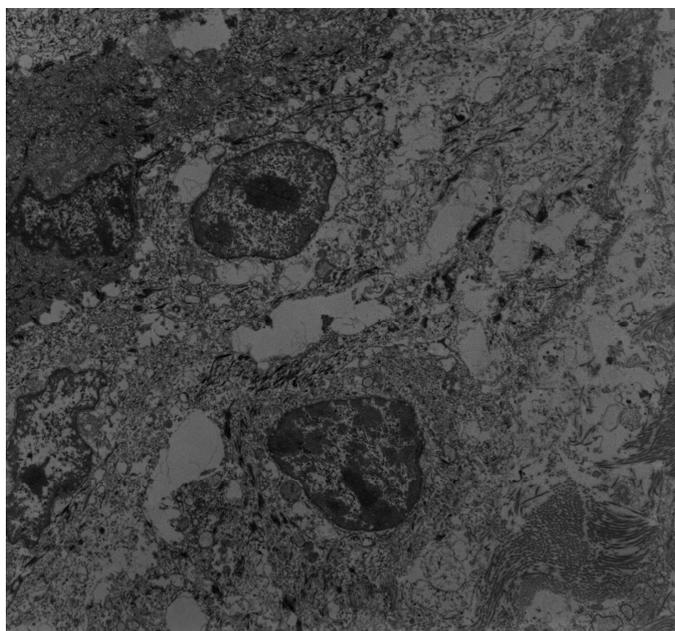


Figura 89. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia el epitelio a los treinta días con la presencia de desmosomas y queratina en el interior de los queratinocitos

- Finalmente, los constructos mantenidos *in vivo* durante **cuarenta días** mostraron al microscopio electrónico de transmisión la formación de una abundante matriz extracelular formada fundamentalmente por fibras de colágeno en distintas direcciones del espacio. Entre estas fibras se aprecian imágenes correspondientes a restos de agarosa, pero no de fibrina (figura 90). Respecto al epitelio, las muestras presentaron más de diez capas de queratinocitos (figura 91), los cuales formaron estratos muy bien organizados, apreciándose abundantes desmosomas y prolongaciones celulares en el estrato espinoso y gránulos de citoqueratina en distintos estratos (figura 92).

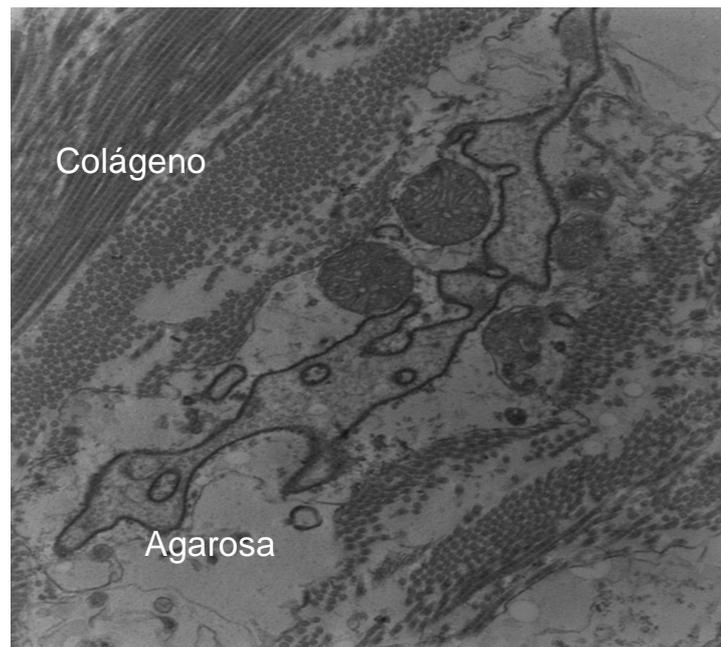


Figura 90. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia la dermis a los cuarenta días con la presencia de fibras de colágeno y agarosa

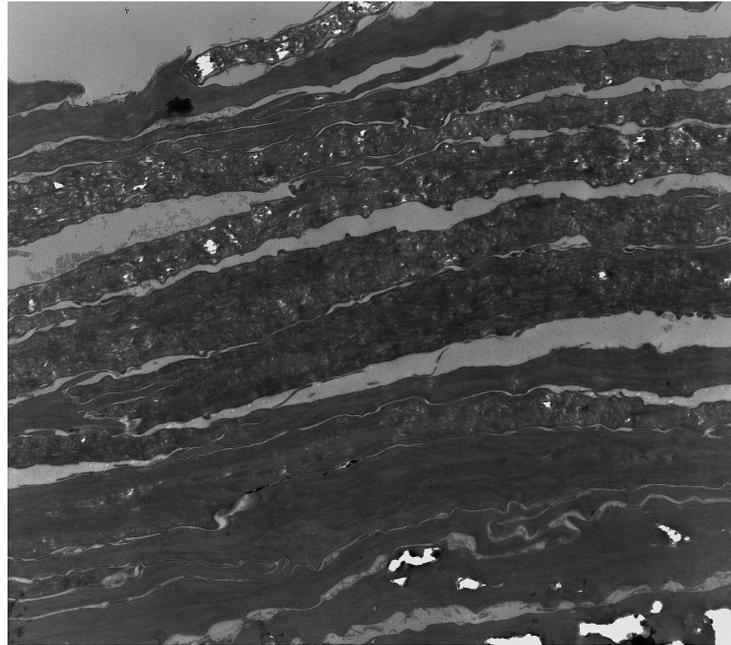


Figura 91. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia el estrato córneo a los cuarenta días con distintas capas de células llenas de queratina

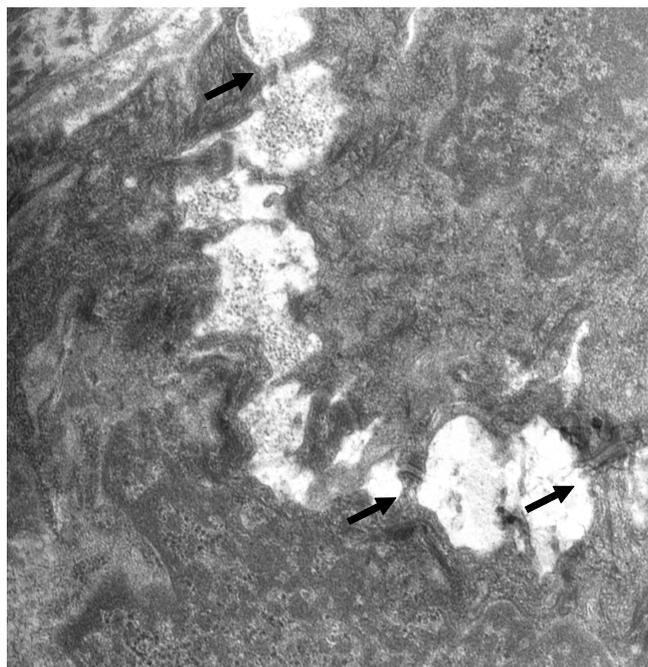


Figura 92. Piel artificial (M.E.T) donde se aprecia el epitelio a los cuarenta días con la presencia de desmosomas (flechas), así como de prolongaciones celulares y en el interior de los queratinocitos gránulos de queratina.

3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Cuando se analizaron los diferentes tejidos utilizando microscopía electrónica de barrido, se observó que la estructura de las células que recubrían al tejido artificial implantado en el ratón variaba dependiendo del tiempo durante el cual se mantuviese éste en el mismo. El análisis secuencial de la superficie de los tejidos implantados reveló lo siguiente:

- A los **diez días** tras el implante de la piel artificial, tan solo unas áreas de la superficie del constructo implantado en el ratón estaban cubiertas por células epiteliales (figura 93), existiendo áreas del estroma subyacente expuestas al exterior.
- A los **veinte días** de evolución *in vivo*, aún existen áreas de dermis artificial expuestas al exterior, evidenciándose la migración progresiva de células epiteliales a partir de islas de queratinocitos dispersas por la superficie dérmica (figura 94).
- A los **treinta días**, las muestras presentaban la mayor parte de su superficie cubierta por queratinocitos de morfología redondeada, aunque la superficie de éstos no presentaba ningún tipo de patrón superficial o estructuras secundarias de membrana (figura 95).
- A los **cuarenta días**, las células del epitelio se extendieron a lo largo de toda la superficie del constructo, presentando morfología elongada, estrellada e irregular, con gran número de microplicas y oquedades en su superficie (figura 96).

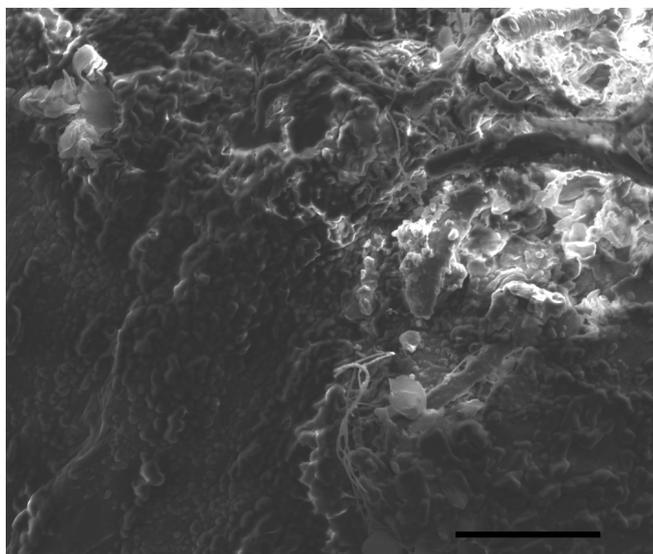


Figura 93. Piel artificial (M.E.B) donde se aprecian la dermis con los fibroblastos inmersos en un retículo de fibrina a los diez días (escala 100 μ m).

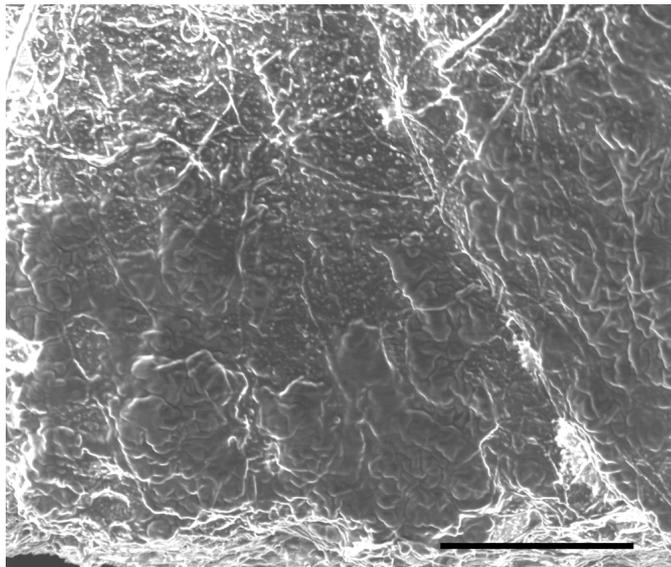


Figura 94. Piel artificial (M.E.B) donde se aprecian la dermis con los fibroblastos inmersos en un retículo de fibrina a los veinte días (escala 200 μm).

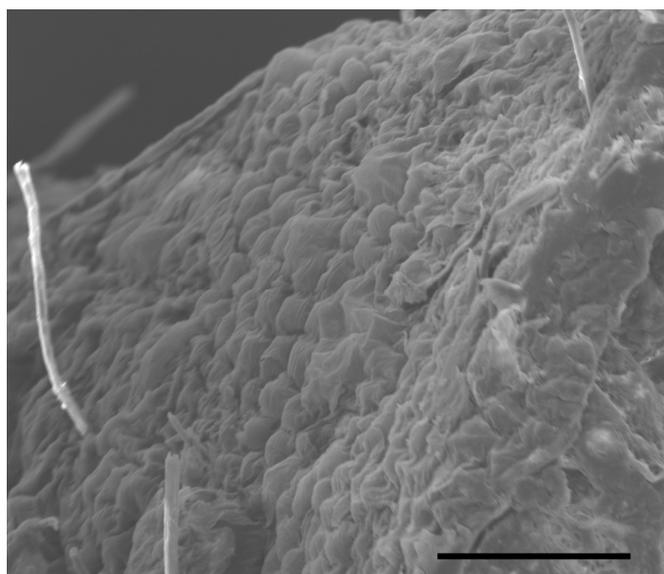


Figura 95. Piel artificial (M.E.B) donde se aprecian las células epiteliales que recubren la superficie del constructo a los treinta días (escala 100 μm).

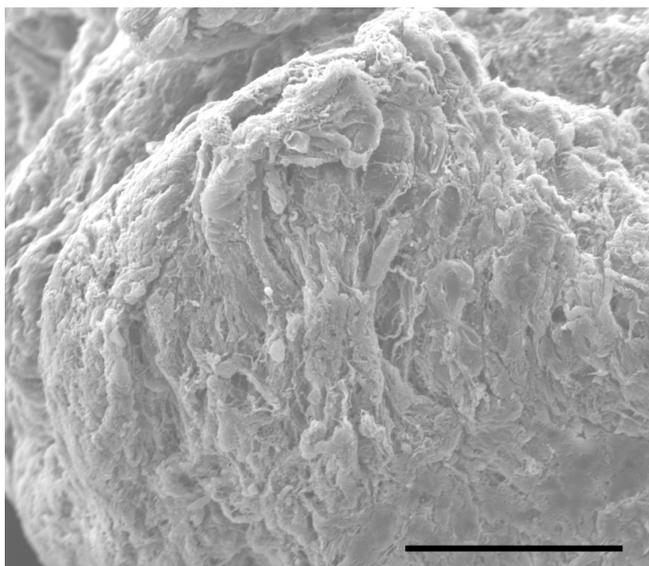


Figura 96. Piel artificial (M.E.B) donde se aprecian las células epiteliales que recubren la superficie del constructo a los cuarenta días (escala 200 μ m).

4. EVALUACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LOS SUSTITUTOS DE PIEL DE ESPESOR COMPLETO

El análisis de la expresión de citoqueratinas (pancitoqueratina, citoqueratina 1 y citoqueratina 10), filagrina e involucrina de los controles de piel humana normal y los sustitutos de piel obtenidos en el laboratorio, nos permitió determinar un patrón específico de expresión de estas proteínas para cada tipo de muestra, tal como se describirá a continuación. El resultado global de los análisis de inmunofluorescencia llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se muestra esquemáticamente en la tabla 5 y en la figura 97.

	Pancitoqueratina	CK 1	CK10	Involucrininas	Filagrininas
Control	+(B) +++(E) +(G) +++(C)	+++ (E) _{apical} +++ (G) +++ (C)	+++ (E) _{apical} +++ (G) +++ (C)	+++ (E) +++ (G) + (C)	++ (G) _{Interfase} ++ (C)
20 días	-	++ (G) ++ (C)	-	-	+ (C)
30 días	-	++ (G) +++ (C)	-	++ (C)	++ (C)
40 días	++ (E) + (G) +++ (C)	++ (E) ++ (G) +++ (C)	++ (G) ++ (C)	+ (E) + (G) +++ (C)	++ (G) ++ (C)

Tabla 5. Expresión de citoqueratinas, involucrina y filagrina en piel humana control y piel artificial implantada en el modelo animal durante veinte, treinta y cuarenta días.

(B) expresión en la capa basal del epitelio; (E) expresión en capa espinosa (G) expresión en capa granulosa; (C) expresión en capa córnea. (-) Nula expresión, (+) levemente positiva, (++) positiva, (+++) fuertemente positiva.

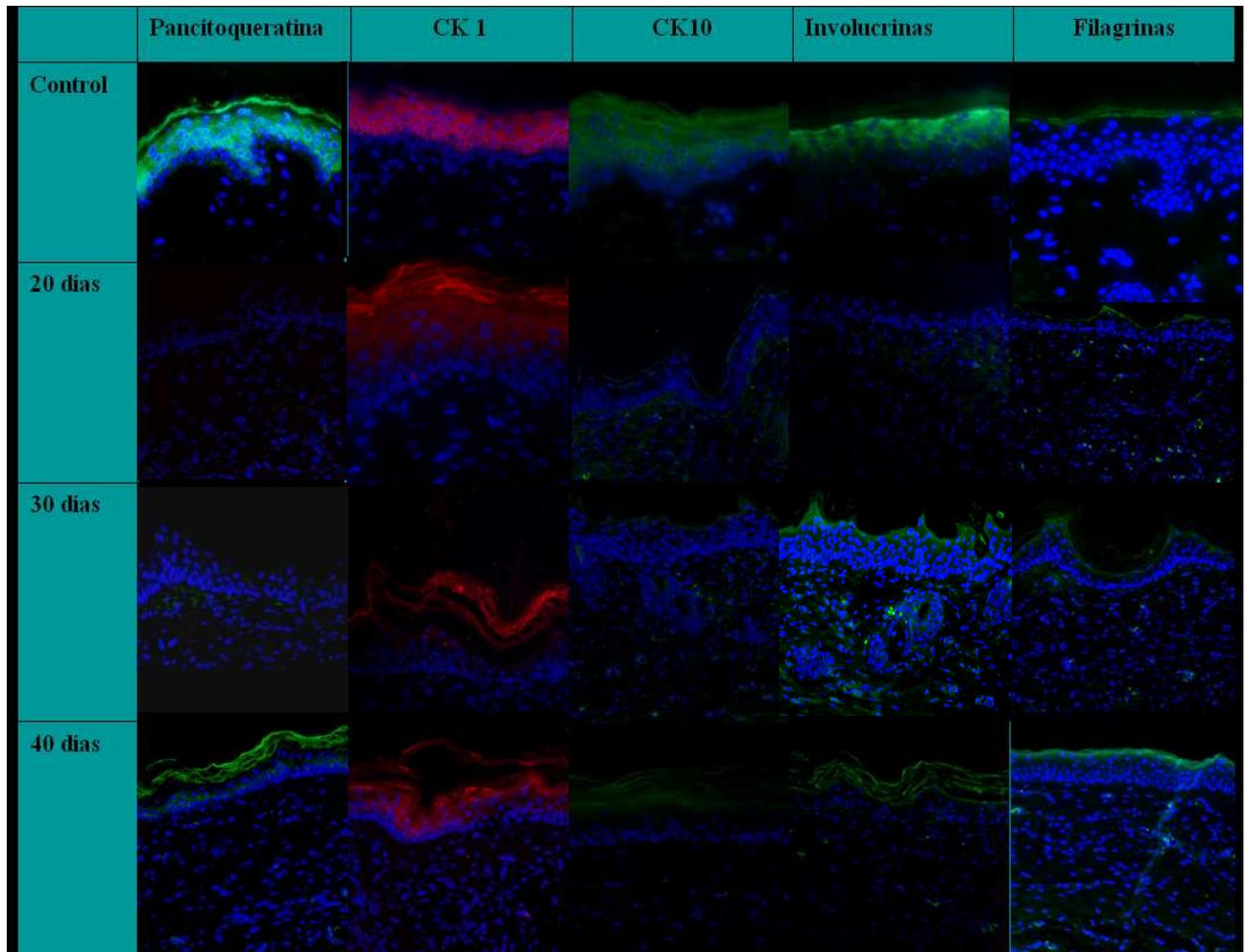


Figura 97. Análisis de inmunofluorescencia para pancitoqueratina, CK 1, CK 10, involucrina y filagrina en muestras de piel normal y de piel artificial implantada en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC o roja Cy3). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

4.1 PANCITOQUERATINA

- En primer lugar, el análisis de las muestras **control** de piel humana normal mostró la presencia de niveles intensos de expresión en todo el espesor de la epidermis, siendo ésta levemente positiva en los estratos basal y granuloso y fuertemente positiva en los estratos espinoso y córneo (figura 98).
- A los **veinte y treinta días** postimplante del sustituto de piel humana en el ratón, se observa nula expresión de las citoqueratinas reconocidas por el anticuerpo específico en todos los estratos de la piel (figura 99 y 100).
- Sin embargo, a los **cuarenta días** del implante en el animal de experimentación, se aprecia una expresión suprabasal de las citoqueratinas reconocidas por este anticuerpo, la cual es intensa en el estrato espinoso y muy intensa en el estrato córneo (figura 101).

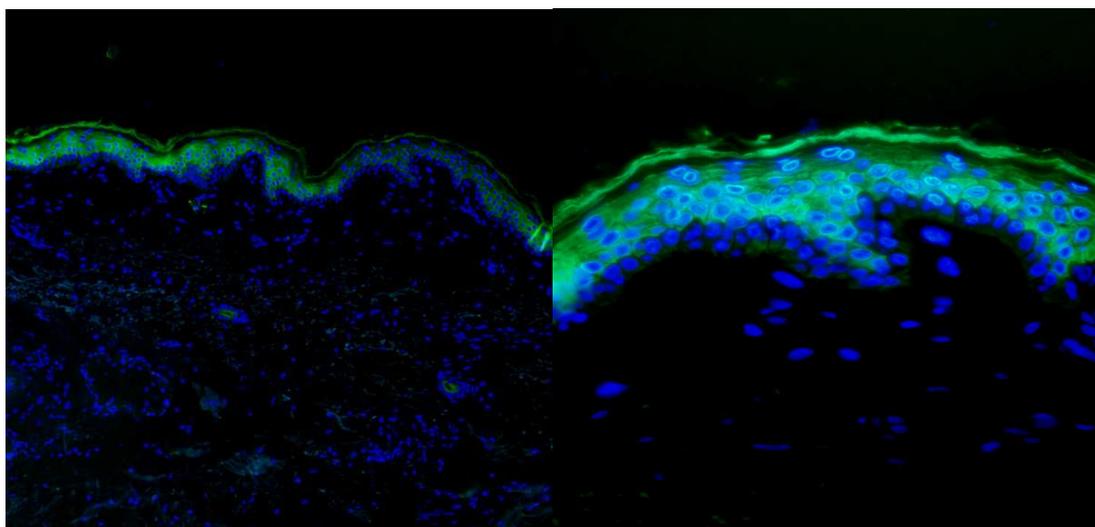


Figura 98. Análisis de inmunofluorescencia para Pancitoqueratina en muestras de piel humana control (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (100x a la izquierda y 40x a la derecha)

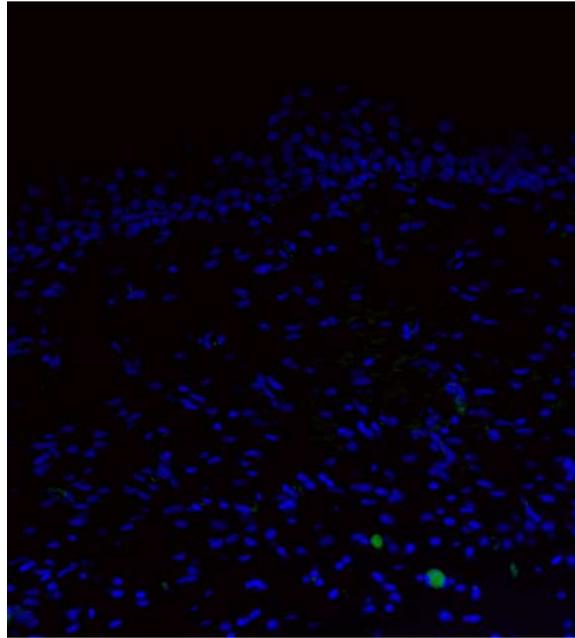


Figura 99. Análisis de inmunofluorescencia para Pancitoqueratina en muestras de piel artificial implantada durante veinte días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x).

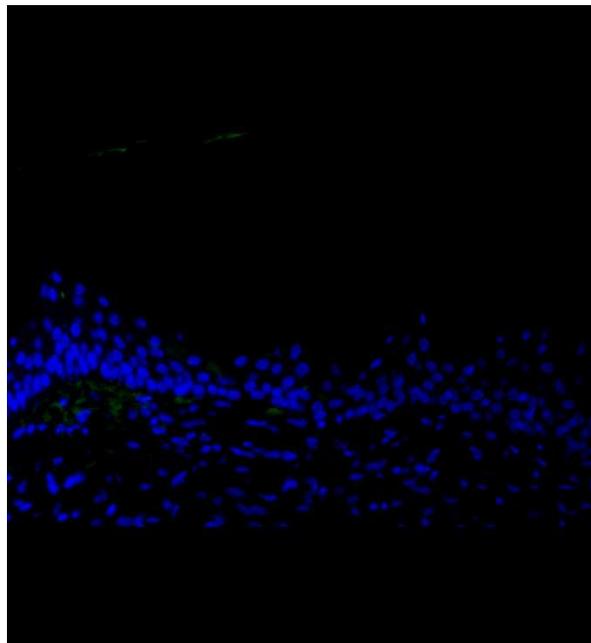


Figura 100. Análisis de inmunofluorescencia para Pancitoqueratina en muestras de piel artificial implantada durante treinta días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x).

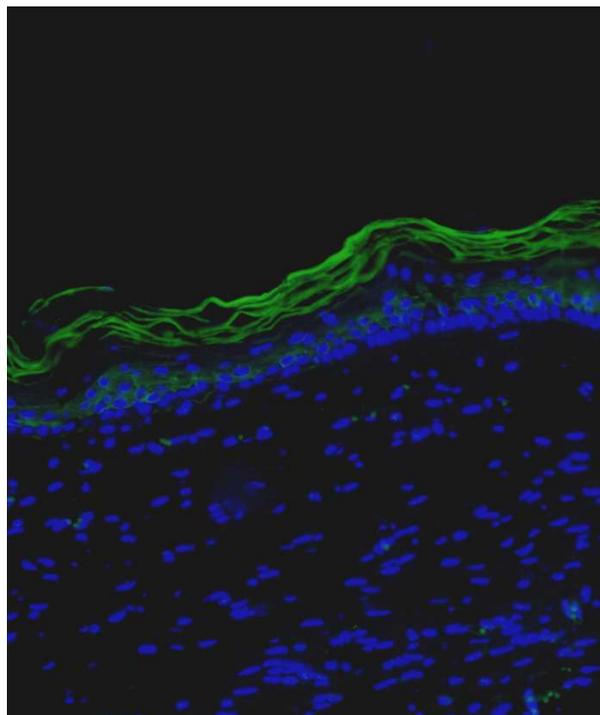


Figura 101. Análisis de inmunofluorescencia para Pancitoqueratina en muestras de piel artificial implantada durante cuarenta días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

4.2 Citoqueratina 1 (CK1)

- El análisis de expresión de citoqueratina 1 en las muestras de piel humana **control** mostró una expresión fuertemente positiva del anticuerpo anti-CK1 para las capas más apicales de la epidermis, incluyendo los estratos córneo, granuloso y la mayor parte del estrato espinoso (figura 102).
- En las muestras artificiales implantadas en el ratón durante **diez días**, se observa expresión positiva de esta citoqueratina en las capas más apicales del tejido, siendo negativa su expresión en las capas más basales (figura 103).
- En **veinte días** se observa una expresión positiva para los estratos granuloso y córneo (figura 104)
- En **treinta días** la expresión de la CK 1 fue positiva a nivel de estrato granuloso y muy positiva a nivel del estrato córneo (figura 105).
- Por último, para el **día cuarenta** postimplantación existe una expresión muy intensa en estrato córneo e intensa para los estratos granuloso y espinoso (figura 106).

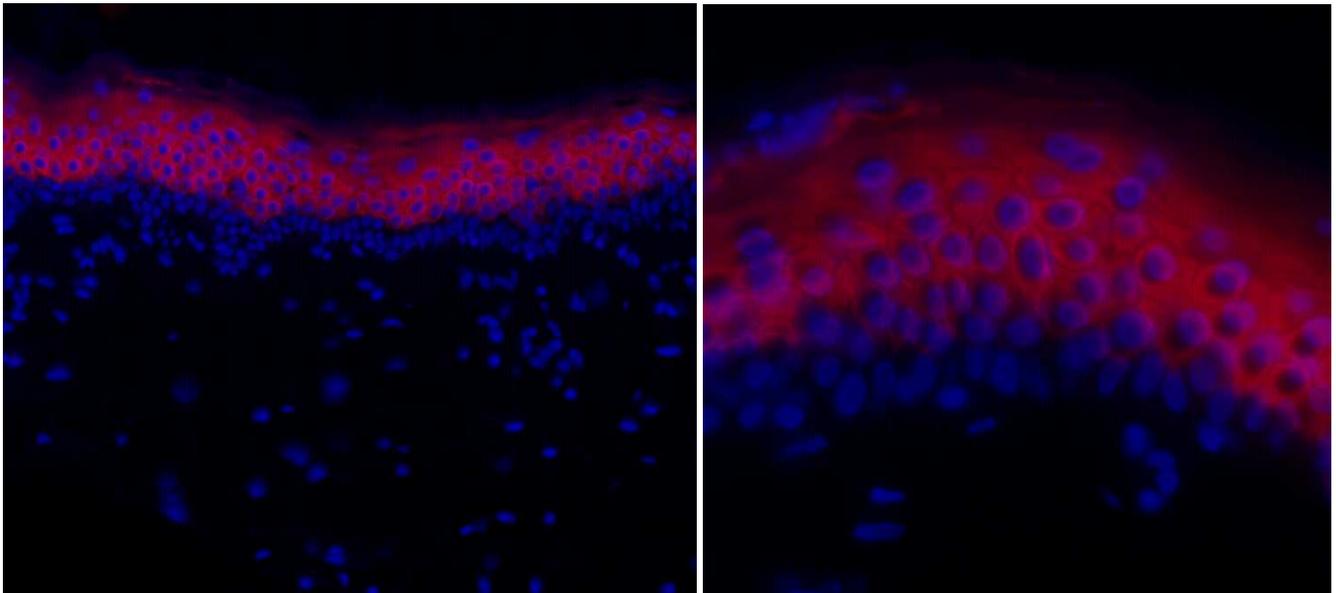


Figura 102. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 1 en muestras de piel humana control (señal roja-Cy3). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x a la izquierda y 400x a la derecha)

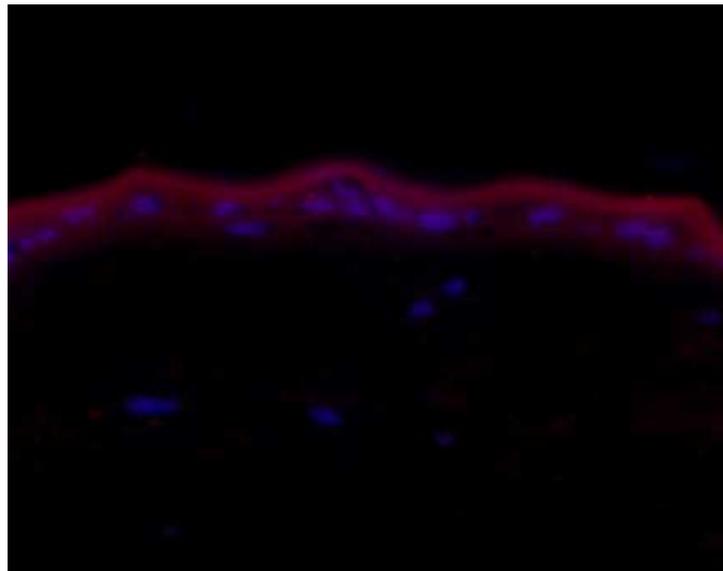


Figura 103. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 1 en muestras de piel artificial implantada durante diez días en el ratón inmunodeficiente (señal roja-Cy3). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (400x)

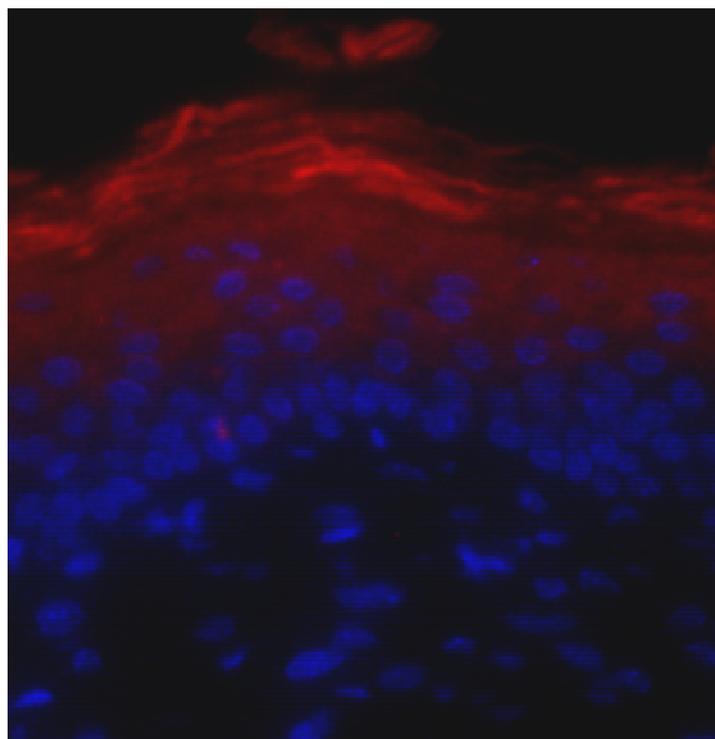


Figura 104. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 1 en muestras de piel artificial implantada durante veinte días en el ratón inmunodeficiente (señal roja-Cy3). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (400x)

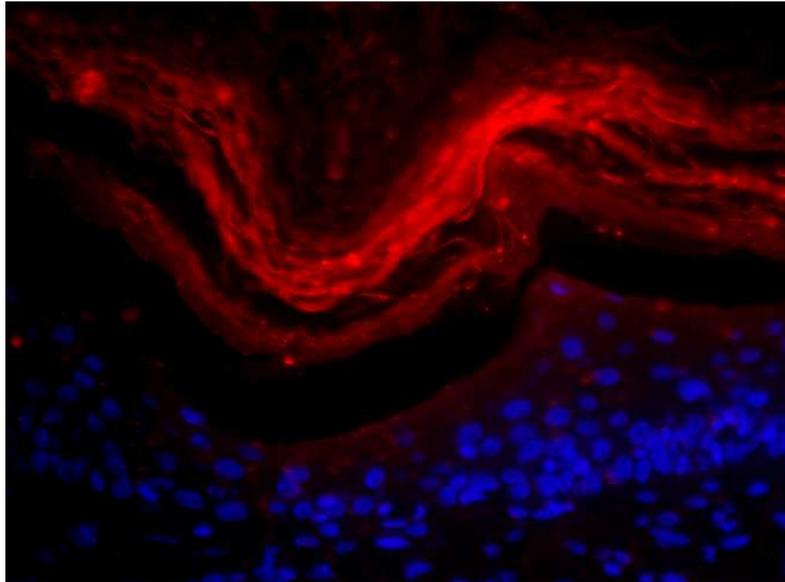


Figura 105. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 1 en muestras de piel artificial implantada durante treinta días en el ratón inmunodeficiente (señal roja-Cy3). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (400x)

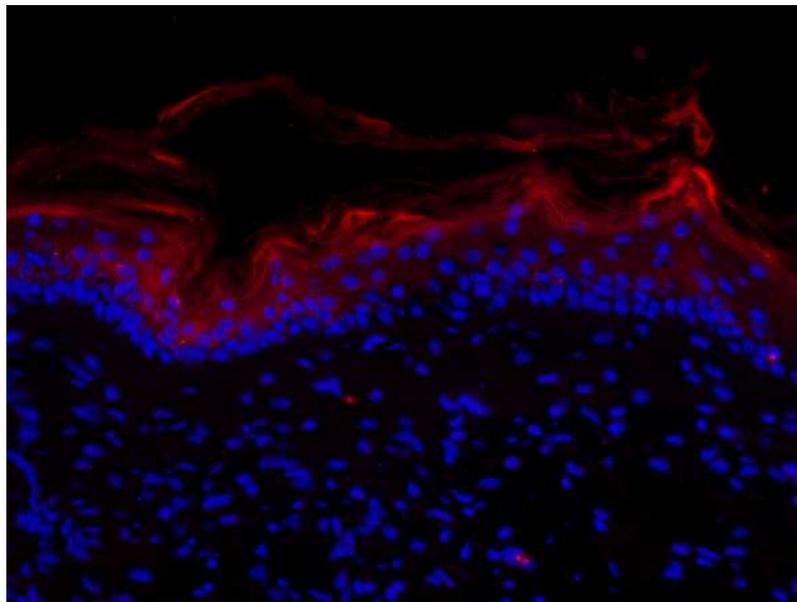


Figura 106. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 1 en muestras de piel artificial implantada durante cuarenta días en el ratón inmunodeficiente (señal roja-Cy3). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (400x)

4.3 Citoqueratina 10 (CK10)

El análisis de expresión de citoqueratina 10 en las muestras de piel humana **control** mostró una expresión fuertemente positiva del anticuerpo anti-CK10 para las capas más apicales de la epidermis, incluyendo los estratos córneo, granuloso y la mayor parte del estrato espinoso (figura 107).

A los **veinte y treinta días** postimplante del sustituto de piel humana en el ratón, se observa nula expresión de las citoqueratinas reconocidas por el anticuerpo específico en todos los estratos de la piel (figura 108 y 109).

En **cuarenta días** tras el implante de la piel artificial en el ratón, la expresión de la CK10 fue positiva a nivel de los estratos granuloso y córneo (figura 110).

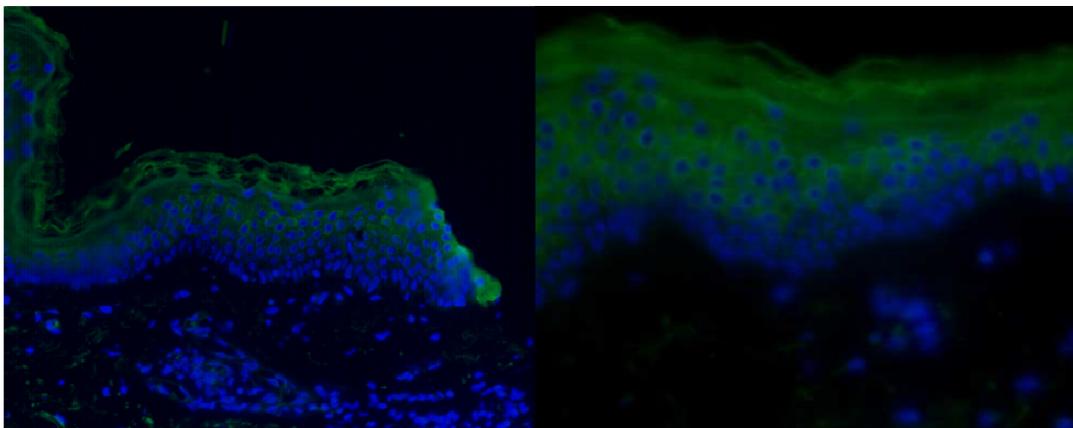


Figura 107. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 10 en muestras de piel humana normal (control)(señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x a la izquierda y 400x a la derecha)

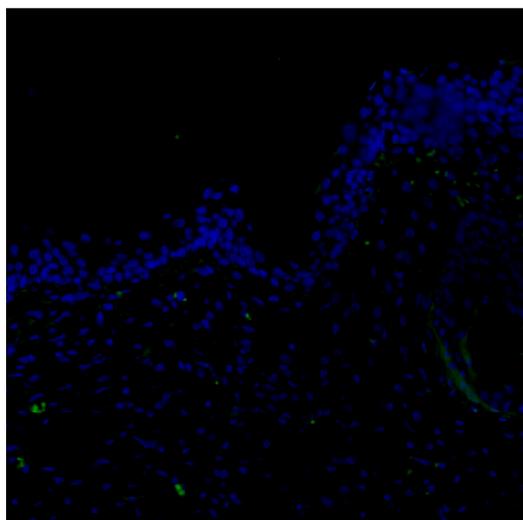


Figura 108. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 10 en muestras de piel artificial implantada durante veinte días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

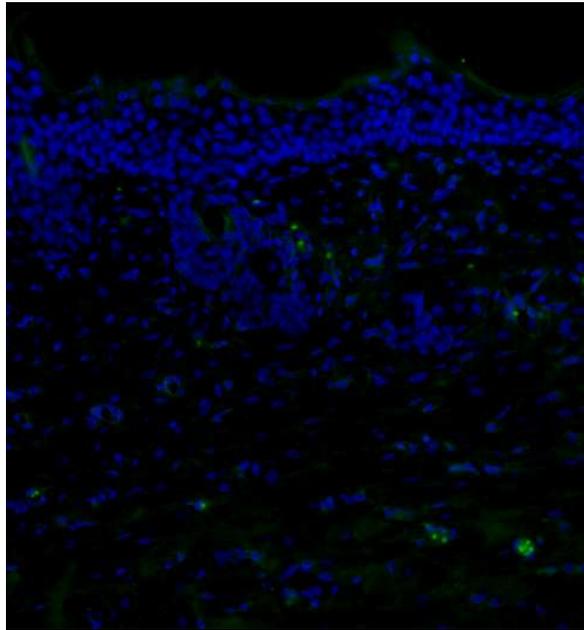


Figura 109. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 10 en muestras de piel artificial implantada durante treinta días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

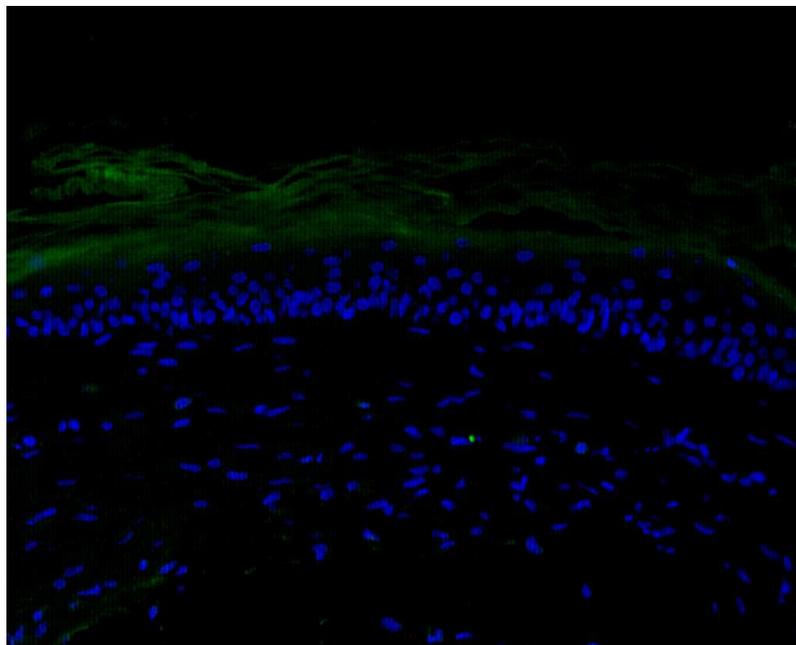


Figura 110. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 10 en muestras de piel artificial implantada durante cuarenta días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

4.4 INVOLUCRINA

En el caso del **control** de piel humana normal, la inmunofluorescencia para involucrina mostró expresión fuertemente positiva para los estratos espinoso y granuloso, siendo levemente positiva en el estrato córneo (figura 111).

A los **veinte días** tras el injerto, se observa que no existe expresión de involucrina en ninguna de las capas del epitelio implantado (figura 112).

Para el **día treinta** tras el implante, se apreció una expresión positiva a nivel del estrato córneo (figura 113)

A los **cuarenta días**, sin embargo, la expresión de involucrina fue intensamente positiva a nivel de estrato córneo, siendo muy escasa la expresión en el resto de estratos del epitelio (figura 114).

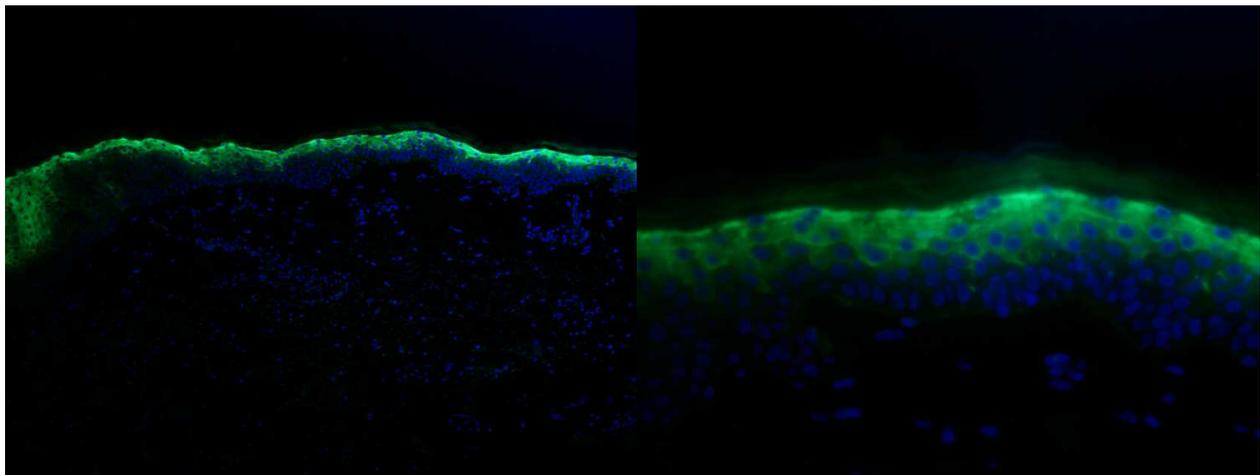


Figura 111. Análisis de inmunofluorescencia para involucrina en muestras de piel humana normal (control)(señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (100x izquierda y 400x derecha)

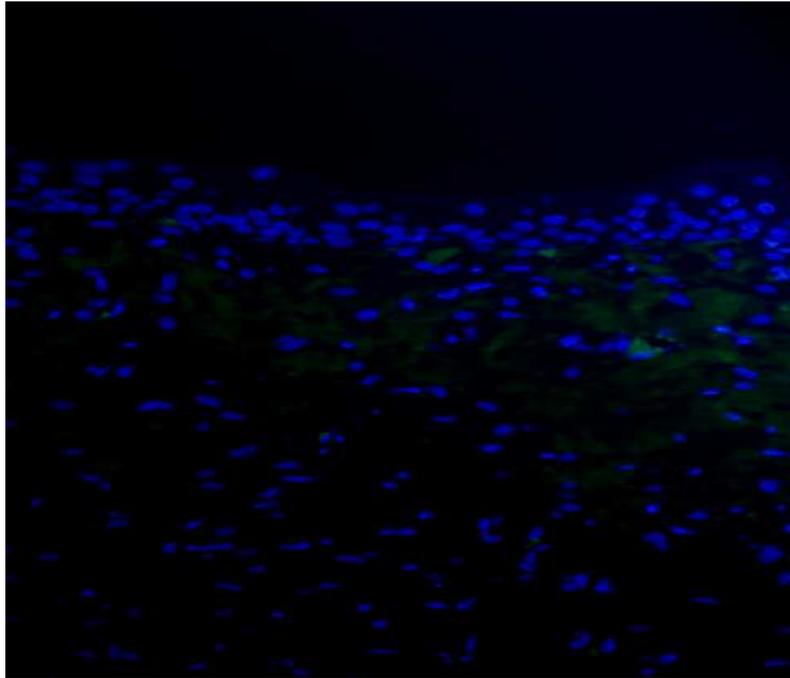


Figura 112. Análisis de inmunofluorescencia para involucrina en muestras de piel artificial implantada durante veinte días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

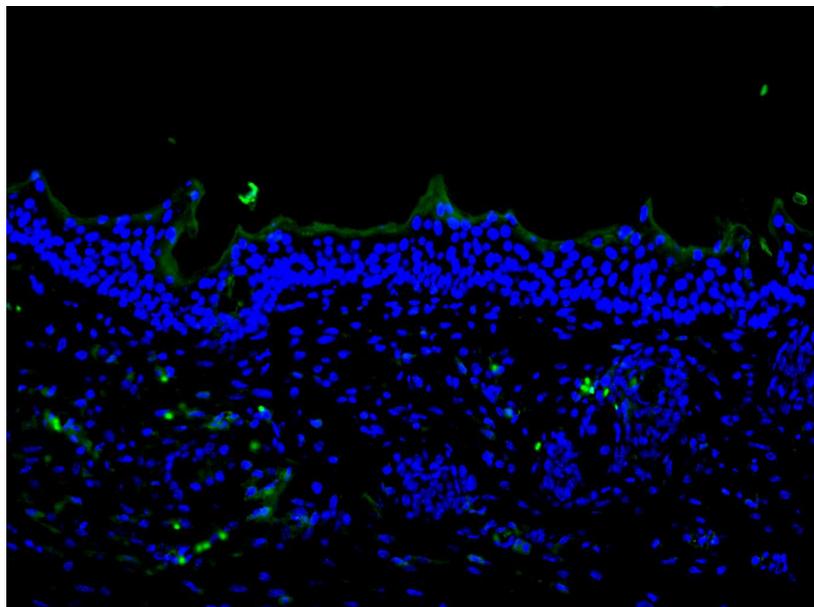


Figura 113. Análisis de inmunofluorescencia para involucrina en muestras de piel artificial implantada durante treinta días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

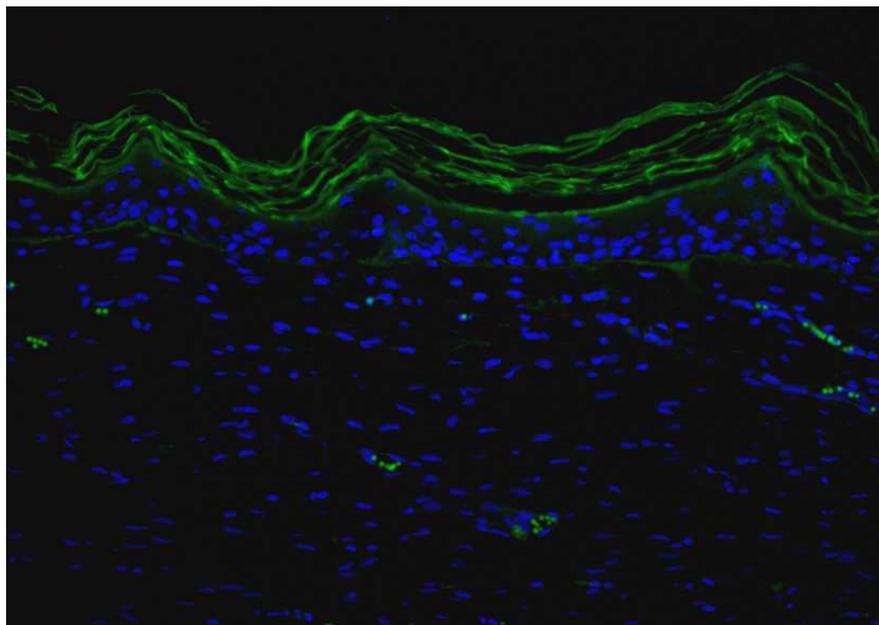


Figura 114. Análisis de inmunofluorescencia para involucrina en muestras de piel artificial implantada durante cuarenta días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

4.5 FILAGRINA

Cuando se evaluó la expresión de filagrina en el epitelio de la piel humana utilizada como **control**, se comprobó que la piel normal expresa esta proteína a nivel de la interfase entre los estratos granuloso y córneo (figura 115).

A los **diez días** del implante, se observó expresión levemente positiva de filagrina a nivel del estrato más apical del epitelio (figura 116).

A los **veinte días**, se observó un leve aumento de la expresión de filagrina a nivel del estrato más apical del epitelio (figura 117).

En **treinta días**, la expresión de la filagrina se fue haciendo cada vez más positiva a nivel de estrato córneo (figura 118)

Finalmente, la evaluación del constructo a los **cuarenta días** mostró una clara expresión positiva de esta proteína en los estratos granuloso y córneo (figura 119).

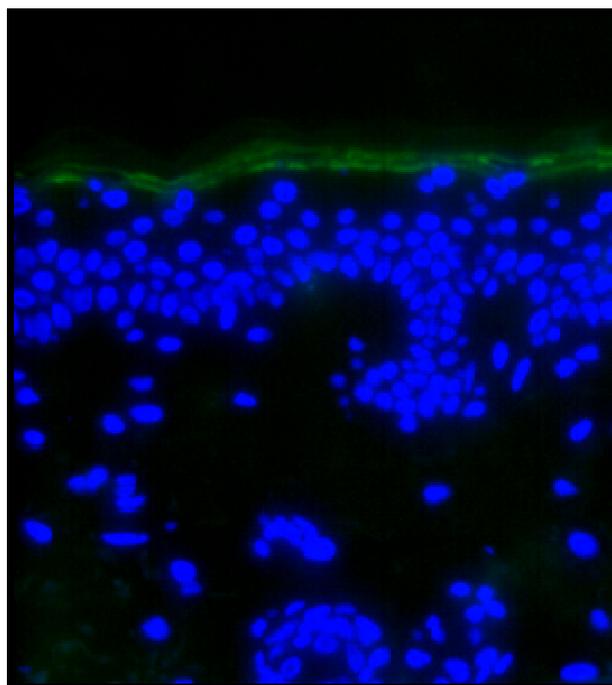


Figura 115. Análisis de inmunofluorescencia para filagrina en muestras de piel humana normal (control) (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (400x derecha)

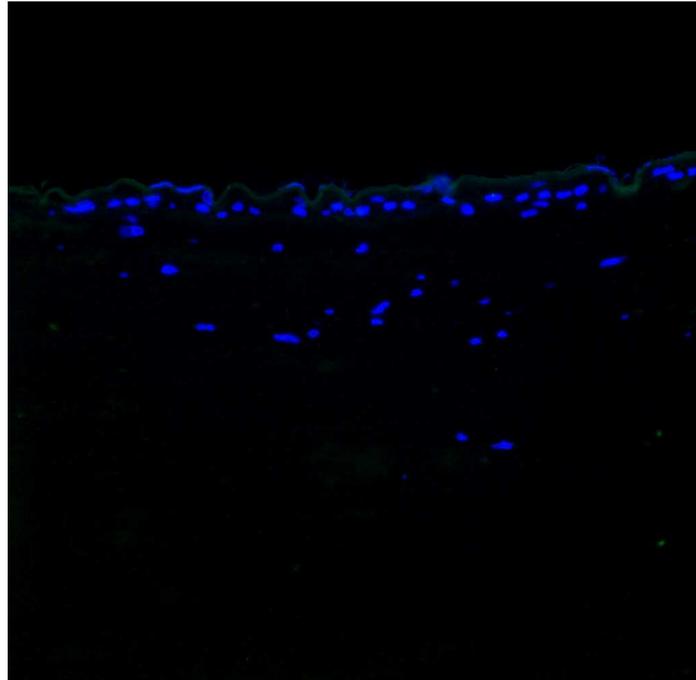


Figura 116. Análisis de inmunofluorescencia para filagrina en muestras de piel artificial implantada durante diez días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

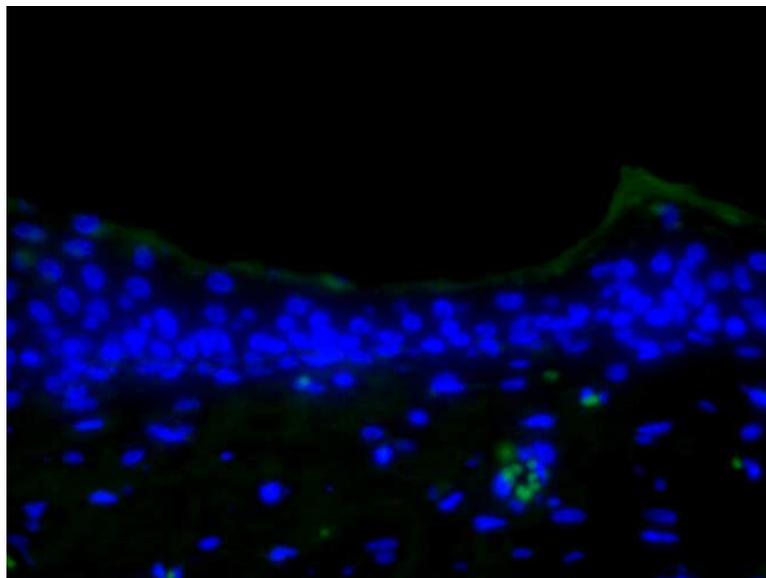


Figura 117. Análisis de inmunofluorescencia para filagrina en muestras de piel artificial implantada durante veinte días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (400x)

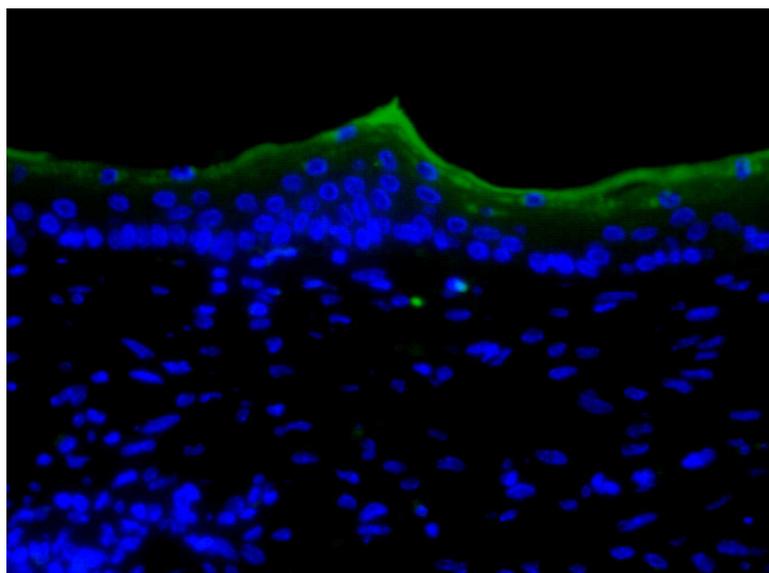


Figura 118. Análisis de inmunofluorescencia para filagrina en muestras de piel artificial implantada durante treinta días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (400x)

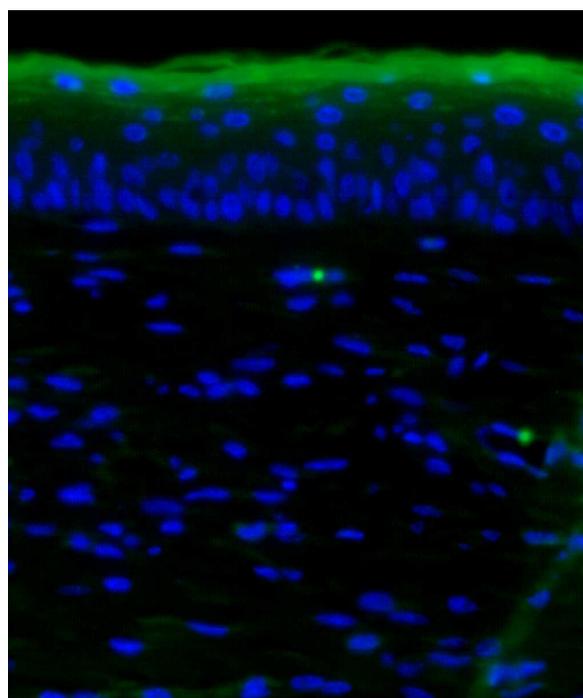


Figura 119. Análisis de inmunofluorescencia para filagrina en muestras de piel artificial implantada durante cuarenta días en el ratón inmunodeficiente (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (200x)

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La reparación de los tejidos no es una disciplina marginal en el ámbito de la investigación médica. Casi todas las enfermedades albergan durante su evolución procesos de reparación tisular. Cuando un tejido recibe una agresión sea ésta de naturaleza traumática, isquémica, tóxica, o autoinmune se ponen en marcha una serie de mecanismos de autodefensa que en conjunto integran la reparación tisular y que tienen como objetivo restaurar la integridad del tejido lesionado (Clark, 1996; Bennet y Schultz, 1993b; Hartmann, 1999; Martin, 1997)

El encontrar alternativas terapéuticas que estimulen los procesos de reparación de la piel adquiere una singular importancia para la superación de múltiples patologías. El avance en el conocimiento de los eventos moleculares y celulares que acontecen en la cicatrización de las heridas, tiene mucha más relevancia de lo que “a priori” podemos sospechar y es que la reparación de una herida presenta múltiples similitudes biológicas (proliferación masiva de diferentes estirpes celulares, síntesis y depósito de proteínas de la matriz, neoangiogénesis, liberación explosiva de factores de crecimiento, etc) con numerosas patologías, como por ejemplo el cáncer (Martin, 1997; Zimmerman y cols., 2000; Grant y cols., 1987, 1992). Por otro lado, el avance en el conocimiento científico de la reparación de las lesiones cutáneas puede ser de utilidad para el progreso en las soluciones terapéuticas de otras enfermedades de la piel (Martin, 1997; Slavin, 1996).

- La **cicatrización de las heridas**, supone un eslabón básico en el proceso curativo y la recuperación plena del estado de salud del paciente. El aumento de la edad media de la población, el auge experimentado por distintos procedimientos quirúrgicos en nuestros días, el mayor número de lesiones traumáticas accidentales y/o deportivas y la incidencia creciente de determinados estados patológicos, hacen que una adecuada cicatrización de las heridas de la piel sea clave en el desarrollo favorable de numerosos cuadros patológicos (Clark, 1996; Bennet y Schultz, 1993b; Leibovich y Ross, 1975).

Una herida supone una pérdida de la barrera física que protege a los tejidos de la invasión de gérmenes y permite la pérdida de fluidos vitales, que puede ser dramática en los casos de pacientes con quemaduras. Se han descrito un gran número de complicaciones médicas o quirúrgicas que pueden ser atribuidas a deficiencias en la cicatrización de las heridas, existiendo un amplio abanico de enfermedades y entidades patológicas (insuficiencia venosa periférica, isquemia arterial, diabetes, cáncer, inmunodepresión), que influyen de forma negativa sobre la reparación de las heridas, siendo la causa de una parte importante de la morbilidad e indirectamente, de la mortalidad, que encontramos a nivel hospitalario (Leibovich y Ross, 1975; Saulis y Mustoe, 2001).

La cicatrización de heridas está bien caracterizada a nivel microscópico, pero no así a nivel de la biología celular y molecular. Constituye un complejo proceso biológico que comprende la integración de diversos estadios tales como, la inflamación, la quimiotaxis y división celular, la angiogénesis, la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular, la contracción de la herida y la remodelación de la cicatriz (Bennet y Schultz, 1993a; Bennet y Schultz, 1993b). En las heridas que cicatrizan por segunda intención conforme avanza la reparación disminuye la superficie del área lesional. Hay

tres procesos biológicos que evolucionan en paralelo y que al asociarse verifican este hallazgo morfológico: los fenómenos de contracción de la herida, la reepitelización y la neoformación dérmica (Saulis y Mustoe, 2001).

1. La **contracción de la herida** reduce la superficie de la herida considerablemente, y conduce a que la zona de reparación incompleta se mantenga lo más reducida posible. Constituye un mecanismo de defensa rápida que se pone en marcha para favorecer el rápido cierre de la herida y evitar infecciones (Clark, 1996; Desmoulière y cols., 1993; Berry y cols., 1998).

La retracción de las fibras colágenas sólo desempeña un papel secundario en la contracción de la herida. Los fibroblastos del tejido de granulación tienen una intervención mucho más decisiva en la contracción, pues ya en la fase de remodelación, una vez finalizan sus actividades de secreción se transforman en parte en fibrocitos (estado de reposo) y en parte en miofibroblastos, que al igual que las células musculares lisas contienen diversas proteínas musculares con capacidad para generar fuerzas contráctiles (Clark, 1996) que hagan posible la contracción de la herida (Berry y cols., 1998; Desmoulière y cols., 1993). Esta conversión es activada por factores de crecimiento tales como TGF-1 (Desmoulière y cols., 1993) y señales mecánicas relacionadas con las fuerzas que resisten la contracción (Martin, 1997). Al contraerse los miofibroblastos, provocan que se tensen al mismo tiempo las fibras colágenas. El tejido cicatricial se retrae y de ese modo se astringe el tejido epitelial desde los bordes de la herida (Hartmann, 1999). Después del cierre de la herida los miofibroblastos revierten a una forma quiescente ó desarrollan apoptosis y desaparecen.

El aparato de microfilamentos de los miofibroblastos contiene proteínas con propiedades contráctiles: actina, miosina, y especialmente una isoforma de la actina típica de las células musculares lisas que se localizan en las paredes vasculares (-actina de músculo liso; α -SMA). Sobre todo esta última es clave para la identificación de la estirpe miofibroblástica, constituyendo su más relevante marcador (El-Ghalbzouri y cols., 2004).

La contracción de una herida es un viejo recurso como mecanismo de supervivencia en la evolución de los animales. El proceso biológico de la contracción de una herida está muy extendido en los vertebrados superiores. La contracción del área lesional también ocurre en heridas humanas, pero tiene un menor impacto en comparación con lo que ocurre con otros mamíferos. En los mamíferos, la reducción de hasta un 90% del área lesional expuesta, se verifica gracias a los fenómenos de contracción de la herida, en cambio la contribución de estos fenómenos en las heridas humanas alcanza sólo entre el 25% y el 50 % (Garlick y Taichman, 1994; Kidd y cols., 1971).

2. La cicatrización de heridas se realiza gracias a la formación de tejido de granulación y a la reepitelización (Slavin, 1996). La **epitelización** cierra el ciclo de regeneración de la herida y está íntimamente ligada con la formación del tejido de granulación. El tejido granular, puede ser descrito como una primitiva y transitoria unidad hística que cierra “definitivamente” la herida y sirve de “lecho” para la sucesiva epitelización. La denominación de “**granulación**” fue introducida por Billroth en 1865, y tal definición obedece, a que durante el desarrollo del tejido pueden

visualizarse en la superficie pequeños gránulos rosados y vítreotransparentes (Hartmann, 1999).

Del tejido granular parten las señales quimiotácticas más relevantes, (factor de crecimiento queratinocítico, KGF), que actúan sobre los queratinocitos para que se inicie la migración de las células epiteliales desde los bordes de la herida (Nanney, 1990). Además la migración del epitelio de los bordes de la herida depende del tejido granular, ya que los epitelios no descienden, sino que necesitan una superficie deslizante lisa y húmeda (Hartmann, 1999).

3. La **neoformación dérmica** es pieza clave en la reparación de las heridas con el fin de alcanzar la reconstitución del área dañada y de volver a rellenar la zona defectuosa mediante el tejido granular. Como expusimos en los resultados en las heridas tratadas el tejido neoformado obtenido presentaba abundante celularidad (Risau, 1997; Clark y cols., 1996; Fisher y cols., 1994).

La reepitelización se origina a partir de los apéndices de epidermis residual y de los epitelios de los márgenes laterales de la herida (Hartmann, 1999). Es un importante evento en el devenir de la cicatrización ya que involucra la proliferación y migración queratinocítica destinada a cubrir el tejido dérmico expuesto, e incorpora la restauración de una nueva membrana basal que gracias a sus características biomecánicas y estructurales proporciona la estabilidad necesaria para que el tejido cicatricial cumpla en lo sucesivo con los cometidos biológicos que se le asignen (Hartmann, 1999; Garlick y Taichman, 1994; Kidd y cols., 1971).

- La **cicatrización hipertrófica** ocurre de forma característica cuando acontece una herida de espesor completo con una respuesta cicatricial alterada. El desarrollo de esta reparación anormal se ha asociado con un prolongado periodo entre la lesión y la reepitelización. Si la formación de un adecuado tejido dérmico se demora una de las consecuencias es un resultado patológico cicatricial que puede favorecer la aparición del queloide (Butler y cols., 2008; Robles y cols., 2007; Berman y cols., 2008).

El proceso de cicatrización alcanza especial significado en relación con la cirugía reparadora refiriéndonos a patologías de la piel como las quemaduras, a las úlceras por decúbito y/o vasculares por su frecuencia y por el gran impacto sanitario y socioeconómico que acarrearán sus potenciales secuelas (Morris y cols., 1989; Jones y cols., 2007). La mayor edad media de la población con una mayor prevalencia de ciertas enfermedades crónicas específicas y el encamamiento prolongado, ha disparado la incidencia de úlceras por decúbito. Lo mismo ha ocurrido con las úlceras vasculares. La insuficiencia venosa crónica acompañada de lesión cutánea asociada afecta a un 2% de la población, y la arteriosclerosis como enfermedad arterial oclusiva puede complicarse en un 5-10% con ulceraciones (Cairols, 2002).

El coste de estas afecciones es extraordinario para los sistemas de salud. Conseguir una reparación rápida y eficaz que permita integrar sin gran demora al paciente afecto de este tipo de heridas a su estado funcional previo, sobre todo en el contexto de determinadas patologías, sigue siendo una encrucijada sin resolver en la práctica médica (Jones y cols., 2007).

Los tratamientos de estas lesiones que cicatrizan por segunda intención, a nivel local, se han basado en el uso de diferentes apósitos biológicos ó sintéticos casi siempre de tipo oclusivo con una acción específica para las úlceras dependiendo de la fase en que se encuentren (necrótica, con esfacelos, con tejido de granulación ó en fase de

epitelización), y de que fueran más o menos exudativas, con resultados dispares en cuanto al resultado cicatricial. En los últimos años se han utilizado en clínica tanto geles (Regranex[®]) para mejorar la cicatrización, como factores de crecimiento, terapia génica y sucedáneos de la piel (Apligraf[®]) con células incorporadas en una matriz para tratar úlceras diabéticas y venosas (Veves y cols., 2001; Harding y cols., 2002; Thomas y Harding, 2002; Singer y Clark, 1999).

La epidermis cutánea ha sido el primer tejido vivo que ha podido ser reconstruido *ex vivo* y asimismo utilizado para aplicaciones clínicas. Un desarrollo especial han adquirido las técnicas de cultivos celulares para crear sustitutos de piel que han evolucionado desde el uso inicial de sábanas de queratinocitos, hasta otros compuestos de queratinocitos, fibroblastos o ambos en el tratamiento de heridas agudas, crónicas, y quemaduras (Rue y cols., 1993; Otto y cols., 1995; Meana y cols., 1998).

- La **ingeniería tisular** es una disciplina novedosa que permite desarrollar en el laboratorio diferentes tejidos artificiales (Ikada, 2006; Park y cols., 2008; Jayasinghe, 2008; Nolan, 2008). Existe una dilatada experiencia en la utilización clínica de láminas de queratinocitos humanos y de piel de espesor total obtenida mediante ingeniería tisular (Gallico y cols., 1984; Compton y cols., 1989; Munster y cols., 1990) expandidas en cultivo a partir de una biopsia de piel; sin embargo, es poco conocida su forma de producción y son pocos investigadores los que tienen manejo de este tipo de cultivos, ya que en España tan solo existe un centro de cultivo de piel humana con fines terapéuticos que se halla en Oviedo (Meana y cols., 1998; Llamas y cols., 2006).

Uno de los retos futuros de la investigación en este campo es sin duda el mantenimiento de dicha viabilidad a lo largo del tiempo, de los subcultivos a utilizar y de las condiciones de preservación y conservación de los cultivos para su uso futuro en Ingeniería Tisular y en terapéutica (Alaminos y cols., 2006).

- En esta Tesis Doctoral, se han logrado optimizar protocolos para la generación de piel humana en el laboratorio, lo cual presenta una indudable utilidad clínica. Se tiene como objetivo estudiar constructos de piel en **heridas de espesor completo** e animales atímicos.

Los modelos de heridas excisionales de espesor completo realizados en animales de laboratorio en nuestro trabajo de investigación presentan ciertas ventajas respecto a los estudios realizados sobre heridas de espesor parcial, ya que permiten el implante de una piel artificial de espesor total, con lo cual se obtiene una adecuada cantidad de tejido generado en laboratorio. Este tejido, al presentar espesor total, suele ser suficiente para desarrollar los múltiples estudios histológicos, morfométricos e inmunofluorescencia que se requieren para estudiar la calidad biológica del área lesionada (Saulis y Mustoe, 2001). Además, los modelos de heridas de espesor completo, al involucrar la epidermis y toda la región dérmica, favorecen el que la reepitelización sólo se realice desde los bordes de la herida y del tejido artificial implantado y no del “pool” extra de células madre procedente de los remanentes de folículos pilosebáceos que encontraríamos en la dermis reticular que aparece conservada en las heridas de espesor parcial. Por esta razón, si una herida de piel deja intactos los folículos pilosos, una gran contribución a la cicatrización de la epidermis,

deriva de los remanentes de esos folículos pilosos. Éstos actúan como un corte normal del borde epidérmico de la herida, y se extienden hacia fuera como islas crecientes desde las cepas foliculares. Estas heridas parciales son capaces de precipitar una proliferación explosiva de células epidérmicas de gran potencial proliferativo cutáneo procedentes tanto de los bordes como de los folículos. Este estallido proliferativo (Garlick y Taichman, 1994; Kidd y cols., 1971), aunque no es estrictamente requerido para la reepitelización, provee de un “pool” celular extra para reemplazar aquellas células perdidas durante la lesión (Martin, 1997). De hecho, la capacidad proliferativa de un pequeño fragmento de piel del adulto es inmensa; como ejemplo, tenemos la capacidad de los injertos autólogos de cultivos de queratinocitos para recuperar pacientes que han recibido quemaduras de espesor total en el 98% de su superficie corporal (Compton y cols., 1989). De ahí que los excelentes resultados encontrados en nuestro modelo sean sólo a expensas de una hilera delantera de queratinocitos y dermis constituida en base a un cultivo celular, sin recibir ninguna ayuda extra de ninguna otra área lesional.

Nuestro modelo de herida en el dorso del ratón atímico, también se ha utilizado cuando se quieren obtener cicatrices de heridas que histológicamente reproduzcan el aspecto de las cicatrices hipertróficas, ya que el retraso en la reepitelización de la herida, como resultado de una limitada contracción de la misma, conduce a la larga al desarrollo de una cantidad excesiva de tejido de granulación y a una cicatriz hipertrófica después de completarse la reepitelización.

- En primer lugar, hemos conseguido cultivar en el laboratorio los dos tipos principales de células que constituyen la piel, los **fibroblastos** y los **queratinocitos**. Estos cultivos se establecieron a partir de pequeñas biopsias extraídas con anestesia local. Esta metodología es técnicamente sencilla y permite la obtención de un número muy elevado de células procedentes de un paciente, las cuales pueden ser utilizadas para diferentes ensayos de tipo farmacológico, genético y toxicológico, así como para la ingeniería tisular.

- El **cultivo primario** de queratinocitos y fibroblastos se analizó mediante microscopía de contraste de fases donde se observó que en el caso de los **queratinocitos** presentaban un crecimiento más lento que los fibroblastos, observándose pequeñas colonias en la primera semana y que crecieron hasta hacerse confluentes en la tercera semana. Estos queratinocitos presentan alta actividad metabólica intracelular ya que presentan un citoplasma rico en retículo endoplásmico de consistencia hialina y un núcleo voluminoso con hasta tres nucleolos. En dichos queratinocitos también se puede observar la presencia de uniones intercelulares.
- En el **cultivo primario de fibroblastos** se observó que a partir de las 48 horas comenzaron a crecer y que también presentaban un alto metabolismo celular por la presencia de abundantes nucleolos y formación de largas prolongaciones que a partir del 7^o día se convirtieron en una masa de células fusiformes alcanzando la confluencia. En este contexto, nuestros cultivos de fibroblastos demostraron una elevada tasa de proliferación y un rápido crecimiento en medios de cultivo exentos de factores de crecimiento. Estos resultados coinciden con los datos

publicados por otros investigadores (Orwin y Hubel, 2000; Teixeira y cols., 2004; Alaminos y cols., 2007, Sánchez Quevedo y cols., 2007).

- Una vez obtenidas las células a utilizar en la construcción de nuestro modelo de piel artificial, se procedió a la construcción de dicha piel utilizando un soporte estromal compuesto por **fibrina** y **agarosa**. En relación con los soportes, diferentes autores han utilizado diversos materiales para la construcción de tejidos en el laboratorio, destacando los geles de quitosan, agarosa, colágeno y fibrina (Meana y cols., 1998; Schoop y cols., 1999; Bach y cols., 2001; Chinnathambi y cols., 2003; Llamas y cols., 2004, 2006; Isenberg y cols., 2006; Peretti y cols., 2006; Talbot y cols., 2006; Alaminos y cols., 2006). Sin embargo, la mayoría de estos soportes mostraron niveles muy bajos de resistencia mecánica. En esta Tesis Doctoral, hemos utilizado un soporte mixto compuesto por una mezcla de fibrina y de agarosa al 0.1 %, el cual nos permitió generar sustitutos dérmicos con elevados índices de consistencia. La utilización de fibrina tiene una ventaja adicional y es que, al proceder del plasma sanguíneo, incorpora numerosas citoquinas y factores de crecimiento que facilitan la generación de un excelente micromedioambiente que potencia la proliferación y el desarrollo de las células a utilizar en el constructo. En nuestro caso, el soporte de fibrina-agarosa permitió el desarrollo adecuado del epitelio de la piel, desde un punto de vista histológico.

- Por otro lado, en este trabajo utilizamos **una técnica de cultivo secuencial** sobre una membrana porosa disponible comercialmente (Reichl y Muller-Goymann, 2003). Este sistema se utilizó por un doble motivo. En primer lugar, porque la membrana porosa permite el paso de nutrientes desde el medio de cultivo al tejido en construcción. En segundo lugar, porque el diseño de este dispositivo permite utilizar una técnica de cultivo aire-líquido, lo cual estimula la estratificación del epitelio localizado sobre el sustituto estromal. Diferentes autores han utilizado dispositivos con membranas porosas de distintas variedades en protocolos de Ingeniería Tisular para la construcción de diversos tejidos (Richard y cols., 1991; Geroski y Hadley, 1992; Casasco y cols., 2001; Limat y cols., 2003; Izumi y cols., 2003; Reichl y cols., 2004).

- Una vez seleccionado el sustrato estromal más apropiado, es importante evaluar histológicamente el tejido artificial formado tanto *ex vivo* como *in vivo*.

1. En primer lugar, con la evaluación **ex vivo** del sustituto de piel artificial pudimos observar que en la primera semana ya existía una capa de queratinocitos sobre la superficie del sustituto estromal y que con el paso del tiempo aparecía una capa más de queratinocitos cada semana aproximadamente, por lo que en la cuarta semana se alcanzaban un total de 3 a 4 hileras. En cuanto a los fibroblastos se halló un gran número en las distintas etapas y cada vez un contenido mayor en material fibrilar extracelular. No se observaron papilas, anejos cutáneos ni estrato córneo. Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación en la elaboración de mucosa oral y córnea mediante ingeniería tisular (Alaminos, 2006, 2007; Sánchez-Quevedo, 2007).
2. En segundo lugar, la evaluación **in vivo** del sustituto estromal tras el implante del constructo en el dorso de los ratones atímicos inmunodeprimidos como se detalla en el apartado Material y Métodos de esta Tesis Doctoral, desde un punto de vista

clínico, nuestra línea de investigación refleja un buen índice de reepitelización en las heridas en la espalda de los ratones atímicos en donde se colocaron los constructos de piel artificial humana, por lo que se observó una gran rapidez del proceso de cicatrización en el ratón atímico, que ya en el día seis se ha formado una costra y tejido de granulación, hasta llegar al día veinte en el que apenas se aprecian unos milímetros de herida. De ahí que nuestros excepcionales resultados en cuanto a la reepitelización del defecto de forma directa con la colocación de la piel artificial en el defecto cutáneo del animal, impliquen un acelerado desarrollo de un tejido dérmico y epidérmico neoformado bien estructurado, que supone un indicio de la excelente calidad biológica de la reparación. Con todo ello, la nueva piel formada está correctamente biointegrada en la piel del animal y no se apreciaron signos de infección, hematoma ni otras complicaciones.

Además, en este trabajo hemos estudiado nuestro material *in vivo* con microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Nuestros resultados revelan que, en general, la piel generada en el laboratorio por Ingeniería Tisular muestra gran similitud estructural y ultraestructural con la piel humana nativa ortotópica.

- Mediante microscopía óptica y con microscopía electrónica de transmisión es posible observar la presencia de un epitelio de 3 a 5 capas de queratinocitos a los diez días del implante de cultivo sobre el sustituto estromal, así como la presencia de abundantes gránulos y filamentos de queratina en el interior de los queratinocitos. En la dermis inicialmente se halló un infiltrado leucocitario, probablemente por la presencia de la agarosa, que, según otros autores (Cadic-Amadeuf CM y cols., 1992), se podría comportar como un cuerpo extraño. Dichos autores obtuvieron resultados similares con la aplicación de agarosa implantada en células adrenales, donde se observó un infiltrado leucocitario compuesto por células T CD4 y CD8, así como macrófagos activados (Cadic-Amadeuf CM y cols., 1992). También encontramos abundantes fibroblastos que se hallan formando un material fibrilar extracelular aún desorganizado. Todo ello, signos de un tejido cutáneo que se halla en proceso de proliferación activa. El análisis de los tejidos implantados a largo plazo en el ratón de laboratorio, demostró que este infiltrado tenía carácter transitorio.

Por otra parte, hemos de destacar la presencia de abundantes **vasos sanguíneos** desde estadios muy precoces de la implantación del constructo. Lo cuales son necesarios para el prendimiento y nutrición del constructo, y son indicativos de la excelente integración del constructo de piel artificial en la piel del animal.

- Usando microscopía electrónica de barrido se pone de relieve que dicho recubrimiento epitelial es incompleto, y que éste sólo se produce a partir de los veinte días tras el implante del constructo. Los datos microscópicos ponen asimismo de relieve que durante los veinte primeros días tras el implante, las células, presentan un alto grado de indiferenciación, puesto que con microscopía electrónica de barrido, no ofrecen características microscópicas de diferenciación queratinocítica, mostrando patrones de superficie tipo I similares a los observados en mucosa oral. La existencia de microvellosidades y de un patrón superficial tipo I ha sido relacionado en los tanto en queratinocitos de la piel como en queratinocitos de mucosa oral con un bajo grado de diferenciación (Moreu y cols., 1993; Sánchez-Quevedo y cols., 1994; Dourov, 1984; Kullaa-Mikkonen, 1986, 1987).

Los trabajos de Hodgkin (Hodgkin y cols., 1978) y de Southgate (Southgate y cols., 1987) demostraron que las células de los estratos más inferiores de los epitelios estratificados de mucosa oral, así como los queratinocitos en cultivos primarios, presentaban microvellosidades en su superficie, esto es, un patrón tipo I como el que presentan las células que recubren nuestros constructos durante los diez primeros días. En el transcurso de los veinte y treinta días, aumenta el número de estratos de queratinocitos entre seis y nueve en el epitelio, comprobándose el progresivo incremento y maduración de los sistemas de unión y de las interdigitaciones. Dichos sistemas de unión son fundamentalmente de tipo adherente, especialmente máculas adherentes o desmosomas, por lo que el sistema de cohesión estructural sí está bien definido a los veinte días tras el implante de la piel artificial. Todo ello sugiere que el epitelio formado sobre las matrices de fibrina y agarosa es un epitelio inmaduro pero con un elevado grado de cohesión intercelular, por lo que su funcionamiento podría ser similar al de la piel.

La maduración queratinocítica progresa asimismo de manera temporal. De este modo, cuando el epitelio de nuestros tejidos artificiales alcanza múltiples capas durante el proceso de maduración epitelial (epitelio estratificado) para el día cuarenta tras el implante, las células presentan patrones superficiales tipo III, esto es, patrones de superficie con microplicas que se corresponden con estratos más avanzados en el proceso de queratinización de las células de la epidermis. Esto también ocurre en el epitelio queratinizado de la mucosa oral (Dourov, 1984; Kullaa-Mikkonen, 1986, 1987; González Jaranay y cols., 1990; Moreu y cols., 1993; Sánchez-Quevedo y cols., 1994).

Por otro lado, en el estroma artificial se evidencia la actividad sintética de los fibroblastos a medida que progresa el constructo de piel artificial, por lo que a lo largo de los días se apreciaron un número cada vez más abundante de fibras de colágeno, mientras que los filamentos de fibrina se iban degradando y en todo momento se apreciaron restos de agarosa. El hallazgo de la formación de fibras de colágeno organizadas en las distintas direcciones del espacio, la presencia de estratos muy bien organizados de queratinocitos con abundantes desmosomas y prolongaciones celulares, sugiere que el epitelio generado podría ser plenamente funcional, por lo que podría presentar gran utilidad clínica.

Se observaron numerosas **células endoteliales de capilares sanguíneos** en el sustituto estromal, desde etapas muy tempranas desde su implante en el animal, lo cual indica que el constructo había prendido sobre el lecho cruento del ratón y que presentaba una nutrición eficaz, con una buena integración en el mismo, sin signos de rechazo, a valorar desde una perspectiva clínica.

- El resultado final del modelo, tras la evaluación microscópica, permite comprobar que la utilización de queratinocitos y fibroblastos obtenidos a partir de biopsias, de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado correspondiente, y la utilización de un sustituto estromal de fibrina y agarosa, y del implante del constructo de piel obtenida mediante ingeniería tisular, en el dorso de los animales de experimentación, posibilita el desarrollo de una piel artificial constituida por un epitelio con un alto grado de diferenciación y por un estroma estructuralmente apto para satisfacer las propiedades mecánicas básicas que caracterizan a la piel. Demuestra además, una excelente integración en el modelo animal, desde un punto de vista clínico, comparado con otros modelos.

En este estudio demostramos que los sustitutos de piel a base de fibrina y agarosa se integran adecuadamente en los tejidos receptores, y no producen ningún tipo de reacción adversa o respuesta inflamatoria.

- Aunque la evaluación estructural y ultraestructural de nuestros tejidos nos permite predecir el posible comportamiento clínico de los mismos, en este trabajo quisimos caracterizar la expresión de los principales marcadores de **función** queratinocítica en los constructos de piel humana generados en el laboratorio *in vivo*.

De este modo, mediante el estudio de perfiles de **expresión de citoqueratinas**, involucrinas y filagrinas en piel obtenida mediante ingeniería tisular en diferentes estados de maduración pudimos establecer la relación entre los diferentes patrones de diferenciación morfológica encontrada en los tejidos y la expresión de diferentes grupos de citoqueratinas, involucrinas y filagrinas relacionadas con el proceso de desarrollo de dichos patrones de diferenciación morfológica. Esta información nos permitió comprender los procesos de desarrollo y maduración de los tejidos obtenidos en el laboratorio *in vivo*, así como demostrar la **funcionalidad** de la piel obtenida mediante ingeniería tisular comparada con la piel humana ortotópica.

De acuerdo con los resultados, el perfil de expresión de citoqueratinas, involucrinas y filagrinas fue similar para la piel humana control y la piel artificial implantada *in vivo*, aunque también se detectaron algunas diferencias.

En nuestro estudio destaca, la alta expresión de ciertas proteínas en los cinco grupos de estudio, entre ellas la pancitoqueratina, citoqueratinas 1 y 10, involucrinas y filagrinas sugiere que la expresión de diferentes grupos de marcadores es fundamental para el desarrollo y la funcionalidad de los queratinocitos *in vivo*. Esto probablemente quiere decir que existen grupos de citoqueratinas, involucrinas y filagrinas que son básicamente necesarias para todos los tipos de epitelio en la piel humana y que se expresan independientemente de las condiciones ambientales. Además, estas proteínas fueron positivas tanto en la piel desarrollada *in vivo* con numerosas capas de epitelio como en los controles de piel humana, lo cual sugiere que el funcionamiento de la piel artificial podría asemejarse al de la piel nativa.

- ❖ Las **citoqueratinas** son polipéptidos fibrosos de tipo alfa con un diámetro de 7–11 nm. Son componentes importantes del citoesqueleto en casi todas las células epiteliales, así como en algunos tipos de células no epiteliales. Normalmente se considera que las citoqueratinas son los marcadores más ubicuos de la diferenciación epitelial y, hasta ahora, Moll ha numerado 20 tipos diferentes. Los monómeros de citoqueratina están ligados una a la otra por moléculas de filagrina. Su función principal es la organización de la estructura tridimensional interna de la célula (por ejemplo, forman parte de la envuelta nuclear y de los sarcómeros), formando una barrera rígida que evita la entrada de microorganismos. Esa misma barrera cumple la función vital de retener agua dentro de las células. También participan en algunas uniones intercelulares (desmosomas) (Moll y cols., 1982; Moll y cols., 1992).

- ❖ En el caso de la **pancitoqueratina**, se trata de un complejo de citoqueratinas (5, 6, 8, 18, 10,1) y en nuestros resultados hallamos una expresión suprabasal muy similar tanto en las muestras de piel artificial implantadas (*in vivo*) como en las muestras de piel humana control. Tan solo se apreciaron diferencias a nivel del estrato basal, en el que en la piel del constructo no expresaba señal alguna, mientras que la piel humana control mostraba una expresión levemente positiva.
- ❖ Por otro lado, la expresión de **citoqueratinas 1 y 10**, importantes marcadores de queratinización (Hansson y cols., 2001; Tomakidi y cols., 1998), representan algunos de los primeros marcadores de la diferenciación epidérmica (Ivanyi y cols., 1989; Moll y cols., 1982), siendo constituyentes de las láminas suprabasales de la epidermis. Estas citoqueratinas están incluidas dentro de las citoqueratinas de alto peso molecular (34 E 12) junto con las citoqueratinas 5 y 14. La **citoqueratina 1** (CK 1) es una proteína cuya expresión es reconocida por el anticuerpo específico suprabasal. Es una citoqueratina de 65 a 68 KDa, que se expresa en epitelio escamoso queratinizado y es también un componente del complejo receptor del kininógeno en las células endoteliales. Es detectado por el anticuerpo monoclonal 34bB4. La **citoqueratina 10** (CK 10) es una citoqueratina ácida de tipo I de tamaño intermedio, con una masa molecular de 56,5 kDa, y que se expresa en todas las células suprabasales simultáneamente con la CK 1, estando ausente en las células basales. Juntas, la CK 1 y la CK 10 representan algunos de los primeros marcadores de la diferenciación epidérmica (Ivanyi y cols., 1989; Moll y cols., 1982). Se ha implicado a la CK 10 como marcador de las células más diferenciadas en los carcinomas de células escamosas (Maddox y cols., 1999; Ivanyi y cols., 1989). En las muestras de piel implantadas en los ratones atímicos la expresión de citoqueratinas 1 y 10, fue comparable a la expresión existente en las muestras de piel control. Estas similitudes de la pancitoqueratina y citoqueratina 1 y 10 con la piel humana control indica que la piel artificial puede reproducir las características funcionales del epitelio como barrera protectora que permite respuesta rápida a diferentes estímulos, ya que presentaba un estrato córneo completo (Presland y cols., 2002).
- ❖ Por otra parte, las **involucrininas** son proteínas que se expresan en epidermis y en carcinomas escamosos bien diferenciados y actúan como sustrato de una reacción enzimática catalizada por la transglutaminasa dando lugar a la formación del envoltorio queratinocitario. Las transglutaminasas son una familia de enzimas dependientes del calcio que incluyen: las transglutaminasas tisulares como la de localización epidérmica presente a nivel del estrato granuloso, la transglutaminasa del folículo piloso presente a nivel de la vaina folicular interna y en la médula del tallo pilar y finalmente a la protransglutaminasa (factor XIII) (Kubilus y cols., 1990). Las involucrininas son unas proteínas citoplasmáticas de 120 KDa del estrato escamoso y granular relacionadas con la queratinización, que se expresa en epidermis de piel humana por lo que nos puede ayudar a diferenciar entre queratinocitos de piel artificial y los queratinocitos de la piel del ratón (Kubilus y cols., 1990). En el estudio realizado en esta Tesis Doctoral, sí observamos cierta diferencia entre la piel control humana, en la que hallamos expresión de la proteína en estratos apicales del epitelio, y el sustituto de piel obtenida por ingeniería tisular que, para el día cuarenta tras el implante, tan solo muestra una expresión de la proteína a nivel del estrato córneo, pero suficiente para deducir que se trata de queratinocitos de piel humana.

- ❖ La **filagrina** es una proteína que es primero sintetizada como un gran precursor insoluble muy fosforilado, la cual contiene de 10-12 copias en tándem de 324 aminoácidos separados por cortas uniones peptídicas. Esta pro-filagrina (pro-filagrina) se deposita como gránulos de queratohialina y es desfosforilada y proteolíticamente escindida durante su diferenciación terminal. Por último, en el estrato córneo superior, la filagrina es eventualmente degradada hacia aminoácidos libres, los cuales mantienen la hidratación epidérmica. La filagrina humana ha mostrado un elevado y poco común grado de polimorfismo. De hecho, ésta consiste en una población de moléculas muy heterogénea con diversos tamaños, cargas y secuencia de aminoácidos. Por tanto, su punto isoeléctrico se reporta en un rango entre 7,2 y 9,4. La filagrina es una proteína epidérmica que une los filamentos intermedios de la queratina y promueve la formación de puentes disulfuros entre los filamentos intermedios durante la diferenciación terminal de la epidermis de los mamíferos, por lo que no se conoce la existencia de filagrina fuera del tejido epitelial (Girbal y cols., 1993). Así pues, podemos concluir que las células que muestran expresión en el sustituto de piel artificial son de carácter epitelial, con una expresión de dicha proteína muy similar al control de piel humana y, además, es específicamente marcadora de tejido epitelial humano, por lo que también nos ayuda a diferenciar entre epitelio de origen humano del epitelio de ratón. En nuestro caso, al presentar expresión de la proteína filagrina el epitelio, se puede deducir que éste es de origen humano.

Según lo que acabamos de exponer, los perfiles de expresión de citoqueratinas encontrados en los tejidos artificiales mostraron gran correlación con las características estructurales de estos tejidos. De esta manera, los sustitutos evaluados *in vivo* mostraron una organización histológica específica a nivel de la unión epitelio- estroma, y no se formaron las estructuras histológicas denominadas papilas coriales ni crestas epiteliales. Dichas estructuras cumplen una función importante en el mantenimiento de los aportes de oxígeno y nutrientes del estroma hacia el epitelio (Tsukinoki y cols., 2007). En otros estudios, como por ejemplo en el desarrollo de mucosa oral por ingeniería tisular (Alaminos, 2007; Sánchez-Quevedo, 2007) y en córnea obtenida mediante ingeniería tisular (Alaminos, 2006), el epitelio de las muestras implantadas en ratones atímicos (*in vivo*) sí presentaba papilas coriales y crestas epiteliales y esto es debido probablemente porque se encuentra sometido a un ligero grado de hipoxia, teniendo en cuenta la naturaleza avascular del epitelio. Por esta razón, este tipo de muestra ha desarrollado estas estructuras a través de interdigitaciones del epitelio hacia el estroma que permiten la nutrición y la oxigenación del epitelio. De esta manera, podemos deducir que las muestras desarrolladas en el laboratorio y sometidas a técnicas de cultivo en inmersión, la cual permite a las células epiteliales obtener oxígeno y nutrientes fácil y directamente del medio de cultivo, no necesitarían desarrollar estructuras como las crestas epiteliales y las papilas coriales. Del mismo modo, en las muestras analizadas en nuestro modelo experimental *in vivo* no se hallan estas estructuras a nivel dermoepidérmico, probablemente porque no se produjo este déficit de nutrición y oxigenación del epitelio, por el importante aporte vascular proveniente de un expandido tejido endotelial, que se apreciaba desde estadios precoces como se comentó previamente.

En resumen, en este trabajo hemos realizado un estudio profundo de la piel artificial humana generada mediante Ingeniería Tisular utilizando biomateriales de fibrina y agarosa, desde la selección de las células a utilizar para su fabricación, pasando por el análisis de su comportamiento *in vitro*, hasta un control de calidad de los tejidos implantados en ratones atímicos. Para esto, fue necesario desarrollar diversas técnicas microscópicas y de inmunofluorescencia que nos permitieron evaluar factores tan importantes como la proliferación celular, la existencia de patrones morfológicos de diferenciación, la expresión de citoqueratinas, involucrin y filagrina, la angiogénesis y la integración con tejidos del organismo receptor.

En su conjunto, todos estos resultados demuestran que la piel artificial obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular y matrices de fibrina y agarosa presenta numerosas similitudes, en el epitelio y en el estroma, con la piel humana normal, especialmente cuando ésta es implantada *in vivo*. Las diferentes pruebas realizadas demuestran la progresiva formación y maduración del epitelio, uniones celulares y matriz extracelular en los sustitutos de piel artificial obtenidos en el laboratorio.

De igual modo, la piel humana generada en esta Tesis Doctoral constituye un modelo de gran utilidad potencial para llevar a cabo multitud de pruebas de laboratorio sobre tejidos biológicos sin necesidad de utilizar animales de laboratorio. Esto incluye pruebas de toxicidad de fármacos, pruebas genéticas y fisiológicas, etc.

Por todo ello, creemos que nuestro modelo de piel artificial humana fabricado a partir de fibrina y agarosa podría ser útil en el tratamiento de diferentes patologías que afectan la normalidad de la piel. Estudios posteriores determinarán la utilidad de estos tejidos en la clínica humana.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. La aplicación de los métodos y técnicas descritos en esta Tesis Doctoral permitió aislar y mantener en cultivo los principales tipos de células que constituyen la piel humana: **queratinocitos** de la epidermis y **fibroblastos** de la dermis.
2. La utilización de biomateriales de **fibrina** y **agarosa** permitió elaborar en laboratorio un sustituto eficiente de piel humana mediante técnicas de Ingeniería Tisular. Estos sustitutos de la piel de espesor completo presentaban una adecuada consistencia, ausencia de contracción del sustituto estromal y una elevada supervivencia de los fibroblastos y queratinocitos en el seno del mismo.
3. La evaluación **clínica** del sustituto de piel humana obtenido mediante Ingeniería Tisular en un modelo animal demostró la utilidad y la viabilidad de este tipo de tejidos para la reparación quirúrgica de grandes defectos cutáneos de espesor completo. La piel generada en laboratorio mostró adecuados niveles de biocompatibilidad con el receptor y ausencia de cualquier signo de rechazo, dehiscencia o infección. Todos los animales mostraron la aparición de tejido de granulación tras seis días del implante, el cual dio paso a una cicatrización total a partir del vigésimo día.
4. La evaluación **histológica** de la piel humana artificial implantada en un modelo animal mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión y de barrido, reveló un alto grado de diferenciación tisular de la piel implantada, la cual mostró gran similitud con la piel humana nativa normal. Concretamente, la estructura de los injertos de piel humana artificial fue muy similar a la de la piel normal, existiendo múltiples capas de células epiteliales organizadas en estratos basal, espinoso, granuloso y córneo, así como un estroma rico en fibroblastos y matriz extracelular, con abundantes fibras de colágeno. De igual modo, desde el décimo día del implante se apreciaron numerosos vasos sanguíneos neoformados en el estroma del injerto de piel humana.
5. La evaluación mediante **inmunofluorescencia** del sustituto de piel humana obtenida mediante Ingeniería Tisular e implantado *in vivo* en un modelo animal puso de manifiesto la expresión de numerosos marcadores de la piel humana normal, destacando la expresión de citoqueratinas, involucrinas y filagrinas. Este hecho sugiere que los sustitutos de la piel humana generados en laboratorio podrían ser funcionalmente análogos a la piel humana normal y, por tanto, abren la puerta a un posible uso clínico de los mismos.

ANEXO

ANEXO 1

Servicio de Cirugía Plástica, Reparadora y Estética

Formulario de Consentimiento para la obtención de muestras de piel

• Identificación

• Nombre técnico de la intervención a realizar: _____

Tipo de anestesia: _____

B. Declaración del paciente _____

1. Se me han explicado satisfactoriamente la naturaleza y propósitos de la utilización de la donación de restos de piel. Ésta será estrictamente para cultivo en laboratorio y posterior ensayo clínico en animales para en un futuro servir de base para la utilización en humanos. Los queratinocitos y los fibroblastos serán obtenidos para su cultivo a partir de restos de piel humana colectadas asépticamente en intervenciones quirúrgicas de nuestro servicio en el hospital Virgen de las Nieves en Granada. A los donantes que cumplen con los criterios de selección no será necesario un control y seguimiento posterior ni tampoco la realización de nuevas pruebas. Los queratinocitos serán aislados y cultivados in vitro tomando como base la técnica descrita por Rheinwald y Green, la cual se fundamenta en cultivar las células epidérmicas sobre una monocapa de la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3 (cultivadas rutinariamente en medio DMEM, L-glutamina, antibióticos y 10% suero de ternera) u otra técnica similar, cuyas células han sido inactivadas para inhibir su multiplicación y usando un medio de cultivo complementado con diversos factores de crecimiento que estimulan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales aisladas.

Será realizado por el Dr. José María Jiménez Rodríguez o bajo su dirección y responsabilidad.

2. Doy mi consentimiento para que se me realicen las técnicas de laboratorio, descrita arriba y las operaciones complementarias con las muestras que sean necesarias o convenientes durante la realización de esta, a juicio de los profesionales que la llevan a cabo.

3. Doy mi consentimiento para que se cultive y se realice expansión de la muestra, así como las medidas complementarias que se estimen oportunas.

4. Doy mi consentimiento para que en la etapa de laboratorio y ensayo clínico participen, como ayudantes o auxiliares, estudiantes de medicina, médicos, profesores de la universidad u otros profesionales de la salud.

5. Que se pueden tomar fotografías o filmaciones de las muestras y que posteriormente pueden ser vistas por personal en formación de este u otro hospital. Doy mi consentimiento para que se tomen esas fotografías o videos. También doy mi consentimiento para todo este material sea publicado en artículos científicos o tesis doctoral. Pero debe cumplirse que: a) no se empleará ni el nombre del paciente ni el de su familia para identificar las fotos o videos; b) su uso se limitará a propósitos didácticos o investigadores.

• En cualquier caso deseo que se respeten las siguientes condiciones (si no hay, póngase "ninguna". Si no se acepta algunos de los otros puntos hágase constar) _____

_____ Firma del paciente .

C. Declaraciones y firmas:

• Cirujano responsable: he informado a este paciente del propósito y naturaleza de la utilización de las muestras obtenidas descrita arriba, y de los resultados que se esperan. _____

Firma del cirujano responsable

Dr. José María Jiménez Rodríguez

Relación de familiares: esposo, hijos, padres, hermanos, otros

D. Lugar y fecha: Hospital Virgen de las Nieves (Granada)

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:

1. Aberdam D. Derivation of keratinocyte progenitor cells and skin formation from embryonic stem cells. *Int J Dev Biol.* 2004;48(2-3):203-6. Review.
2. Akita S, Tanaka K, Hirano A. Lower extremity reconstruction after necrotising fasciitis and necrotic skin lesions using a porcine-derived skin substitute. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006;59(7):759-63. Epub 2006 Feb 21.
3. Alaminos M, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Aug;47(8):3311-7.
4. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 Sep-Oct;1(5):350-9.
5. Alexander D. Bach. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 9, No 3, 2005 pp. 592-608
6. Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 419-423.
7. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11830-5. Epub 2003 Aug 11. Review.
8. Amani H, Dougherty WR, Blome-Eberwein S. Use of Transcyte and dermabrasion to treat burns reduces length of stay in burns of all size and etiology. *Burns.* 2006 Nov;32(7):828-32. Epub 2006 Sep 25
9. Andreadis ST. Gene-modified tissue-engineered skin: the next generation of skin substitutes. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;103:241-74. Review.
10. Andreassi A, Bilenchi R, Biagioli M, D'Aniello C. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clin Dermatol.* 2005 Jul-Aug;23(4):332-7. Review.
11. Atala A. Tissue engineering and Regenerative medicine: Concepts for Clinical Application. *Rejuvenation Res* 2004; 7 (1): 15-31.
12. Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns.* 2007 Jun;33(4):405-13. Epub 2007 Apr 2. Review.
13. Bach AD, Bannasch H, Galla TJ, Bittner KM, Stark GB. Fibrin glue as matrix for cultured autologous urothelial cells in urethral reconstruction. *Tissue Eng.* 2001 Feb;7(1):45-53.
14. Baker, SR. and Neil, AS. Local flaps in facial reconstruction. Ed.Mosby. 1995. Pag.15.
15. Bass MJ, Phillips LG. Pressure sores. *Curr Probl Surg.* 2007 Feb;44(2):101-43. Review.
16. Beauchamp JR, Heslop L, Yu DS, Tajbakhsh S, Kelly RG, Wernig A, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000; 151:1221-1234.
17. Bejarano PA, Levi D, Nassiri M, Vincek V, Garcia M, Weppler D, Selvaggi G, Kato T, Tzakis A. The Pathology of full-thickness cadaver skin transplant for large abdominal defects: a proposed grading system for skin allograft acute rejection. *Am J Surg Pathol.* 2004 May;28(5):670-5.
18. Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993a; 165 (6): 728-737.
19. Bennet NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993b; 166(1). 74-81.
20. Berman B, Viera MH, Amini S, Huo R, Jones IS. Prevention and management of hypertrophic scars and keloids after burns in children. *J Craniofac Surg.* 2008 Jul;19(4):989-1006. Review.
21. Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts and myofibroblasts. *Plastic Recons Surg* 1998; 102:12431.
22. Bianchi G, Muraglia A, Daga A, Corte G, Cancedda R, Quarto R. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound Rep Reg* 2001; 9: 460-466
23. Bilkay U, Helvacı E, Tokat C, Ozek C, Akin Y. Surgical coverage technics of pressure sores and their outcomes. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2006 Apr;12(2):143-9
24. Bishop AE, Buttery LDK, Polak JM. Embryonic stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 424-429.
25. Bjercknes M, Chen H. Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:767-777.
26. Boucard, N., Viton, C., Agay, D., Mari, E., Roger, T., Chancerelle, Y., Domard, A. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials* 28, 3478, 2007.
27. Brambring T, Rempel R. Tangential skin graft *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007 Jan;5(1):58-60. German.
28. Branski LK, Pereira CT, Herndon DN, Jeschke MG. Gene therapy in wound healing: present status and future directions. *Gene Ther.* 2007 Jan;14(1):1-10. Epub 2006 Aug 24. Review.

29. Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya IV, Folkesson HG, Pittet JF, Nishimura SL, Aldape K, Landers DV, Carpenter W. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 1995; 108: 22412251
30. Burd A, Ahmed K, Lam S, Ayyappan T, Huang L. Stem cell strategies in burns care. *Burns*. 2007 May;33(3):282-91. Epub 2007 Feb 27. Review.
31. Butler PD, Longaker MT, Yang GP. Current progress in keloid research and treatment. *J Am Coll Surg*. 2008 Apr;206(4):731-41. Epub 2008 Feb 1. Review. No abstract available.
32. Cadic-Amadeuf CM, Vitiello S, Baquey CV, Dupuy BJ. Inflammatory reaction induced by agarose implants reduced by adding adrenal cells to the polymer. *ASAIO J*. 1992 Jul-Sep;38(3):M386-9.
33. Cairns BA, deSerres S, Brady BA, Hultman CS, Meyer AA (1995). Xenogenic mouse fibroblasts persist in human cultured epidermal grafts: a possible
34. Cairois MA. La ulceración venosa y arterial de los miembros inferiores. *Edika Med*. Barcelona 2002.
35. Calderon Valle, CW., Calderon Valle, R. Cultivo de queratinocitos humanos en monocapa. *Revista Boliviana de Dermatología*. Nº 1 • VOL 1. (2002)
36. Calderon W, Borel C, Roco H, Pineros JL, Olguin F. Primary closure of donor site in anterolateral cutaneous thigh free flap. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7):2528-9.
37. Caliano C. Pressure ulcers in acute care: a quality issue. *Nurs Manage*. 2007 May;38(5):42-51. Review.
38. Campos A. Cuerpo, Histología y Medicina. De la descripción microscópica a la Ingeniería Tisular. Discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Medicina Española. Instituto de España. Real Academia Nacional de Medicina. 17 de Febrero 2004.
39. Canter HI, Vargel I, Nasir S, Kayikcioglu A. Use of a water-vapour permeable polyurethane film (omiderm) in the non-surgical treatment of aplasia cutis congenita. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2004;38(4):232-5.
40. Carrascal E. *Histología Humana I*. Salamanca: Librería Cervantes, 2001. Pág 269
41. 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 Jan-Feb;25(1):89-97.
42. Casasco A, Casasco M, Zerbinati N, Icaro Cornaglia A, Calligaro A. Cell proliferation and differentiation in a model of human skin equivalent. *Anat Rec*. 2001 Nov 1;264(3):261-72.
43. Catania K, Huang C, James P, Madison M, Moran M, Ohr MWound wise: PUPPI: the Pressure Ulcer Prevention Protocol Interventions. *Am J Nurs*. 2007 Apr;107(4):44-52; quiz 53.
44. Cheema TA, Saleh ES, De Carvalho AF. The distally based sural artery flap for ankle and foot coverage. *J Foot Ankle Surg*. 2007 Jan-Feb;46(1):40-7.
45. Chen M, et al. An efficient gene transduction system for studying gene function in primary human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28:193-199.
46. Cheng LF, Lee JT, Sun TB, Wang CH, Chien SH, Chang BS. Reconstruction of trunk defects with bilobed myocutaneous flap. *Br J Plast Surg*. 2005 Jul;58(5):652-7.
47. Chinnathambi S, Tomanek-Chalkley A, Ludwig N, King E, DeWaard R, Johnson G, Wertz PW, Bickenbach JR. Recapitulation of oral mucosal tissues in long-term organotypic culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003 Feb;270(2):162-74.
48. Christiano AM, Lebowitz MG, Boyd CD, Uitto J. Workshop on pseudoxanthoma elasticum: molecular biology and pathology of the elastic fibers. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 660663.
49. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):403-34. Review.
50. Clark RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum, 1996.
51. Clayman MA, Clayman SM, Mazingo DW. The use of collagen-glycosaminoglycan copolymer (Integra) for the repair of hypertrophic scars and keloids. *J Burn Care Res*. 2006 May-Jun;27(3):404-9.
52. Clemmensen, T. The early circulation in split-skin grafts. Restoration of blood supply to split-skin autografts. *Acta Chir Scand*, 127:1, 1964.
53. Compton CC, Gill JM, Bradford DA, Regauer S, Gallico GG, O'Connor NE. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab Invest* 1989; 60(5):600-612.
54. Cormack G.C. and Lamberty B.G.H., *The arterial anatomy of skin flaps* (2nd ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh (1994), pp. 1-538.
55. Cotran R, Kumar V, Collins T. Reparación de los tejidos, proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: *Patología estructural y funcional*: Mc Graw Hill Interamericana, 2000 pp 95120.
56. Crijs MB, Klaver C, de Boer A, Van Hees C, Vermeer BJ, Vandembroucke J, Bergman W. Ultraviolet exposure and the development of banal and atypical naevi-a cross-sectional study on Curacao and in The Netherlands. *Melanoma Res* 1997; 7: 407-416.
57. Cruz PD. The epidermis: an outpost of the immune system. En: *Frienkel RK, Woodley DT. The biology of the skin*. New York: Parthenon publishing, 2001. Pp255263.

58. Dabernig J, Watson S. Flap skin as a donor site for split skin grafts. *Ann Plast Surg*. 2005 Oct;55(4):439-40.
59. Dai, N.T., Williamson, M.R., Khammo, N., Adams, E.F., Coombes, A.G. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin. *Biomaterials* 25, 4263, 2004.
60. Dantzer E, Queruel P, Salinier L, Palmier B, Quinot JF. Dermal regeneration template for deep hand burns: clinical utility for both early grafting and reconstructive surgery. *Br J Plast Surg*. 2003 Dec;56(8):764-74.
61. Dedmond BT, Davids JR. Function of skin grafts in children following acquired amputation of the lower extremity. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 May;87(5):1054-8.
62. Del Rio M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Muñoz M, Garcia M, Muñoz E, Martin C, Bernad A, Jorcano JL. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther*. 2002 May 20;13(8):959-68.
63. Delmonico, F.J. and Cosimi, A.B. Temporary skin trasplation for the treatment. *N.Y.State.J.Med.* ,81:1689,1981
64. Demling RH, DeSanti L. Management of partial thickness facial burns (comparison of topical antibiotics and bio-engineered skin substitutes). *Burns*. 1999 May;25(3):256-61.
65. Demling RH, Leslie DeSanti MD. The rate of re-epithelialization across meshed skin grafts is increased with exposure to silver. *Burns*. 2002 May;28(3):264-6.
66. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. TGF induces smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblast. *J Cell Biol* 1993; 122: 10311.
67. Dhouailly, D, Oivera-Martinez, I., Fliniaux, G., Missier, S., Viallet, JP. and Thelu, J. Skin field formation: morphogenetic events *Int. J. Dev. Biol.* 48: 85-91 (2004)
68. Ding, W., L. Zhang, Z. Yan, J.F. Engelhardt (2005) Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 12: 873– 880.
69. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-97.
70. Dourov N. Scanning electron microscopy contribution in oral pathology. *Scan Electron Microsc.* 1984;(Pt 1):243-8.
71. Eldar R. Prevention of pressure sores: a topic for quality of care improvement. *Croat Med J*. 2002 Jun;43(3):361-3. Review
72. El-Ghalbzouri A, Van Den Bogaerdt AJ, Kempenaar J, Ponc M. Human adipose tissue-derived cells delay re-epithelialization in comparison with skin fibroblast in organotypic skin culture. *Br J Dermatol* 2004; 150: 444-454.
73. Elias BG, Meunier DI, Squifflet JP, Marot L, Weynand B, VanWijck RR, Bayet B. Immunologic tolerance to skin allograft after graft-versus-host disease. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Mar;119(3):40e-44e.
74. Falke GF, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr* 2000; 98(2):103-114.
75. Fernández-Herrera J, Peñas PF. Técnica del cultivo de queratinocitos. Protocolo del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, 1990.
76. Fernández-Segura E, Cañizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electrón probe X-ray microanálisis. *Exp. Cell. Res.* 1999; 253:454-462.
77. Fimiani M, Pianigiani E, Di Simplicio FC, Sbano P, Cuccia A, Pompella G, De Aloe G, Petraglia F. Other uses of homologous skin grafts and skin bank bioproducts. *Clin Dermatol*. 2005 Jul-Aug;23(4):396-402. Review.
78. Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)* 2002 a; 103: 355-369.
79. Fuchs E. Beauty is skin deep: the fascinating biology of the epidermis and its appendages. *Harvey Lectures Series* 2001; 94: 4777.
80. Gallico G, O'Connor EN, Compton CC, Kehrade O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-451.
81. Garcia C, Haque R, Poletti E. Surgical pearl: artificial skin model for simulation of flap mechanics. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Jul;53(1):143-4.
82. Garlick JA, Taichman LB. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. *Lab Invest* 1994; 70(6): 91624.
83. Garlick JA. Engineering skin to study human disease--tissue models for cancer biology and wound repair. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;103:207-39. Review.
84. Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, Campos A, Alaminos M. In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *Journal of Periodontal Research*. 2009 (en prensa).
85. Gerecht-Nir S, Ziskind A, Cohan S, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells as in vitro model for human vascular development and the induction of vascular differentiation. *Lab Invest* 2003; 83; 1811- 1820.
86. Geroski DH, Hadley A. Characterization of corneal endothelium cell cultured on microporous membrane filters. *Curr Eye Res*. 1992 Jan;11(1):61-72.
87. Ghali S, Butler PE, Tepper OM, Gurtner GC. Vascular delay revisited. *Plast Reconstr Surg*. 2007 May;119(6):1735-44. Review.

88. Gilbert PA, et al. On line measurement of green fluorescent protein (GFP) fluorescence for the monitoring of recombinant adenovirus production. *Biotechnol Lett.* 2000;22:561-567.
89. Gingras, M., Paradis, I., Berthod, F. Nerve regeneration in a collagen-chitosan tissue-engineered skin transplanted on nude mice. *Biomaterials* 24, 1653, 2003.
90. Girbal E, Sebbag M, Gomesdaudrix V, Simon M, Vincent C, Serre G. Characterization of the rat esophagus epithelium antigens defined by the so-called antikeratin antibodies, specific for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993;52:749-57.
91. Goessler UR, Riedel K, Hormann K, Riedel F. Perspectives of gene therapy in stem cell tissue engineering. *Cells Tissues Organs.* 2006;183(4):169-79. Review.
92. Goetinck PF, Winterbottom N. Proteoglycans: molecular macromolecules of the extracellular matrix. In: Goldsmith LA (ed) *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991. Pp 558575.
93. Goetzl EJ. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996; 156: 18.
94. Grey JE, Harding KG, Enoch S. Pressure ulcers. *BMJ.* 2006 Feb 25;332(7539):472-5. Review
95. Grinell F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci* 1992; 101 (1): 15.
96. Grounds MD, Garrett KL, Lai MC, Wright WE, Beilharz MW. Identification of muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tiss Res* 1992; 267: 99-104.
97. Haake A, Scott GA, Holbrook KA. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. En: Freinkel RK, Woodley DT. *The biology of the skin*. New York: Parthenon Publishing, 2001. Pp 113131.
98. Haapasalmi K, Zhang K, Tonnesen M, Olerud J, Sheppard D, Salo T, Kramer R, Clark RA, Uitto VJ, Larjava H. Keratinocytes in human wounds express alpha v beta 6 integrin. *J Invest Dermatol* 1996; 106(1): 4248.
99. Hagsisawa S, Barbenel J. Limits of [pressure sobre prevention. *J R Soc Med.* 1999 Nov;92(11):576-8.
100. Han SK, Yoon TH, Kim JB, Kim WK. Dermis graft for wound coverage. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Jul;120(1):166-7
101. Harding KG, Morris G, Patel GK. Healing chronic wounds. *BMJ* 2002; 324: 160-163.
102. Harlan DM, Kirk AD. The future of organ and tissue transplantation: can T-cell co-stimulatory pathway modifiers revolutionize the prevention of graft rejection? *J Am Med Assoc* 1999; 282: 1076-1082.
103. Hartmann. Las heridas y su tratamiento. www.úlceras.net/la_piel.htm 1999.
104. Hauser C, Elbe A, Stingl E. The Langerhans'cell. En: Goldsmith LA (ed.) *physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991. Pp144163.
105. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111 (2):754-753.
106. Hewitt HB. Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA mice. *Br J Cancer* 1958; 12: 378-401.
107. Hierner R, Degreef H, Vranckx JJ, Garmyn M, Massagé P, van Brussel M. Skin grafting and wound healing-the "dermatoplastic team approach". *Clin Dermatol.* 2005 Jul-Aug;23(4):343-52. Review..
108. Hirsch T, von Peter S, Dubin G, Mittler D, Jacobsen F, Lehnhardt M, Eriksson E, Steinau HU, Steinstraesser L. Adenoviral gene delivery to primary human cutaneous cells and burn wounds. *Mol Med.* 2006 Sep-Oct;12(9-10):199-207.
109. Hochman B, Locali RF, Matsuoka PK, Ferreira LM. ntralesional triamcinolone acetonide for keloid treatment: a systematic review. *Aesthetic Plast Surg.* 2008 Jul;32(4):705-9. Epub 2008 Apr 17. Review.
110. Holder IA, Durkee P, Supp AP, Boyce ST. Assessment of a silver-coated barrier dressing for potential use with skin grafts on excised burns. *Burns.* 2003 Aug;29(5):445-8.
111. Honrado CP, Murakami CS. Wound healing and physiology of skin flaps. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2005 May;13(2):203-14, v. Review.
112. Horch RE, Jeschke MG, Spilker G, Herndon DN, Kopp J. Treatment of second degree facial burns with allografts--preliminary results. *Burns.* 2005 Aug;31(5):597-602. Epub 2005 Mar 21.
113. Hu S, Kirsner RS, Falanga V, Phillips T, Eaglstein WH. Evaluation of Apligraf persistence and basement membrane restoration in donor site wounds: a pilot study. *Wound Repair Regen.* 2006 Jul-Aug;14(4):427-33.
114. Hulsenboom MA, Bours GJ, Halfens RJ. Knowledge of pressure ulcer prevention: a cross-sectional and comparative study among nurses. *BMC Nurs.* 2007 Mar 9;6:2.
115. Hwang JH, Kim ES, Kim KS, Kim DY, Lee SY. Latissimus dorsi muscle and its short perforator-based skin compound free flap. *Ann Plast Surg.* 2007 Apr;58(4):381-7.
116. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface.* 2006 Oct 22;3(10):589-601. Review.
117. Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng.* 2006 Jun;34(6):971-85. Epub 2006 May 24.
118. Ivanyi D, Asink A, Groeneveld E, Hageman PC, Mooi WJ, Heintz APM. New monoclonal antibodies recognizing epidermal differentiation-associated keratins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Keratin 10 expression in carcinoma of the vulva. *J Pathol* 1989;159:7-12.
119. Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE. Development and characterization of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent produced in a serum-free culture system. *J Dent Res.* 2000 Mar;79(3):798-805.

120. Jandera, V., D.A. Hudson, P.M. de Wet, P.M. Innes and H. Rode, Cooling the burn wound: evaluation of different modalities, *Burns* 26 (2000), pp. 265–270.
121. Janes SM, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 479491.
122. Jayasinghe SN. Cell engineering: spearheading the next generation in healthcare. *Biomed Mater*. 2008 Sep;3(3):034004. Epub 2008 Aug 8. Review.
123. Jeng JC, Fidler PE, Sokolich JC, Jaskille AD, Khan S, White PM, Street JH 3rd, Light TD, Jordan MH. Seven years' experience with Integra as a reconstructive tool. *J Burn Care Res*. 2007 Jan-Feb;28(1):120-6.
124. Jiménez PA, Jiménez SE. Tissue and cellular approaches to wound repair. *Am J Surg* 2004; 187: 56S64S.
125. Johnson LF, deSerres S, Herzog S, Peterson HD, Meyer AA (1991). Antigenic cross-reactivity between media supplements for cultured keratinocyte grafts. *Burn Care Rehabil* 12:306-312.
126. Johnson TM, Ratner D, Nelson BR. Soft tissue reconstruction with skin grafting *J Am Acad Dermatology* 1992;27:151–65.
127. Jones JE, Nelson EA. Skin grafting for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Apr 18;(2):CD001737. Review.
128. Jones KR, Fennie K. Factors influencing pressure ulcer healing in adults over 50: an exploratory study. *J Am Med Dir Assoc*. 2007 Jul;8(6):378-87. Epub 2007 Jun 14.
129. Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 1995 a; 80: 8393.
130. Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *J Biochem* 1996; 316: 111.
131. Karyoute SM, Badran IZ. Tetanus following a burn injury. *Burns Incl Therm Inj* 1988;14:241-3.
132. Kashiwa N, Ito O, Ueda T, Kubo K, Matsui H, Kuroyanagi Y. Treatment of full-thickness skin defect with concomitant grafting of 6-fold extended mesh auto-skin and allogeneic cultured dermal substitute. *Artif Organs*. 2004 May;28(5):444-50.
133. Kaufman AJ. Adjacent-tissue skin grafts for reconstruction. *Dermatol Surg*. 2004 Oct;30(10):1349-53.
134. Kian Kwan Oo K, Chen Ong W, Hui Chi Ang A, Hutmacher DW, Kim Siang Tan L. Tissue engineered prefabricated vascularized flaps. *Head Neck*. 2007 May;29(5):458-64.
135. Kidd RL, Krawczyk WS, Wilgram GF. The Merkel cell in human epidermis: its differentiation from other dendritic cells. *Arch Dermatol Forsch* 1971; 241(4): 37484.
136. Kierszenbaum AL. *Histology and cell biology: an introduction to pathology*, 2002. Pág 307.
137. Kim DM, Schwerdtner O, Schmidt-Westhausen AM, Kage A, Klein M. Cultured epithelial autografts in the treatment of facial skin defects: clinical outcome. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Mar;65(3):439-43.
138. Kim SS, Gwak SJ, Choi CY, Kim BS. Skin regeneration using keratinocytes and dermal fibroblasts cultured on biodegradable microspherical polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Nov;75(2):369-77.
139. Koller R, Bierochs B, Meissl G, Rab M, Frey M. The use of allogeneic cultivated keratinocytes for the early coverage of deep dermal burns - indications, results and problems. *Cell Tissue Bank*. 2002;3(1):11-4.
140. Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 2000; 289: 1754-1757.
141. Kubilus SB, Phillips SB, Goldaber JC, Kvedar JC. Involucrin-like proteins in non-primates. *J Investigative Dermatology*, 1990;94: 210-215.
142. Kullaa-Mikkonen A. Scanning electron microscopic study of surface of human oral mucosa. *Scand J Dent Res*. 1986 Feb;94(1):50-6.
143. Kullaa-Mikkonen A. Scanning electron microscopy in oral mucosal research: a review. *Scanning Microsc*. 1987 Sep;1(3):1145-55. Review.
144. Kumar RJ, Kimble RM, Boots R, Pegg SP. Treatment of partial-thickness burns: a prospective, randomized trial using Transcyte. *ANZ J Surg*. 2004 Aug;74(8):622-6.
145. Lampkin BD. Cell Kinetics as related to treatment of patients with acute nonlymphoid leukaemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1985; 7: 358-372.
146. Lang EM, Eiberg CA, Brandis M, Stark GB. Biobrane in the treatment of burn and scald injuries in children. *Ann Plast Surg*. 2005 Nov;55(5):485-9.
147. Laser treatment of keloids and hypertrophic scars. Bouzari N, Davis SC, Nouri K. *Int J Dermatol*. 2007 Jan;46(1):80-8. Review.
148. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers and location. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1347313475.
149. Leatherbarrow B, Watson A, Wilcsek G. Use of the pericranial flap in medial canthal reconstruction: another application for this versatile flap.
150. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975; 78(1): 71100.
151. Leibovitch I, Huilgol SC, Hsuan JD, Selva D. Incidence of host site complications in periocular full thickness skin grafts. *Br J Ophthalmol*. 2005 Feb;89(2):219-22.

152. Limat A, French LE, Blal L, Saurat JH, Hunziker T, Salomon D. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J Am Acad Dermatol.* 2003 Feb;48(2):207-14.
153. Liu Y, Suwa F, Wang X, Takemura A, Fang YR, Li Y, Zhao Y, Jin Y. Reconstruction of a tissue-engineered skin containing melanocytes. *Cell Biol Int.* 2007 Sep;31(9):985-90. Epub 2007 Mar 20.
154. Liu, H., Yin, Y., Yao, K. Construction of chitosan-gelatinhyaluronic acid artificial skin in vitro. *J Biomater Appl* 21, 413, 2007.
155. Llamas S, Garcia E, Garcia V, Del Rio M, Larcher F, Jorcano JL, López E, Holgin P, Miralles F, Otero J, Meana A. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank* 2006; 7: 4753.
156. Llamas SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguín P, Meana A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation.* 2004 Feb 15;77(3):350-5.
157. Lu S, Xiang J, Qing C, Jin S, Liao Z, Shi J. Effect of necrotic tissue on progressive injury in deep partial thickness burn wounds. *Chin Med J (Engl).* 2002 Mar;115(3):323-5.
158. Lu S, Xiang J, Qing C, Jin S, Liao Z, Shi J. Use of the extended V-Y latissimus dorsi myocutaneous flap for chest wall reconstruction in locally advanced breast cancer. *Ann Thorac Surg.* 2006 Aug;82(2):752-5.
159. Maddox P, Sasieni iP, Szarewski A, Anderson M, Hanby A. Differential expression of keratins 10, 17, and 19 in normal cervical epithelium, cervical intraepithelial neoplasia, and cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1999;52:41-6.
160. Magnusson M, Papini RP, Rea SM, Reed CC, Wood FM. Cultured autologous keratinocytes in suspension accelerate epithelial maturation in an in vivo wound model as measured by surface electrical capacitance. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Feb;119(2):495-9.
161. Mann R, Heimbach D. Prognosis and treatment of burns. *West J Med.* 1996 Oct;165(4):215-20. Review.
162. Margulis A, Zhang W, Garlick JA. In vitro fabrication of engineered human skin. *Methods Mol Biol.* 2005;289:61-70.
163. Martin GR. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* 1980; 209:768-76.
164. Martin P. Wound healing. The aim for perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276:7581.
165. Martineau L, Shek PN. Evaluation of a bi-layer wound dressing for burn care I. Cooling and wound healing properties. *Burns.* 2006 Feb;32(1):70-6. Epub 2005 Dec 27.
166. Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Fuzina NH, Norhayati MM, Fauziah O, Isa MR, Saim L, Ruszymah BH. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns.* 2007 May;33(3):355-63. Epub 2007 Feb 26.
167. McCarthy, M.D. *Plastic Surgery.* Ed. Saunders. 1990. Pag.221.
168. McKee PH, Calonje E, Granter SR. Pathology of the skin. En: *The structure and function of skin: Elsevier mosby, third edition, vol I, 2005.* Pp 136.
169. Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal S, Fresno MF, Martin C, San Roman F, Tevar F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast containing fibrin gels. *Burns* 1998; 24: 621-630.
170. Mendez-Eastman S. Full-thickness skin grafting: a procedural review. *Plast Surg Nurs.* 2004 Apr Jun;24(2):41-5; quiz 46-7.
171. Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface.* 2007 Jun 22;4(14):413-37. Review.
172. Mis B, Rolland E, Ronfard V. Combined use of a collagen-based dermal substitute and a fibrin-based cultured epithelium: a step toward a total skin replacement for acute wounds. *Burns.* 2004 Nov;30(7):713-9.
173. Miyata S, Tateishi T, Ushida T. Influence of cartilaginous matrix accumulation on viscoelastic response of chondrocyte/agarose constructs under dynamic compressive and shear loading. *J Biomech Eng.* 2008 Oct;130(5):051016.
174. Moiemens NS, Vlachou E, Staiano JJ, Thawy Y, Frame JD. Reconstructive surgery with Integra dermal regeneration template: histologic study, clinical evaluation, and current practice. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun;117(7 Suppl):160S-174S.
175. Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11-24.
176. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992; 140:427-47.
177. Montalvo I. Pressure ulcer prevention. *Am J Nurs.* 2007 Jul;107(7):15.
178. Moreu G, Sánchez-Quevedo MC, López-Escámez JA, González-Jaranay M, Campos A. Cell surface patterns in normal human oral gingival epithelium. A quantitative scanning electron microscopy approach. *Histol Histopathol.* 1993 Jan;8(1):47-50.
179. Morgan ED, Bledsoe SC, Barker J. Ambulatory management of burns. *Am Fam Physician.* 2000 Nov 1;62(9):2015-26, 2029-30, 2032. Review.
180. Moroi Y, Fujita S, Fukagawa S, Mashino T, Goto T, Masuda T, Urabe K, Kubo K, Matsui H, Kagawa S, Kuroyanagi Y, Furue M. Clinical evaluation of allogeneic cultured dermal substitutes for intractable skin ulcers after tumor resection. *Eur J Dermatol.* 2004 May-Jun;14(3):172-6.
181. Morris AMG, Stevenson JH, Watson ACH. *Complications of plastic surgery.* Ed. Bailliere Tindall. 1989. pag 413.
182. Morris RJ, Coulter K, Tryson K, Steinberg SR. Evidence that cutaneous carcinogen- initiated epithelial cells from mice are quiescent rather than actively cycling. *Cancer Res* 1997; 15: 3436-3643.

183. Munster AM, Weiner SH, Spence RJ. Cultured epidermis for coverage of massive burn wounds. A single center experience. *Ann Surg* 1990; 211: 676-680.
184. Nakajima H, Imanishi N, Fukuzumi S, Minabe T, Aiso S, Fujino T. "Accompanying arteries of the cutaneous veins and cutaneous nerves in the extremities: anatomical study and a concept of the venoadipofascial and/or neuroadipofascial pedicled fasciocutaneous flap". *Plast Reconstr Surg*. 1998 Sep;102(3):779-91.
185. Nanney LB. Epidermal and dermal effects of epidermal growth factor during wound repair. *J Invest Dermatol* 1990; 6249.
186. Ng KW, Hutmacher DW. Reduced contraction of skin equivalent engineered using cell sheets cultured in 3D matrices. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(26):4591-8. Epub 2006 May 23.
187. Niyonsaba F, Ogawa H. Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents β defensins, cathelicidin LL37 and lysozyme. *J Dermatol Sci* 2005; 40 (3): 157168.
188. Nolan K, Millet Y, Ricordi C, Stabler CL. Tissue engineering and biomaterials in regenerative medicine. *Cell Transplant*. 2008;17(3):241-3. Review.
189. Norazril, S.A., Aminuddin, B.S., Norhayati, M.M., Mazlyzam, A.L., Fauziah, O., Ruszymah, B.H. Comparison of chitosan scaffold and chitosan-collagen scaffold: a preliminary study. *Med J Malaysia* 59, 186, 2004.
190. O'Connor NE, Gallico GG, Compton CC, Briggs S, Orlandi C, Frassetto A, Gnucci E, Lehmann JR, Neri R, Melandri D. Treatment of acute post-transfusion- graft-versus-host disease (GVHD) with intravenous human immunoglobulins: a case report. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006 Jul;20(6):760-1
191. Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng*. 2000 Aug;6(4):307-19.
192. Otto WR, Nanchahal J, Lu QL, Boddy N, Dover R. Survival of allogenic cells in cultured organotypic skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 1995; 96: 166-176.
193. Pancorbo-Hidalgo PL, García-Fernández FP, López-Medina IM, López-Ortega J. Pressure ulcer care in Spain: nurses' knowledge and clinical practice. *J Adv Nurs*. 2007 May;58(4):327-38. Epub 2007 Apr 17.
194. Papini R. Management of burn injuries of various depths. *BMJ*. 2004 Jul 17;329(7458):158-60. West Midlands Regional Burn Unit, Selly Oak University Hospital, Birmingham
195. Park DH, Borlongan CV, Eve DJ, Sanberg PR. The emerging field of cell and tissue engineering. *Med Sci Monit*. 2008 Nov;14(11):RA206-20. Review.
196. Pearl, RM: and Johnson, D. The vascular supply of the skin. An anatomical and physiological reappraisal, part 1, *Ann. Plast. Surg*. 11 (1983), pp. 99–105.
197. Peretti GM, Xu JW, Bonassar LJ, Kirchoff CH, Yaremchuk MJ, Randolph MA. Review of injectable cartilage engineering using fibrin gel in mice and swine models. *Tissue Eng*. 2006 May;12(5):1151-68. Review.
198. Perry RJ, Moore CA, Morgan DB, Plummer DL. Determining the approximate area of a burn: an inconsistency investigated and re-evaluated. *BMJ* 1996;312:1338.
199. Place, M., Herber, S.C. and Hardsly, R.A. "Skin grafts". In *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. Sección I, 1996.
200. Pomahac, B., Svensio, T., Yao, F., Brown, H., Eriksson, E. Tissue engineering of skin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 9(3):333-344 (1998)
201. Potten CS, Morris RJ. Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci (suppl)* 1988; 10:4562.
202. Poulosom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002; 197: 441-456.
203. Presnell SC, Petersen B, Heidaran M. Stem cells in adult tissues. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 369-376
204. Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008 Mar;14(1):105-18.
205. Rab M, Koller R, Ruzicka M, Burda G, Kamolz LP, Bierochs B, Meissl G, Frey M Should dermal scald burns in children be covered with autologous skin grafts or with allogeneic cultivated keratinocytes?--"The Viennese concept". *Burns*. 2005 Aug;31(5):578-86. Epub 2005 Feb 19..
206. Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev. Biol* 2003; 19:1-22.
207. Raine, TJ, JP Heggors, M.C. Robson, M.D. London and L. Johns, Cooling the burns to maintain microcirculation, *J Trauma* 21 (1981), pp. 394–397.
208. Ramakrishnan VV. Perforator flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59(6):569-70. Epub 2006 Mar 13.
209. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing. Dev* 2001; 122 (7):713-734.
210. Ratner D. Skin grafting. From here to there. *Dermatol Clin* 1998;16:75–90.
211. Raymond E. Horch*, Jürgen Kopp, Ulrich Kneser, Justus Beier, Reinisch, JF. The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon, *Plast. Reconstr. Surg*. 54 (1974), pp. 585–598.
212. Reichl S, Bednarz J, Müller-Goymann CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol*. 2004 Apr;88(4):560-5.
213. Reichl S, Muller-Goymann CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int. J. Pharm.* 2003; 250:191.

214. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 1963; 17:208-12.
215. Remensnyder I (1990). Long term results in major pediatric burns treated with cultured epithelial autografts (abstract). *Proc Am Burn Assoc* 22:174.
216. Rheinwald JG, Green H (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-344.
217. Richard NR, Anderson JA, Weiss JL, Binder PS. Air/liquid corneal organ culture: a light microscopic study. *Curr Eye Res.* 1991 Aug;10(8):739-49.
218. Robles DT, Moore E, Draznin M, Berg D. Keloids: pathophysiology and management. *Dermatol Online J.* 2007 Jul 13;13(3):9. Review.
219. Rocha JA, Miranda MJ, Andrade MJ. Pressure ulcer management--Evidence-based interventions. *Acta Med Port.* 2006 Jan-Feb;19(1):29-38. Epub 2006 Apr 30. Review. Portuguese.
220. Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 1994; 76 (6):1063-1073.
221. Rodríguez Morata A. Microscopía electrónica analítica de la célula endotelial. Sistematización de los patrones microscópicos y microanalíticos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2005.
222. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2004.
223. Rudland PS. Stem cells and the development of mammary cancers in experimental rats and in humans. *Cancer Metastasis Rev* 1987; 6: 55-83
224. Rudolph, R and ballantyne, D.L. Skin grafts. In *McCarthy Plastic Surgery*. Vol. I. Ed: W.Saunders Staff. 1990
225. Rue LW, Cioffi WG, Mc Manus W, Pruitt BA. Wound closure and outcome in extensively burned patients treated with cultures autologous keratinocytes. *J Trauma* 1993; 34: 662-668.
226. Rzepka K, Schaarschmidt G, Nagler M, Wohlrab J. [Epidermal stem cells] *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005 Dec;3(12):962-73. Review
227. Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, Campos A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 2007 Jun;22(6):631-40.
228. Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, Campos A, García JM, González-Jaranay M. Regional differences in cell surface patterns in normal human sulcular epithelium. *Histol Histopathol.* 1994 Jan;9(1):149-53.
229. Saulis A, Mustoe TA. Models of wound healing in growth factor studies. *Surgical Research* 2001; 62: 857873.
230. Schechner JS, Crane SK, Wang F, Szeglin AM, Tellides G, Lorber MI, Bothwell AL, Pober JS. Engraftment of a vascularized human skin equivalent. *FASEB J.* 2003 Dec;17(15):2250-6.
231. Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1999 Mar;112(3):343-53.
232. Schwarz RJ. Management of postburn contractures of the upper extremity. *J Burn Care Res.* 2007 Mar-Apr;28(2):212-9. Review.
233. Singer AJ, Brebbia J, Soroff HH. Department of Emergency Medicine, Stony Brook University, HSC L3-058, Stony Brook, NY 11794-8350, USA.
234. Singer AJ, Brebbia J, Soroff HH. Management of local burn wounds in the ED. *Am J Emerg Med.* 2007 Jul;25(6):666-71. Department of Emergency Medicine, Stony Brook University, HSC L3-058, Stony Brook, NY 11794-8350, USA.
235. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.
236. Slavin J. The role of cytokines in wound healing. *J Pathol* 1996, 178: 510.
237. Smith DM. Management of postburn contractures of the upper extremity. *J Burn Care Res.* 2007 Mar-Apr;28(2):212-9. Review.
238. Southgate J, Williams HK, Trejdosiewicz LK, Hodges GM. Primary culture of human oral epithelial cells. Growth requirements and expression of differentiated characteristics. *Lab Invest.* 1987 Feb;56(2):211-23.
239. Souto LR, Rehder J, Vassallo J, Cintra ML, Kraemer MH, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *Sao Paulo Med J.* 2006 Mar 2;124(2):71-6.
240. Stetter C, Plaza T, von den Driesch P. Skin grafting of a chronic leg ulcer with combined Versajet-V.A.C. therapy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006 Sep;4(9):739-42. English, German.
241. Stocum DL. Regenerative biology and engineering: strategies for tissue restoration. *Wound Rep Reg* 1998; 6: 276-290.
242. Tachibana T. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 379396.
243. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guérin SL, Auger FA, Bazin R, Germain L. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis.* 2006 Feb 1;12:65-75.
244. Teixeira AI, Nealey PF, Murphy CJ. Responses of human keratinocytes to micro- and nanostructured substrates. *J Biomed Mater Res A.* 2004 Dec 1;71(3):369-76.
245. Thomas DR. Managing pressure ulcers: learning to give up cherished dogma. *J Am Med Dir Assoc.* 2007 Jul;8(6):347-8.

246. Thomas DW, Harding KG. Wound healing. *Br J Surg* 2002; 89: 1203-1205.
247. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
248. Toole BP, Gross J. The extracellular matrix of the regenerating newt limb: synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol* 1971; 25: 57-77.
249. Trott KR. Tumor stem cells: The biological concept and its application in cancer treatment. *Radiother Oncol* 1994; 30: 1-5.
250. Tsai RY, Kittappa R, Mc Kay RGD. Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Dev Cell* 2002; 2: 707-712.
251. Turgut O, Muhammed U, Cagri UA, Omer S, Erkin UR. Perforator artery based flap debulking: an alternative method. *J Craniofac Surg*. 2006 May;17(3):570-2.
252. Tzukerman M, Rosenberg T, Ravel Y., An experimental platform for studying growth and invasiveness of tumor cells within teratomas derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 13507-13512
253. Udey MC. Cadherins and Langerhans' cell immunobiology. *Clin Exp Immunol* 1997; 107 (Suppl.): 68.
254. Uitto J, Christiano AM, Kahari VM, Bashir MM, Rosenbloom J. Molecular biology and pathology of human elastin. *Trans Biochem Soc* 1991b; 19: 824829.
255. Uitto J. Elastic fibers of the connective tissue. In: Goldsmith LA. *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991a. Pp 530557.
256. Uysal AC, Alagoz MS, Orbay H, Sensoz O. An alternative dressing material for the split-thickness skin graft donor site: oxidized regenerated cellulose. *Ann Plast Surg*. 2006 Jul;57(1):60-4.
257. van de Kar AL, Kreulen M, van Zuijlen PP, Oldenburger F. The results of surgical excision and adjuvant irradiation for therapy-resistant keloids: a prospective clinical outcome study. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Jun;119(7):2248-54. Review. Erratum in: *Plast Reconstr Surg*. 2007 Aug;120(2):579
258. Vats A, Tolley NS, Polak JM, Buttery LDK. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaryngol* 2002; 27: 227-232.
259. Veves A, Falanga V, Armstrong DG, Sabolinski ML. A human skin equivalent is effective in the management of non infected neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2001; 24: 290-293.
260. Violas P, Abid A, Darodes P, Galinier P, de Gauzy JS, Cahuzac JP. Integra artificial skin in the management of severe tissue defects, including bone exposure, in injured children. *J Pediatr Orthop B*. 2005 Sep;14(5):381-4.
261. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116: 639-648
262. Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997; 158: 4521-4524.
263. Wang XN, Collin M, Sviland L, Marshall S, Jackson G, Schulz U, Holler E, Karrer S, Greinix H, Elahi F, Hromadnikova I, Dickinson AM. Skin explant model of human graft-versus-host disease: prediction of clinical outcome and correlation with biological risk factors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006 Feb;12(2):152-9.
264. Wenstrup RJ, Murad S, Pinnell SR. Collagen. En: Goldsmith LA (ed). *Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin*, 2nd edn. New York: Oxford University Press, 1991. Pp 481508.
265. Whitney J, Phillips L, Aslam R, Barbul A, Gottrup F, Gould L, Robson MC, Rodeheaver G, Thomas D, Stotts N. Guidelines for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen*. 2006 Nov-Dec;14(6):663-79.
266. Wisser D, Rennekampff HO, Schaller HE. Skin assessment of burn wounds covered with a collagen based dermal substitute in a 2 year-follow-up. *Burns*. 2004 Jun;30(4):399-401.
267. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: eleven years of clinical experience. *Burns*. 2006 Aug;32(5):538-44. Epub 2006 Jun 14.
268. Wu T. Plastic surgery made easy - simple techniques for closing skin defects and improving cosmetic results. *Aust Fam Physician*. 2006 Jul;35(7):492-6. Review.
269. Yamamoto N, Nambu M, Azuma R, Kiyosawa T. Dermal neoformation during partial-thickness skin wound healing. *Ann Plast Surg*. 2006 Feb;56(2):182-5.
270. Yonezawa M, Tanizaki H, Inoguchi N, Ishida M, Katoh M, Tachibana T, Miyachi Y, Kubo K, Kuroyanagi Y. Clinical study with allogeneic cultured dermal substitutes for chronic leg ulcers. *Int J Dermatol*. 2007 Jan;46(1):36-42.
271. Young HE, Duplaa C, Young TM, Floyd JA, Reeves ML, Davis KH y cols. Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat Rec* 2001a; 263:350-360.
272. Young HE, Steele T, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins KC. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001b; 264:51-62.
273. Young HE. Existence of reserve quiescent stem cells in adults, from amphibians to humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004 a; 280:71-109.
274. Young HE. Stem cells and tissue engineering. En *Gene Therapy in Orthopaedic and Sports Medicine* (Huard J, Fu FH, eds). Springer-Verlag, New York, 2000 pp 143-173.
275. Zerón HM, Kröttsch Gómez FE, Muñoz RE. Pressure ulcers: a pilot study for treatment with collagen polyvinylpyrrolidone. *Int J Dermatol*. 2007 Mar;46(3):314-7.

276. Zhang EP, Liao DH, Liu AZ, Wang XB, Li XY, Zeng YJ, Wang SJ. Biomechanical characteristics investigation on long-term free graft with expanded porcine skin. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2006 Oct;21(8):864-9. Epub 2006 Jun 13.
277. Zienowicz RJ, Karacaoglu E. Implant-based breast reconstruction with allograft. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Aug;120(2):373-81.
278. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott factor signalling system and its regulator *Crit Care Med* 2000; 30: S294301.