



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ÚLCERAS POR PRESIÓN Y SU
TRATAMIENTO MEDIANTE EL USO DE
BIOMATERIALES SINTÉTICOS”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
IVÁN NICOLÁS PÉREZ OSORIO

DIRECTORES DE TESIS:
DRA. MARÍA CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ
DR. PEDRO LOMELÍ MEJÍA

2016

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres Lilia y Nicolás, por su amor y apoyo incondicional, ser mi ejemplo y alentarme siempre a llegar muy lejos.

A mi familia, Carmen, Leticia, Mauro padre e hijo, Leonel, Elena, Chelo y Liani, ya que cada palabra aquí redactada y cada instante de mi vida los lleva a ustedes detrás.

“La constancia es la clave del éxito”

Agradecimientos:

A los revisores:

Biol. José del Carmen Benítez Flores

Dra. Ana Lilia García Hernández

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Dr. Roberto Sánchez Sánchez

Dr. Pedro Alejandro Lomelí Mejía

Especialmente a la Dra. Velasquillo por su confianza, apoyo y gran asesoría durante la realización de mi trabajo.

Al Dr. Hugo Lecona Butrón por su apoyo y asesoría en el trabajo realizado en quirófano.

A la Biol. Sandra Julieta García López por su asesoría en la realización de la parte histológica de éste trabajo.

Al Dr. Ricardo Gómez García por el apoyo económico que fue indispensable para la realización de éste trabajo, así como por su constante e incondicional asesoría.

Al laboratorio de Biotecnología y la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa y su personal por apoyar mi trabajo.

A los laboratorios de Histología de la FES Iztacala y Biomecánica del INR, particularmente al profesor José del Carmen Benítez Flores y a la Dra. María del Rosario González Valle por su instrucción y apoyo con materiales para concluir mi trabajo.

A Fernanda, por apoyarme a cada instante de mi vida.

Índice

Marco teórico

A. La piel	1
B. Estructura de la piel	2
C. Úlceras por presión	4
D. Epidemiología de úlceras por presión	5
E. Tratamiento de las úlceras por presión	7
F. Poli Ácido Gálico	9
G. Ingeniería de tejidos	10
H. Modelos experimentales de lesiones dermales	11
I. Sensores de presión	13

Justificación	17
---------------	----

Objetivos Generales	18
---------------------	----

Objetivos Particulares	18
------------------------	----

Material y Método

1. Unidad Experimental	19
2. Estandarización del modelo experimental de úlceras por presión	19
A. Diseño y construcción de un instrumento para analizar la presión	19
B. Determinación del dispositivo para generar las úlceras	22
C. Generación de úlceras por presión	23
3. Pruebas de viabilidad y proliferación celular sobre PGAL	25
A. Ensayo de viabilidad celular	27
B. Ensayo de unión celular	27
C. Ensayo de viabilidad celular con PGAL en solución	27
4. Análisis histológico de las úlceras generadas	28
A. Procesamiento de las muestras	28
B. Análisis histológico	29
C. Análisis de imágenes	30
5. Análisis estadístico	32

Resultados	
A. Instrumento sensor de presión y determinación del dispositivo para generar las úlceras	33
B. Generación de úlceras por presión	35
C. Pruebas de unión y viabilidad celular sobre PGAL	38
D. Pruebas de viabilidad celular con PGAL en solución	42
Discusión	47
Conclusiones	51
Bibliografía	53

Índice de figuras

Figura 1.	Estructura de la piel	2
Figura 2.	Estratos que conforman a la epidermis	3
Figura 3.	Strain Gages asociados a piezas metálicas	13
Figura 4.	Sensor piezoeléctrico utilizado para evaluar contracción muscular	14
Figura 5.	Estructura de los sensores FSR	15
Figura 6.	A) Circuito básico para el correcto funcionamiento de un sensor FSR B) Comportamiento clásico de la respuesta de voltaje con respecto a una fuerza ejercida	16
Figura 7.	Circuito traductor de presión a voltaje	20
Figura 8.	Sensores FSR	21
Figura 9.	Imanes utilizados en el estudio	22
Figura 10.	Determinación de la presión ejercida <i>in vivo</i>	23
Figura 11.	Generación de úlceras en los organismos	24
Figura 12.	Tabla con la nomenclatura de los diferentes materiales	25
Figura 13.	Proceso de neutralización de membranas de PGAL	26
Figura 14.	Fijación de muestras de piel	29
Figura 15.	Análisis de imágenes teñidas mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina	31
Figura 16.	Instrumento para medir presión ensamblado y detalles internos del mismo	33
Figura 17.	Curva de regresión ajustada	34
Figura 18.	Presión sobre piel del dorso de los organismos	37
Figura 19.	Disminución del volumen fibrilar del músculo en la zona de la lesión	
Figura 20.	Cortes histológicos de UPP de 2° grado generadas en ratones nu/nu de 8 semanas de edad después de ser sometidos a un ciclo de presión/descompresión de 8 por 12 horas	38
Figura 21.	Úlceras por presión de 2° y 4° grado generadas en ratones nu/nu de 8 semanas de edad después de un ciclo de presión/descompresión de 8 por 12 horas	39
Figura 22.	Grosor epidermal	40
Figura 23.	Grosor total de piel	41
Figura 24.	PGAL en membrana	42
Figura 25.	FbH sobre PGAL en membrana después de 2 horas de cultivo	43

Figura 26. A) Porcentaje de adhesión celular sobre membranas de PGAL 52 y 103. B) Porcentaje de viabilidad celular sobre membranas de PGAL 52 y 103	44
Figura 27. Número de células a lo largo de 5 días de cultivo celular en presencia de diferentes concentraciones de PGAL en solución	45
Figura 28. Porcentaje de células vivas comparado con el porcentaje de células muertas a lo largo de 5 días de cultivo celular en presencia de diferentes concentraciones de PGAL en solución	46
Tabla 1. Respuesta en Volts de la presión ejercida sobre del sensor FSR	31

Abreviaturas

ANOVA: Análisis de varianza

CO₂: Dióxido de carbono

DCAUD: Dorsocaudal

DCERV: Dorsocervical

DMED: Dorsomedial

dH₂O: Agua destilada

EthD-1: Homodimero de Etidio

ex/em: Excitación/emisión

FbH: Fibroblastos Humanos

LED: Diodo emisor de luz

Li₂CO₃: Carbonato de litio

NaOH: Hidróxido de sodio

NPUAP: Grupo Nacional para el Estudio y Asesoramiento de las Úlceras por Presión.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Solución buferada de fosfatos

PFA: Paraformaldehido

PGAL: Poli Ácido Gálico

RH: Humedad relativa

UPP: Úlceras por presión

Glosario

Escara: Lesión de la piel que se caracteriza por la aparición de una costra como resultado de una quemadura, gangrena o necrosis de origen infeccioso, químico o de otro tipo.

Esfacelo: Restos inflamatorios y necróticos de tejidos que deben extirparse para facilitar la limpieza quirúrgica y la cicatrización

Osteomielitis: Infección ósea que es causada por bacterias u hongos.

Fistulas: Conexiones o canales anormales entre órganos o vasos. Puede ser el resultado de estrés, heridas, cirugía, infecciones o inflamaciones.

Zalea de borrego: Sábana de tela doble que se coloca transversalmente debajo de los pacientes para moverlos y proteger la ropa de cama.

Isquemia: Detención o disminución de la circulación de sangre a través de las arterias de una determinada zona, que deriva en un estado de anoxia celular y falta de nutrientes en la parte afectada

Angiogénesis: Formación de vasos sanguíneos.

Lacasas: Enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul que catalizan la oxidación de substratos orgánicos o inorgánicos con características similares al p-difenol.

Elementos finitos: Es un método numérico general para la aproximación de soluciones de ecuaciones diferenciales parciales utilizado en la simulación de sistemas físicos y biológicos complejos.

Efecto piezoeléctrico: Fenómeno físico presente en algunos cristales como el cuarzo, por el cual aparece una diferencia de potencial eléctrico entre las caras del cristal cuando éste se somete a una presión mecánica.

Ley de Ohm: Dice que la intensidad de la corriente que circula entre dos puntos de un circuito eléctrico es proporcional a la tensión eléctrica entre dichos puntos, por lo tanto la conductancia eléctrica es inversamente proporcional a la resistencia eléctrica.

Resistencia eléctrica: Es la igualdad de oposición que tienen los electrones al moverse a través de un conductor.

Placa fenólica: Placas hechas por lo general de cobre que se componen de dos caras, una que es un aislante que puede ser silicona o fibra de vidrio y otra que son pistas de cobre que funcionan como conductores.

Hypafix®: Es un adhesivo de tela no tejida de hoja libre, hecho de poliéster de color blanco y recubierto con adhesivo hipoalérgico que es permeable al aire y la humedad.

Neutrófilo: Son un tipo de glóbulo blanco que se caracterizan por tener un núcleo lobulado y gran cantidad de gránulos y lisosomas en su citoplasma, cuya principal función es fagocitar y participar en el inicio del proceso inflamatorio.

Simbología

mmHg: Milímetros de mercurio

V: Voltaje

cm: Centímetros

Ø: Diámetro

mm: Milímetros

kPa: Kilopascales

G: Gausses

g: Gramos

M: Molar

mL: Mililitro

µL: Microlitros

µm: Micrómetros

mM: Milimolar

pH: Potencial de hidrógeno

nm: Nanómetros

Pa: Pascales

N: Newton

Marco teórico.

A. La Piel.

La piel es un órgano complejo compuesto por diferentes tipos celulares de origen mesodérmico (fibroblastos, células vasculares, adipocitos, células de Langerhans) y ectodérmico (queratinocitos y melanocitos)¹⁹ que cubre la totalidad de la superficie del cuerpo de un organismo. Funciona como una barrera física entre el ambiente y el individuo, previene la pérdida de agua y electrolitos y reduce la entrada de químicos y microorganismos patógenos al organismo. Además está involucrada en la termorregulación y en la percepción de estímulos provenientes del medio, ya que presenta una serie de nervios y receptores sensibles a las vibraciones, presión, temperatura y dolor¹⁴.

B. Estructura de la piel.

La piel está organizada en 3 capas; epidermis, dermis e hipodermis, que se pueden clasificar por su origen embrionario en ectodérmicas (epidermis) y mesodérmicas (dermis e hipodermis)¹⁴ (**figura 1**).

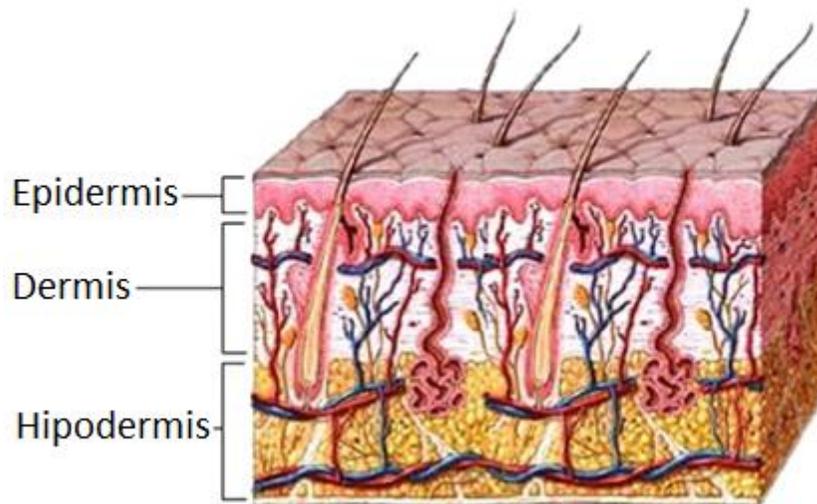


Figura 1. Estructura de la piel. Modificada de Khavkin y Ellis, 2011.

La capa más superficial y expuesta al medio es la epidermis, que está formada por los estratos corneo, lúcido, granuloso, espinoso y basal²². El 95% de las células que conforman a la epidermis son queratinocitos, células unidas entre sí por desmosomas y que presentan una actividad metabólica elevada ya que esta capa se encuentra en constante queratinización. Éste proceso comienza en el estrato basal y se lleva a cabo mediante la actividad de diferentes queratinas, como las variedades 5 y 14 que participan de manera importante en la proliferación de queratinocitos basales²². Conforme las células se van diferenciando; principalmente en el estrato granular, dichas queratinas son sustituidas por las variedades 1 y 10 que le dan forma al epitelio epidermal plano estratificado que se observa principalmente en el estrato corneo (**figura 2**).

La principal función de la epidermis es actuar como una superficie protectora. Esta función reside en su mayoría en el estrato corneo en donde los queratinocitos generan una cubierta celular principalmente de involucrina y además están rodeados por capas lipídicas, características que dotan a este estrato de su capacidad protectora. Además los pigmentos inmersos en la epidermis como la melanina ayudan a estabilizar los radicales libres producidos por la interacción de las células cutáneas con la radiación UV, permitiendo así el paso solo del 10% de dicha radiación a la dermis^{9,14}.

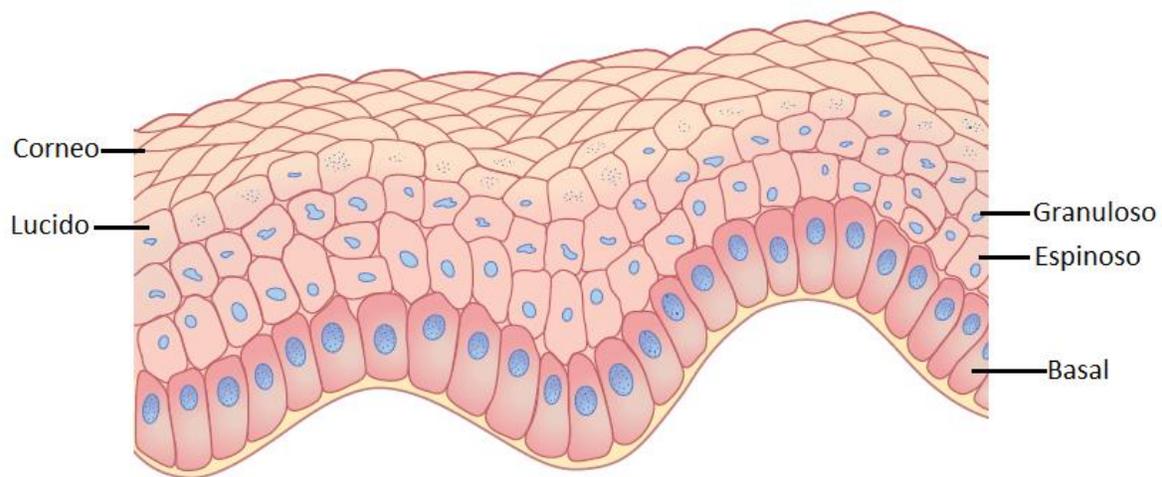


Figura 2. Estratos que conforman a la epidermis. Modificada de “Dermatología pediátrica. Texto y atlas en color”, capítulo 1.

Por su parte la dermis está compuesta predominantemente por fibras de colágeno (tipos I, III, IV y VII principalmente) y de elastina, inmersas en diferentes mucopolisacáridos⁴. Estas fibras son secretadas principalmente por fibroblastos y le otorgan a la piel características de elasticidad y resistencia mecánica necesarias para su correcto funcionamiento en diferentes zonas del cuerpo. Además, es aquí donde se lleva a cabo la termorregulación, ya que existen plexos vasculares que

corren paralelos a la epidermis cuyo flujo sanguíneo permite modificar la temperatura corporal de un individuo⁴.

C. Úlceras por presión.

El Grupo Nacional para el Estudio y Asesoramiento de las Úlceras por Presión (NPUAP) definió en el 2007 a las úlceras por presión (UPP) como lesiones localizadas en la piel y/o el tejido subyacente a ella; generalmente ubicadas sobre una prominencia ósea, a consecuencia de la combinación de presión elevada, isquemia y fuerzas tangenciales o de cizallamiento. Se clasifican de acuerdo a la cantidad de tejido que se ve dañado; de esta manera se les dividen en pre-úlceras, UPP de 1° grado (piel integra, eritema que no desaparece al aliviar la presión), UPP de 2° grado (pérdida parcial de la dermis, úlcera superficial con lesión rojiza y rosada en el lecho, sin costra.), UPP de 3° grado (pérdida total de la piel, puede verse el tejido adiposo subcutáneo), UPP 4° grado (pérdida total de la piel, con exposición del hueso, tendón o músculo) y UPP no estadiables (pérdida total del espesor de piel. La superficie de la lesión se encuentra cubierta en su totalidad de escara o esfacelo)³⁷. En particular la presión elevada sobre la superficie de la piel es determinante para la aparición de las UPP, cualquier presión que esté por encima del rango de 16 a 32 mmHg (presión hidrostática normal de los capilares sanguíneos) impide el flujo sanguíneo y lleva implícito el riesgo de desarrollar UPP².

D. Epidemiología de úlceras por presión.

Estas lesiones se consideran un verdadero problema de salud pública, debido a que provocan severas repercusiones físicas, psicológicas y sociales, tanto al paciente como a su familia, y principalmente económicas para las instituciones de salud que atienden al paciente. Debido a la frecuencia con la que se presentan en todos los niveles asistenciales, Hibbs, en el año 2001, las denominó “epidemia bajo las sábanas” que conlleva un pronóstico negativo, y un alto índice de mortalidad con tratamiento costoso y en muchas ocasiones poco exitoso.

En España, Torre I Bou en 1997, reportó que en una población de 102,755 habitantes, la incidencia de UPP en un año fue de 0.1%, en un grupo de personas de 65 a 74 años, de 0.57% entre las personas de 75 a 84 años, y de 1.97% en pacientes de 85 años y más. Lo que demuestra claramente, que a mayor edad, existe mayor riesgo de padecer dichas lesiones.

En los Estados Unidos de Norteamérica, Courtney en 2003, reportó que aproximadamente de 1.3 a 3 millones de adultos presentaron UPP, con un costo estimado de 500 a 40,000 dólares por cada UPP diagnosticada y tratada; con una incidencia que osciló entre 0.4% y el 38% para los hospitales y 17% para residencias de ancianos.

En México, no se cuenta con estadísticas globales en relación a la incidencia de UPP, pero si existen datos de instituciones que atienden estas lesiones que brindan un panorama de la epidemiología en el país.

En el año 2004, en las Unidades de Cuidados Intensivos e Intermedios del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias la incidencia de UPP en pacientes sometidos a ventilación mecánica, fue del 13%³¹.

En septiembre del 2012, el Dr. Contreras Ruiz, presidente de la Asociación Mexicana para el Cuidado Integral y Cicatrización de Heridas (AMCICHAC), mencionó que actualmente 17 de cada 100 pacientes hospitalizados padecen UPP³¹.

Así mismo, según datos publicados por la Secretaría de Salud en el 2013, las UPP ocupan el 3° lugar de heridas crónicas en el país, las cuales tendrían una media de prevalencia nacional del 20%, dato que sobresale, ya que la OMS indica que la prevalencia ideal sería de menos del 2%³¹.

E. Tratamiento de las úlceras por presión.

Las UPP conllevan a la posible formación de lesiones secundarias que por sí solas suponen un tratamiento muy especializado; por ejemplo, formación de abscesos, tunelizaciones, socavamiento, celulitis, osteomielitis, miasis y fístulas, por lo que al aparecer junto a las UPP, dificultan y encarecen el tratamiento y disminuyen la capacidad de recuperación del paciente^{7, 32}. Para dar tratamiento a las UPP se han desarrollado diferentes estrategias cuyo uso depende tanto del grado de la lesión como de la aparición de lesiones secundarias. Entre ellas, está el uso de dispositivos que permitan disminuir la presión que se está ejerciendo sobre la piel, por ejemplo zalea de borrego, colchones de hule espuma de huevera, colchones de agua, colchones y colchonetas de aire alternante y colchones aerofluidizados³⁶. También existen protecciones locales para prevenir el desarrollo de UPP, como ácidos grasos hiperoxigenados y apósitos hidrocélulares que incrementan la micro-circulación sanguínea evitando la isquemia del tejido cutáneo. Aunado a las dos anteriores, se utilizan curaciones tradicionales ocupando povidona yodada, peróxido de hidrógeno, alcohol, ácido acético, violeta de genciana y jabón²⁹. Todos los métodos anteriores presentan desventajas, como que no se elimina del todo la presión ejercida, el precio de los que si lo hacen es muy alto y los tratamientos directos sobre las úlceras no interaccionan con el tejido dañado promoviendo una regeneración, y lo que es más, lo llegan a degradar impidiendo una correcta cicatrización.

Así, se han generado nuevos métodos; la mayoría de ellos experimentales, que ocupan apósitos activos que interactúan con la herida facilitando su cicatrización y no requieren de antisépticos³. Un ejemplo de estos métodos es la ingeniería de tejidos, que mediante el uso de biomateriales, células y factores de crecimiento, se presenta como una alternativa real para solucionar la problemática que implica el tratamiento de UPP. Esto se debe a que los materiales utilizados pueden funcionar tanto como acarreadores celulares como constructos (biomaterial + células) dando pie a la interacción con el tejido lesionado que deriva en una mayor migración celular promoviendo la etapa inflamatoria de la cicatrización, angiogénesis, estimulación de

la síntesis de colágeno y mejor comunicación intercelular, lo que se traduce en menos dolor, aislamiento térmico, desbridamiento autolítico, mayor velocidad en la cicatrización y mejor calidad de la cicatriz de los tejidos dañados³².

Un ejemplo de estos biomateriales es el Poli Ácido Gálico, que presenta actividad bactericida y antifúngica, lo que protegería a la herida de ser infectada utilizándolo como apósito. De esta manera el desarrollo de investigaciones enfocadas en evaluar la posibilidad de utilizar estos apósitos como constructos o acarreadores celulares y el desarrollo de nuevos materiales es determinante para realizar un tratamiento integral de UPP.

F. Poli Ácido Gálico.

El Ácido Gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es un fitoquímico bioactivo principalmente descrito en la familia de las Galiaceas, que ha recibido gran atención en diferentes investigaciones gracias a su alto poder antioxidante, antimutagénico y antiinflamatorio, así como por poseer propiedades bactericidas, fungicidas, antivirales y capaces de ser utilizadas en tratamientos contra enfermedades cardiovasculares^{35, 42}.

Este compuesto es la base para la producción de Poli Ácido Gálico (PGAL), que es un material derivado del Ácido Gálico contenido en *Trametes versicolor*. Dicho material fue descrito por primera vez en 2013 y es obtenido a partir de una polimerización oxidativa mediada por lacasas. De ésta manera, es soluble en agua (lo cual es muy importante para su aplicación biotecnológica), tiene un alto contenido en polifenoles y presenta características semiconductoras, fungicidas y bactericidas, así como un rendimiento del 82% al extraerse mediante el proceso mencionado. Es importante señalar que para que el material adopte una forma de membrana y así poder ocuparlo en diversas investigaciones biotecnológicas, es necesario entrecruzarlo con carboximetilcelulosa y glicerol⁴³.

G. Ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos se presenta como una técnica innovadora y revolucionaria cuyo objetivo es restituir la función de tejidos dañados o lesionados y que se puede utilizar para generar tejidos *de novo*, que dota a la medicina regenerativa de herramientas que permiten afrontar los retos que diferentes enfermedades y lesiones presentan, y así finalmente otorgar una mejora en la calidad de vida del paciente^{8, 6}.

Esta herramienta se compone de tres ejes, el primero se refiere a la generación y uso de materiales biocompatibles fabricados a partir de componentes de origen natural o sintético, cuya función es imitar la matriz extracelular de los tejidos a reparar²⁴. El segundo de estos ejes está relacionado al uso de células (diferenciadas, comprometidas hacia un estirpe determinado o en estados pluripotentes), que pueden ser autólogas o de donantes y que interactuarán con los biomateriales ya mencionados, y a su vez con el tercer eje: factores de crecimiento, que permiten que las células utilizadas se diferencien hacia los tipos celulares necesarios para la terapia, y que también pueden favorecer a la comunicación celular para que así los constructos funcionen como acarreadores celulares⁸.

H. Modelos experimentales de lesiones dermales.

En la actualidad un método altamente utilizado para diferentes investigaciones son las simulaciones 3D, que involucran complejos cálculos matemáticos que representan diversas variables presentes en los sistemas estudiados. Específicamente para el estudio de lesiones en la piel hay simulaciones en 3D que integran una serie de elementos finitos de variables como temperatura, flujo de sangre, la zona en donde se genera la lesión y presión ejercida para generar la lesión²⁰. También existen impresiones en 3D de huesos que normalmente promueven la formación de UPP, que son probados recubriéndolos con sustitutos dérmicos comerciales y aplicándoles después diferentes presiones con máquinas de compresión computarizadas para evaluar la respuesta tanto de los huesos como de la piel a diferentes presiones. Estos experimentos han tenido resultados representativos y se presentan como una alternativa real hacia el estudio de lesiones dérmicas ocasionadas por presión, sin embargo no cuentan con la respuesta dinámica que presenta un ser vivo al ser sometido a diferentes situaciones de estrés como UPP²⁰.

También se han desarrollado diferentes modelos animales experimentales que varían, entre otras cosas, en el tipo de dispositivo utilizado para generar UPP. Uno de estos dispositivos son máquinas neumáticas, que tienen la ventaja de poder generar lesiones en un tiempo muy corto; ya que generan presiones muy elevadas, que van por encima a los 700 mmHg, pero la adquisición, uso y mantenimiento de este tipo de dispositivos tienen costos muy elevados, comparados con las demás metodologías, razón por la cual no tienen un uso muy común en este tipo de investigaciones^{12, 16}.

Así mismo se ha probado que presionar la piel con una pinza o abrazadera genera UPP. Este método es en eficiencia equivalente a todos los demás, no obstante al ser la presión el resultado de la resistencia de un punto de la pinza a ser separado de su estado de reposo, ésta se verá disminuida eventualmente ya que la resistencia mecánica irá decreciendo, lo que ocasiona variables en los experimentos y el constante cambio de los dispositivos²¹.

Otra metodología con buenos resultados, es generar heridas en la piel de ratones mediante el uso de implantes de metal que luego se asocian a diferentes tipos de imanes para producir la lesión^{27, 40} o en lugar de implantes de metal utilizar implantes plásticos que simulan el exceso de presión en un área determinada del cuerpo¹⁸. Ambos procedimientos presentan la desventaja de necesitar por lo menos de un procedimiento quirúrgico por organismo para llevar a cabo las experimentaciones, y debido a que no todos los grupos de investigación tienen acceso a las instalaciones adecuadas para realizar dichas metodologías, no hay una prevalencia de estas dentro de las investigaciones mundiales en relación al tema.

Por último la metodología más socorrida para generar lesiones en la piel se basa en el uso de un par de imanes que aprisionan a la piel^{1, 11, 12, 25, 30, 33, 34}, lo que limita la realización de la lesión a una zona con gran cantidad de piel como el dorso de los ratones, pero que a su vez presenta una gran eficiencia en la formación de UPP.

Todas las metodologías mencionadas utilizan organismos de la especie *Mus musculus* de variedades que presentan pelo, lo que involucra un sesgo para representar de manera adecuada las características y condiciones de una UPP en un ser humano.

I. Sensores de presión.

Los sensores de presión son dispositivos que permiten realizar mediciones de la fuerza que un cuerpo ejerce sobre un área determinada. En el área biomédica y biomecánica se han utilizado para evaluar el comportamiento de las diferentes fuerzas ejercidas por el cuerpo humano, que a su vez pueden ser causa de lesiones como lo son las UPP.

Existen diferentes tipos de sensores, entre los cuales se encuentran los Strain Gages (**figura 3**) que son dispositivos utilizados para la medición electrónica de diversas magnitudes mecánicas como presión, carga, torque, deformación y posición. Generan datos de acuerdo a la cantidad de deformación de un cuerpo debido a la fuerza aplicada sobre él⁵. Para su empleo se deben de unir completamente a la superficie de la zona en la cual se quiere evaluar la respuesta a dichas fuerzas, debido a esto su uso en investigaciones con organismos vivos es poco práctica ya que generaría gran cantidad de variables que perjudicarían el cumplimiento de los objetivos planteados en dichas investigaciones.



Figura 3. Strain Gages asociados a piezas metálicas. Modificada de Cimballa, 2013.

Otro tipo de sensores para evaluar la respuesta de un área a fuerzas mecánicas son los sensores piezoeléctricos (**figura 4**), cuyo funcionamiento se basa en el flujo de carga eléctrica producida por la deformación de cristales de cuarzo al aplicarle diferentes fuerzas²³. Este tipo de sensores se ocupan para analizar las presiones ejercidas al dar un paso o por una cama o silla de ruedas sobre una persona, por esto son dispositivos muy útiles en el estudio de la formación de UPP, sin embargo utilizarlos en modelos animales experimentales que involucren áreas pequeñas con un grosor como el de la piel es imposible dado su mecanismo de función y tamaño.

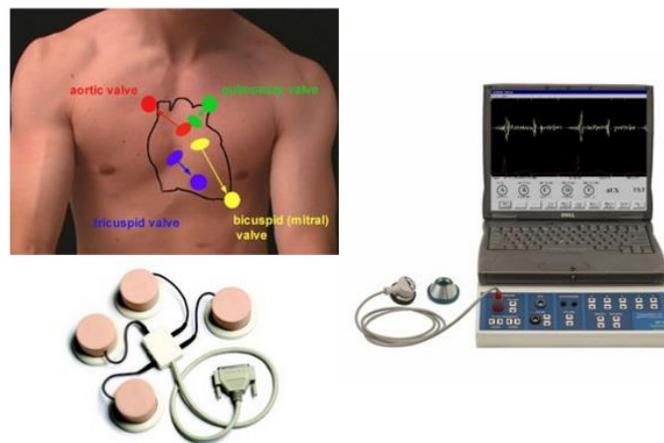


Figura 4. Sensor piezoeléctrico utilizado para evaluar contracción muscular.

Por su parte los sensores FSR, Force Sensing Resistor por sus siglas en inglés, que son un ejemplo de sensores de presión, están formados por tres capas, dos de ellas funcionan como zonas activas que están separadas por una tercera capa que contiene aire y funciona como un aislante que dota en parte de la resistencia eléctrica característica del sensor (**figura 5**). En una de las zonas activas existe una línea de cobre la cual, al aplicar una fuerza, se deforma en su sección transversal y de acuerdo a la Ley de Ohm, varía en su resistencia eléctrica. El tamaño en general

de estos sensores es variable y va de acuerdo al uso que se les dé, además son flexibles, económicos y fáciles de asociar a circuitos y fases digitales, características que los hace una alternativa real al uso de otros sensores capaces de registrar presión en actividades experimentales de investigación.

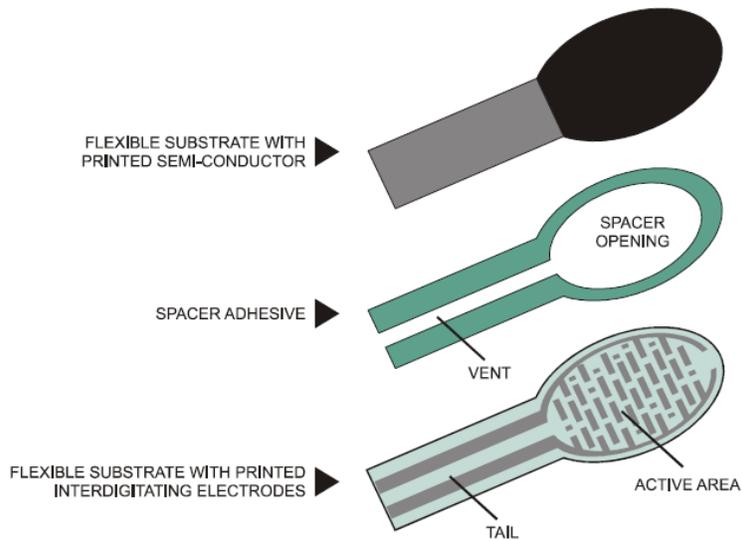


Figura 5. Estructura de los sensores FSR. Obtenida de Interlink Electronics S/A.

Funcionan midiendo el decremento de la resistencia producto del aumento de una fuerza aplicada sobre el área activa del sensor. A medida que la fuerza aumenta el sensor se deforma y las dos áreas activas entran en contacto, lo que provoca un decremento en la resistencia eléctrica que produce un aumento en el flujo de electrones a través del sensor. Este aumento en el voltaje se puede registrar, si se asocia el sensor con el circuito adecuado, para determinar la correlación existente entre la fuerza ejercida y el voltaje producido (**figura 6**)¹⁰.

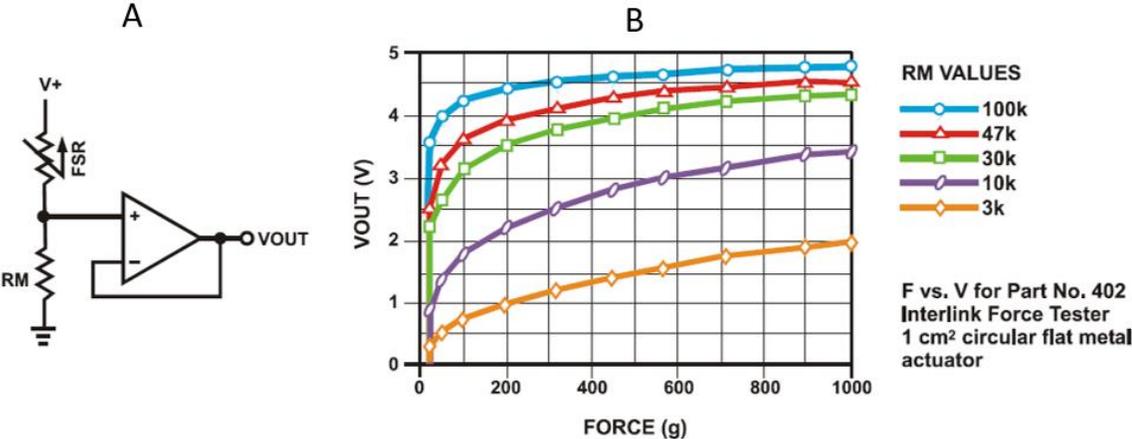


Figura 6. A) Circuito básico para el correcto funcionamiento de un sensor FSR. B) Comportamiento clásico de la respuesta de voltaje con respecto a una fuerza ejercida. Modificada de Interlink Electronics S/A.

Justificación.

Como ya se mencionó, las UPP son un problema de salud pública que no solo afecta la calidad de vida del paciente, sino que también provoca pérdidas económicas importantes y hasta ahora los tratamientos utilizados no responden a las necesidades de eficiencia en cuanto a la curación de las lesiones se refiere. El costo general para el cuidado de las UPP en el Reino Unido es aproximadamente de £26,000 por paciente, lo que significa un gasto anual de £150 millones. En E.U.A se estima que este costo es de 10,000 dólares por cuidados médicos y de enfermería por paciente, lo que implica más de 3 billones de dólares anuales³⁹. En México, según datos de la Secretaría de Salud, los gastos para tratar las UPP oscilan entre \$1,258 y \$175,552, dependiendo del grado de la lesión y tipo de tratamiento que se dé³⁸.

Por lo anterior, es de suma importancia generar nuevos tratamientos que otorguen una alternativa para la curación de las UPP, ya que los utilizados actualmente son poco efectivos, caros y casi ninguno contempla afecciones secundarias a las UPP.

Para esto es necesario estandarizar un modelo animal experimental que permita evaluar la eficiencia de dichos tratamientos cuyos resultados se pueden extrapolar para mejorar la calidad de vida del paciente.

Objetivos Generales.

- Diseñar y construir un instrumento para analizar la presión ejercida en un modelo experimental animal de úlceras por presión.
- Estandarizar un modelo experimental de úlceras por presión utilizando organismos de la especie *Mus musculus* sepa nu/nu como modelo animal.
- Realizar el tratamiento de las úlceras generadas utilizando polímero PGAL y fibroblastos humanos.

Objetivos Particulares.

- Determinar qué clase de dispositivo es el más adecuado para generar úlceras por presión de acuerdo a la presión que estos ejerzan.
- Analizar histológicamente las lesiones generadas para determinar el grado de éstas.
- Realizar pruebas *in vitro* de viabilidad y proliferación de fibroblastos humanos sobre del polímero PGAL.
- Evaluar la capacidad del polímero PGAL de actuar como acarreador celular y como constructo en pruebas *in vivo*.
- Caracterizar la viabilidad de fibroblastos humanos cultivados en presencia de PGAL en solución.

Material y Método.

El proyecto fue aprobado con el folio BIO/05/15 por el Comité de Investigación así como por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Nacional de Rehabilitación de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

Unidad Experimental.

Para el estudio se utilizaron 7 ratones machos de la especie *Mus musculus* sepa nu/nu de 6 a 8 semanas de edad con un peso de 20 g a 30 g (2 de ellos se utilizaron para determinar la zona del dorso del animal en donde se harían las UPP, mientras que los 5 restantes fueron usados para estandarizar el modelo experimental) que se mantuvieron en condiciones estériles de bioterio en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum* a temperatura ambiente $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad.

Los organismos se adquirieron en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Previo a cada experimento realizado de manera *in vivo*, los organismos fueron sacrificados utilizando una cámara de CO_2 .

Estandarización del modelo experimental de UPP.

Para estandarizar este modelo fue necesario crear un dispositivo capaz de medir la presión ejercida sobre la piel, ya que en ninguno de los antecedentes se menciona cómo se calculó esta presión.

A. Diseño y construcción de un instrumento para medir la presión.

Para construir el instrumento, se realizó un circuito utilizando el integrado LM358, el cual consta de dos amplificadores operacionales, uno de ellos se usó para amplificar la señal proveniente del sensor de presión, en tanto que el segundo fijó la respuesta a cero cuando no hubo cargas aplicadas. Así mismo se utilizó el integrado TL7660

para invertir el voltaje de alimentación. Se alimentó al circuito mediante una pila de 9 V conectada a un regulador de 5 V. Además se agregó un LED que indicó si el dispositivo operaba. Todo el circuito se armó sobre una placa fenólica con pistas de cobre y se montó en una caja para circuitos de 18 cm X 7 cm. El diagrama electrónico del circuito se realizó utilizando el programa EAGLE Layout Editor Professional v5.10, mientras que la distribución de los componentes se hizo mediante el programa Express PCB versión 7.3.4. El circuito completo se muestra en la **figura 7**.

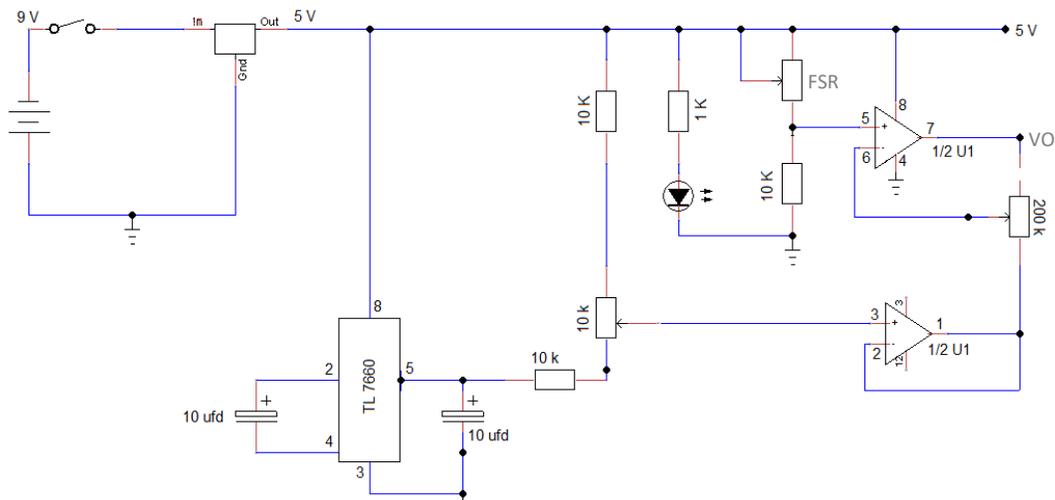


Figura 7. Circuito traductor de presión a voltaje. Detalle del armado y componentes del circuito empleado para censar presión.

Una vez montado, el circuito se conectó a diferentes sensores FSR (modelos 400, 402 y 406) para decidir cuál es el que más convenía para registrar presión en diferentes zonas de la piel de los ratones. Se comparó la respuesta de cada uno de ellos (**figura 8**). La respuesta en voltaje se midió con un multímetro Beckman, modelo BK Precision 5289.



Figura 8. Sensores FSR. Modelos 406, 402 y 400; de izquierda a derecha, utilizados en las pruebas *in vivo*.

B. Determinación del dispositivo para generar UPP.

Se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar qué tipo de dispositivo se utilizaría^{1, 11, 12, 16, 18, 21, 25, 27, 30, 33, 34, 40}. Esta elección se llevó a cabo en función de qué dispositivo proporciona la mayor presión capaz de generar lesiones en la piel de ratón en el menor tiempo posible. Se determinó que el uso de un par de imanes que aprisionen la piel cumple con los requerimientos para estandarizar el modelo experimental. De esta manera, se ocuparon imanes con $\varnothing = 12 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ con un peso de 2.4 g y 2600 G de fuerza de campo magnético, que fueron comparados con otros de $\varnothing = 12 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ con un peso de 4.2 g y 3500 G de fuerza de campo magnético. Cada imán se envolvió con 6 cm² de Hypafix® para facilitar su manejo (figura 9).

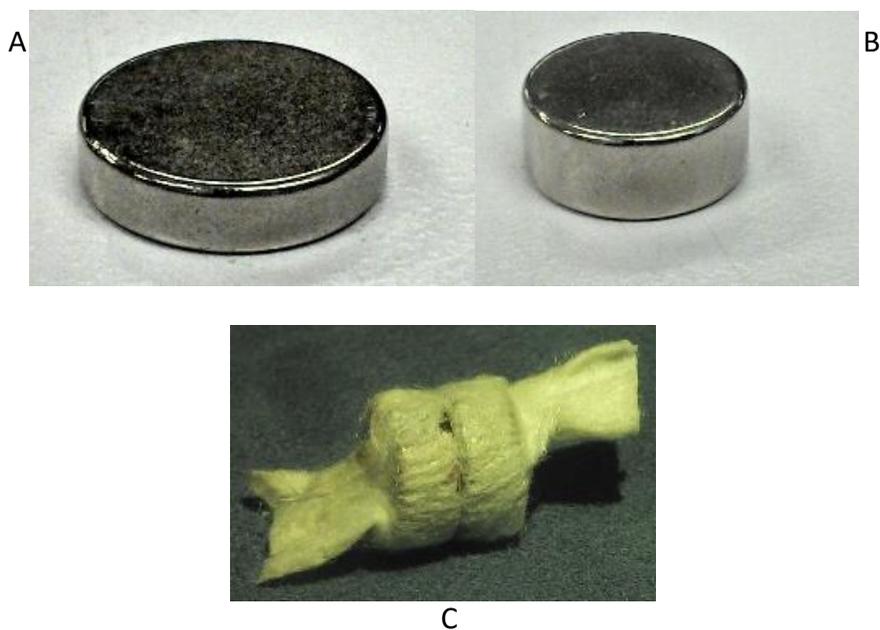


Figura 9. Imanes utilizados en el estudio. A) 2600 G de fuerza de campo magnético. B) 3500 G de fuerza de campo magnético. C) Imanes cubiertos con Hypafix®.

Para determinar la presión que dichos dispositivos ejercieron se ocupó el instrumento construido anteriormente. Éste se calibró de tal forma que su respuesta en Volts, dependiera de la fuerza aplicada al sensor. Fue necesario realizar una conversión de los valores experimentales obtenidos (reportados en gramos) a unidades de presión (kPa).

C. Generación de UPP.

Para determinar la zona adecuada para generar las UPP se realizaron medidas de la presión ejercida *in vivo* en el dorso de los ratones, se analizaron 3 zonas en 2 ratones *M. musculus* sepa nu/nu; dichas zonas fueron la dorso caudal (DCAUD), dorso medial (DMED) y dorso cervical (DCERV), como muestra en la **figura 10**.

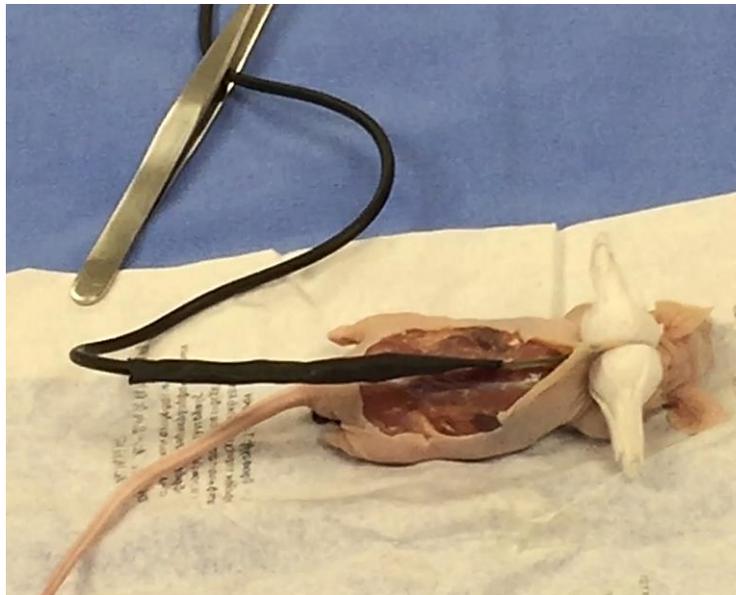


Figura 10. Determinación de la presión ejercida *in vivo*. Medición de la presión ejercida con los imanes de 3500 G en la zona DCRAN de un organismo *M. musculus* nu/nu de 8 semanas de edad.

Para generar UPP, los organismos fueron anestesiados administrando Isoflurano al 4% en la fase de inducción y al 0.5% en la fase de conducción junto con Butorfanol como analgésico. Posteriormente se levantó la piel del dorso de los sujetos dejando un puente de 2 mm - 3 mm de piel que fueron aprisionados entre los imanes seleccionados, de modo que al final del procedimiento se generaron dos lesiones con características iguales (**figura 11**), el grupo control se conformó por organismos sin lesión. Después de realizar una búsqueda bibliográfica se determinó que para conseguir generar UPP es necesario un ciclo de 8 horas de presión por 12 horas de descompresión (n=5) ^{1, 11, 12, 16, 18, 21, 25, 27, 30, 33, 34, 40}.



Figura 11. Generación de UPP en los organismos. Ratones *M. musculus* con un par de imanes de 3500 G aprisionando piel del dorso del organismo.

Pruebas de viabilidad y proliferación celular sobre PGAL.

El polímero utilizado; PGAL en polvo y en forma de membrana, fue proporcionado por el Doctor Pedro Roquero perteneciente al departamento de Ingeniería Química adscrito a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los experimentos de viabilidad y unión celular se llevaron a cabo por triplicado en cajas de cultivo de 24 pozos. Se cultivaron fibroblastos humanos (FbH) (obtenidos a partir de prepuseos con consentimiento informado en el Instituto de Pediatría y mantenidos hasta llegar a un 95% de confluencia en cultivos primarios), sobre fragmentos de PGAL con un área de 1.76 cm² a razón de 10,000 células/cm², los ensayos se realizaron a los 5 días de cultivo celular. Se tomó como grupo control FbH cultivados sobre un plato de cultivo.

Se utilizaron diferentes tipos de PGAL en forma de membrana; 52, 103, 104 y 154 para realizar las pruebas, la diferencia entre cada membrana fue la concentración de PGAL y de glicerol contenida en cada uno de ellos (**figura 12**).

Material	[PGAL] (%w)	[Glicerol] (%v)
052	5	2
103	10	3
104	10	4
154	15	4

Figura 12. Tabla con la nomenclatura de los diferentes materiales. Muestra la relación entre la concentración de PGAL y de glicerol utilizado para entrecruzar cada material.

Los segmentos de PGAL utilizados en los ensayos fueron neutralizados previamente para poder cultivar sobre de ellos, ya que experimentos previos demostraron que dichos materiales acidifican el medio de cultivo y llevan su pH a 4.7 luego de estar 15 minutos en contacto con dicho medio, valor que imposibilita la

viabilidad celular. Una vez terminado el proceso de neutralización, se mantuvieron las membranas con medio de cultivo durante 12 horas a 37°C. Posteriormente se midió el pH del medio el cual tuvo un valor de 7.2, cifra que denotó la posibilidad de cultivar sobre de las membranas sin que el valor de pH significara un error.

Para esto, cada trozo de PGAL fue lavado por un minuto con 3 ml de NaOH 0.1 M, posteriormente se lavó durante un minuto con 3 ml de dH_2O , por último se realizó un lavado por 10 minutos con 3 ml de medio de cultivo DMEM-F12 (**figura 13**).

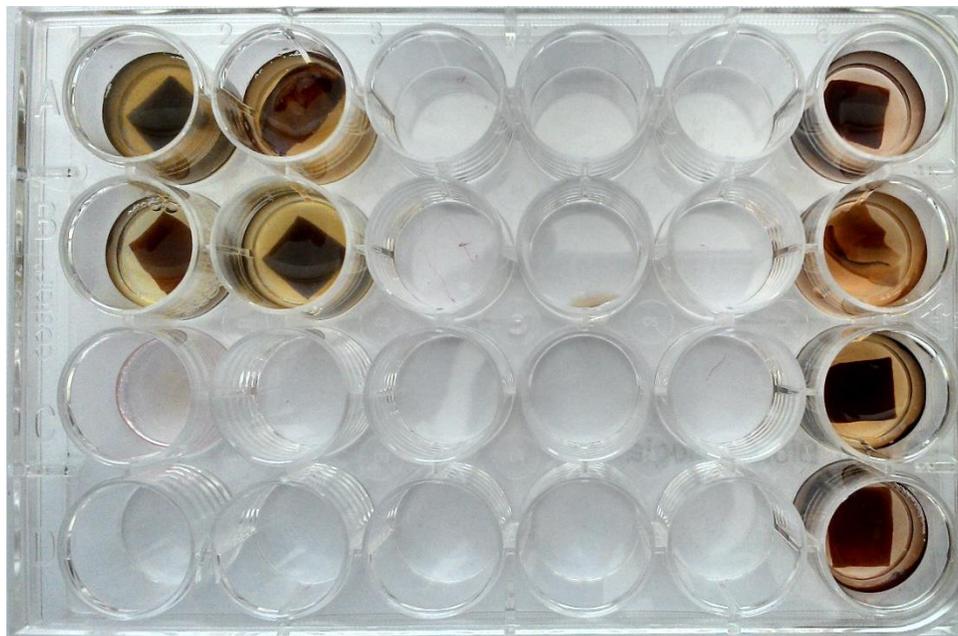


Figura 13. Proceso de neutralización de membranas de PGAL. Fragmentos de polímero con área de 1 cm² en presencia de NaOH 0.1 M.

- A. Ensayo de viabilidad celular.** Para llevar a cabo éste ensayo se empleó el LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kit *For mammalian cells* de InvitroGen Molecular Probes (número de catálogo L3224). Brevemente, se colocó y agitó hasta homogeneizar en un tubo Eppendorf 1ml de Hank's Balanced Salt Solution® junto con 0.5 µl de Calceína AM 4 mM y 1 µl de homodímero de Etidio (EthD-1) 2 mM. Los constructos (PGAL+FbH) a analizar fueron transferidos a una caja de Petri donde se les dio dos lavados con 2 mL de PBS con un pH 7.4 atemperado en baño María a 37° C. Después de retirar el PBS, se agregó a la caja de Petri la solución previamente homogenizada atemperada a 37° C en baño María y se incubó por 45 minutos a 37° C, 5% de CO₂ y 95% RH. Transcurrido el tiempo, se lavaron de nuevo los constructos con 1 ml de Solución Buferada de Fosfatos atemperado para después montarlos en un portaobjetos. Se observaron los resultados en un Microscopio de Fluorescencia Carl Zeiss Axiovision LE a longitudes de onda de ex/em ≈495 nm/≈515 nm para células vivas (fluorescencia verde) y de ex/em ≈495 nm/≈635 nm para células con la membrana celular dañada (fluorescencia roja).
- B. Ensayo de unión celular.** Se retiraron los constructos (PGAL+FbH) de las placas de cultivo, posteriormente cada constructo fue lavado con 250 µl de PBS durante 30 segundos para retirar las células no adheridas a los materiales. Después, se fijaron las células adheridas a cada material utilizando 400 µl de PFA 4% durante 1 minuto. Para observar dichas células se colocaron las muestras en un microscopio óptico invertido Zeiss Axiovert25 después de haber sido teñidas por el método de azul tripano. Se tomó como grupo control las células adheridas a la placa de cultivo.
- C. Ensayo de viabilidad celular con PGAL en solución.** Para realizar esta prueba se utilizó PGAL en solución a diferentes concentraciones (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml) diluido en medio de cultivo DMEM-F12. Se tomó como grupo control FbH cultivados únicamente con medio DMEM-F12. Cada concentración formó un grupo experimental. Se cultivaron FbH a razón de 5,000 células por cm² en placas de cultivo de 24 pozos. Para analizar la

viabilidad del cultivo se realizaron conteos celulares durante 5 días seguidos utilizando el método de azul tripano para diferenciar entre las células vivas y muertas.

Análisis histológico de las úlceras generadas.

Una vez finalizado el ciclo de presión, se retiraron los imanes para iniciar el ciclo de descompresión. A su término, se tomó una muestra del área experimental garantizando la presencia de piel aledaña a ella, para determinar si existía una lesión y el grado de la misma.

A. Procesamiento de las muestras. Las muestras obtenidas se fijaron durante 24 horas con PFA 4%, para garantizar su correcta fijación se sumergieron y estiraron completamente sobre de una base de parafina solidificada. Posteriormente las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentraciones ascendentes (60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%) durante 90 minutos en cada uno. Una vez terminada la deshidratación se procedió al aclaramiento utilizando xilol durante 30 minutos. Por último, se infiltró cada una de las pieles aclaradas con paraplast marca Sigma Aldrich (número de catálogo 145686-99-3)

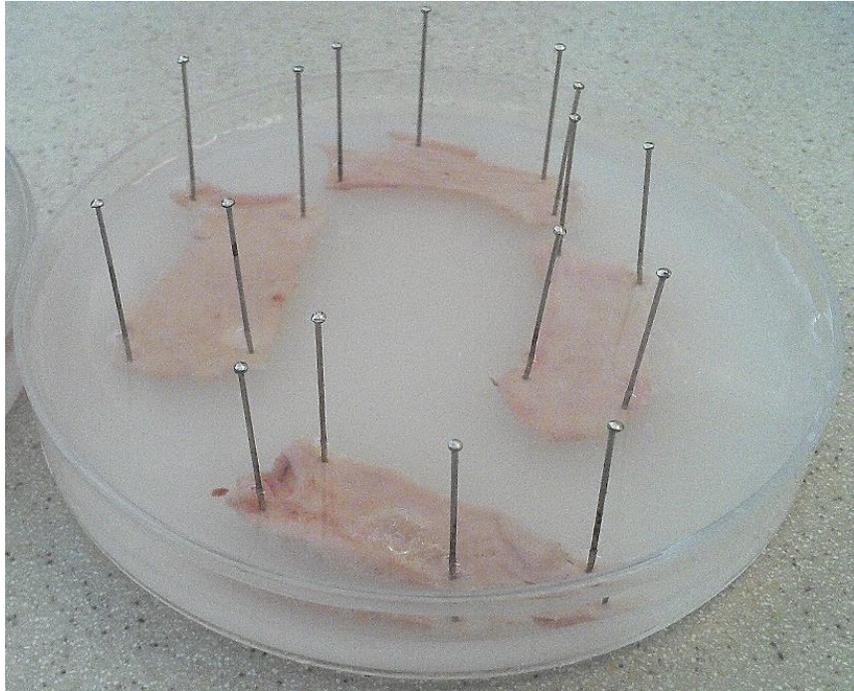


Figura 14. Fijación de muestras de piel. Las biopsias se sumergieron totalmente en PFA 4% y estiraron completamente.

B. Análisis histológico. Se realizaron cortes de 5 μm utilizando un microtomo Leica RM2125RT. Estos cortes fueron teñidos mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina, procedimiento que garantiza la correcta observación de las estructuras características y más relevantes de la piel. Después de la tinción las laminillas obtenidas se observaron en un microscopio óptico vertical Leica DM500 (**figura 15**).

Brevemente, cada laminilla fue aclarada en dos pasos de xilol de 5 minutos cada uno, posteriormente se realizó una rehidratación de las laminillas utilizando alcoholes con concentraciones descendentes de 100%, 96%, 80% y 70% demorando 3 minutos en cada uno; posterior lavado con dH_2O . Una vez completada esta rehidratación se tiñeron las laminillas con Hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Luego de lavar el exceso de colorante con dH_2O , se dio a las laminillas un paso de 5 segundos por Li_2CO_3 , para después pasarlas por agua amoniacal hasta que los tejidos viraran a una tonalidad azul. Una vez realizados estos pasos se tiñeron las laminillas con Eosina

durante 5 minutos, para después deshidratarlas con alcoholes de concentraciones ascendentes de 70%, 80%, 96% y 100% durante 3 minutos en cada uno. Por último se aclararon las laminillas utilizando xilol durante 5 minutos.

C. Análisis de imágenes. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el programa LAS EZ de Leica Microsystems. Se realizaron 25 mediciones aleatorias tanto del grosor epidermal como del grosor total de la piel comparando el área de la lesión con la piel aledaña a ésta y con piel del grupo control (**figura 15**).

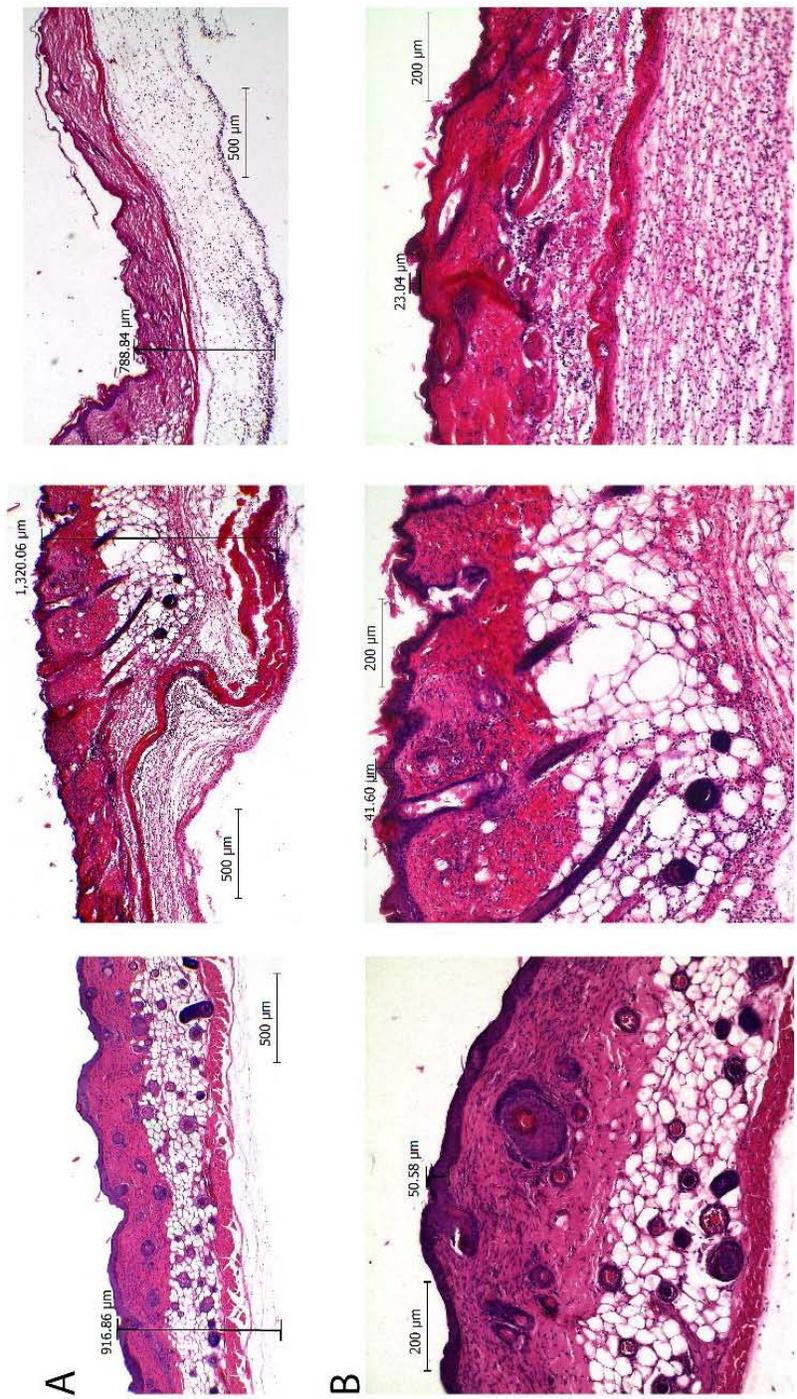


Figura 15. Análisis de imágenes teñidas mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina. A y B muestran una comparación del grosor total de la piel y de la epidermis en la piel del grupo control, zona aledaña a la lesión y el área lesionada; de izquierda a derecha respectivamente.

Análisis Estadístico.

La tabulación realizada para interpretar los valores de voltaje registrados al presionar la piel de los ratones con los imanes señalados se realizó utilizando Excel 2013 (Microsoft).

Por su parte, el análisis estadístico realizado a los resultados de cada uno de los experimentos se llevó a cabo utilizando el mismo programa. Utilizando la prueba de ANOVA a cada repetición de los experimentos. Junto con ella, para determinar si hubo diferencias entre cada grupo experimental se realizó una prueba de "t". Valores de "p" menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados.

A. Diseño y construcción del instrumento para medir la presión y determinación del dispositivo para generar las UPP.

Una vez ensamblado el circuito junto al sensor FSR seleccionado (**figura 16**) se procedió a calibrar el dispositivo utilizando una serie de pesos conocidos (entre los 16 g y 164 g), para determinar de acuerdo al voltaje recibido por el multímetro, cuál era la presión ejercida por dichos pesos. Los valores de voltaje obtenidos se tabularon, y a partir de esa tabla (tabla 1) se realizó una curva de ajuste, mediante la cual se obtuvo una ecuación en la que se tomó en cuenta el área activa del sensor y la equivalencia en Pascales ($1 \text{ Pa} = \text{kg}/(\text{m})(\text{s}^2)$) de la segunda ley de Newton ($1 \text{ N} = (\text{kg})(\text{m})/\text{s}^2$) para convertir los valores en Volts a gramos de fuerza ejercida sobre dicha área, determinando de esta manera la presión ejercida en el sensor (**figura 17**).

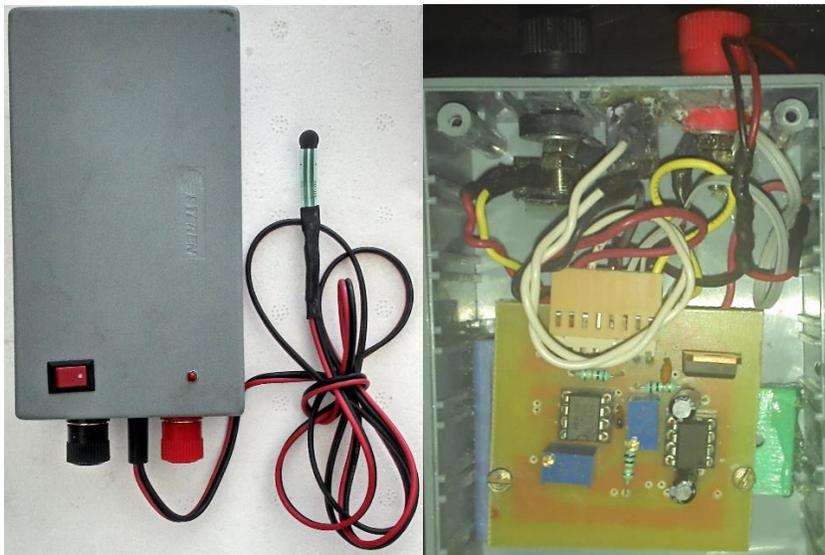


Figura 16. Instrumento para medir presión ensamblado y detalles internos del mismo.

Gramos	Volts
16.03	0.13
30.71	0.24
32.17	0.34
47.45	0.41
54.3	0.45
146.65	1.63
163.39	1.95

Tabla 1. Respuesta en Volts de la presión ejercida sobre del sensor FSR. El voltaje registrado es directamente proporcional a la presión ejercida por diferentes pesos ascendentes.

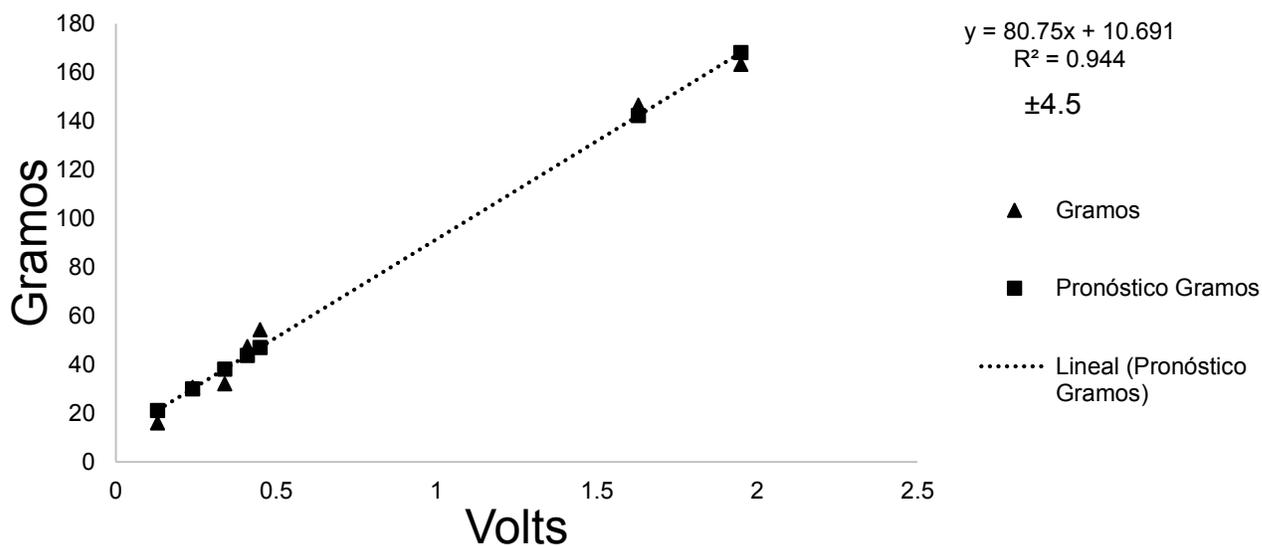


Figura 17. Curva de regresión ajustada. Regresión lineal a partir de la cual se generó la ecuación que sustituye los valores de voltaje en gramos.

Para determinar cuál era el sensor óptimo para acoplarse al circuito creado, se probaron tres sensores con diferentes diámetros de área activa y se realizaron mediciones de la presión ejercida por los imanes sobre la piel de los ratones *in vivo*. Las mediciones entre los sensores utilizados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la presión que cada uno registró, por lo que se eligió para esta investigación el modelo 400, debido sus dimensiones (área activa con $\varnothing = 0.5 \text{ cm}^2$ y 3.8 cm de largo total), que permitieron que se pudiera colocar con mayor facilidad subcutáneamente en el dorso del animal.

Así, utilizando el instrumento con el sensor 400 se registraron triplicados de la presión ejercida por los imanes de 2600 G y de 3500 G, la presión obtenida fue de 75.4 mmHg ± 4.5 y de 102.7 mmHg ± 4.5 respectivamente.

De acuerdo a la literatura, se eligieron los imanes de 3500 G que ejercieron una presión de 102.7 mmHg ± 4.5 , ya que se sabe que a esa magnitud se genera una UPP, siempre que dicha presión se aplique continuamente de 8 horas a 24 horas²¹. Sin embargo, no se reporta el instrumento con el cual se mide la presión ejercida, ni tampoco se precisa histológicamente el grado de la lesión.

B. Generación de UPP.

Para determinar la zona adecuada para realizar las lesiones se evaluó la presión de los imanes sobre de 3 zonas diferentes del dorso de los ratones. Las presiones ejercidas en las zonas DCERV y DCAUD de cada ratón no presentaron diferencias significativas entre sí, pero si las presentaron con las presiones registradas en la zona DMED (**figura 18**). Los promedios de la presión presente en las zonas DCRAN, DCAUD y DMED fueron 107.6 mmHg ± 6.3 , 104.4 mmHg ± 8.8 y 113.6 mmHg ± 1.4 respectivamente, por lo que la zona elegida para la estandarización del modelo experimental fue la zona DMED, ya que fue aquí donde se presentaron las presiones más altas durante el ensayo y que además facilitan la generación de UPP.

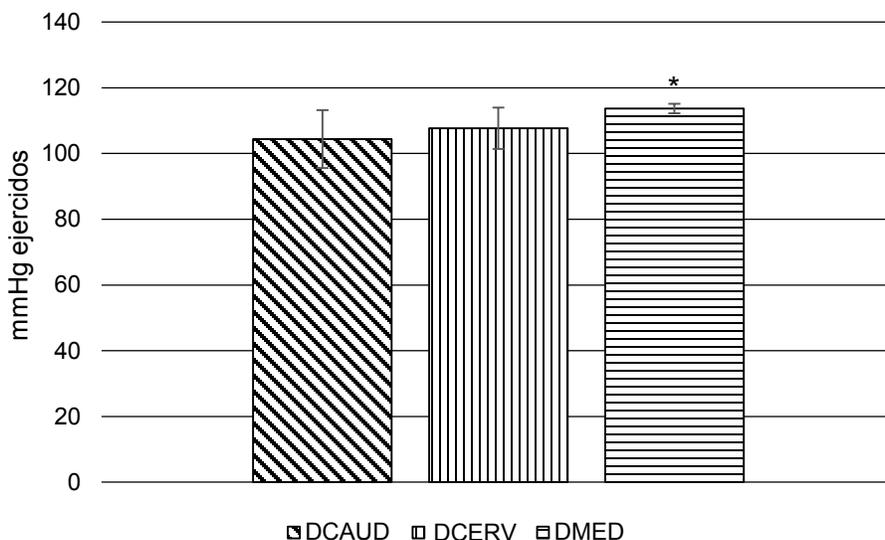


Figura 18. Presión sobre piel del dorso de los organismos. Se muestran los mmHg ejercidos en diferentes zonas del dorso de ratones *M. musculus* variedad nu/nu. $p < 0.05$.

El 80% de las úlceras generadas fueron de 2° grado, en ellas se presentaron zonas con adelgazamiento y pérdida total de la epidermis, compactación de la dermis papilar y reticular, edema e infiltrado inflamatorio moderado difuso de neutrófilos. Así mismo, a nivel de la hipodermis, se observó una pérdida de estriación en el músculo y además éste presentó una disminución en su volumen fibrilar (**figura 19**), cabe señalar que la lesión no abarcó más allá de la dermis (**figura 20**). Uno de los organismos fue sometido a una hora extra de presión debido a una prolongación en el tiempo para retirar los imanes. Éste organismo presentó lesiones de 4° grado, en las cuales se observaron zonas con procesos necróticos; en especial alrededor de folículos pilosos en donde hay células con núcleos picnóticos, así como infiltrado inflamatorio agudo en la mayor parte de la lesión, zonas con edema y una mayor pérdida epidermal (**figura 21**).

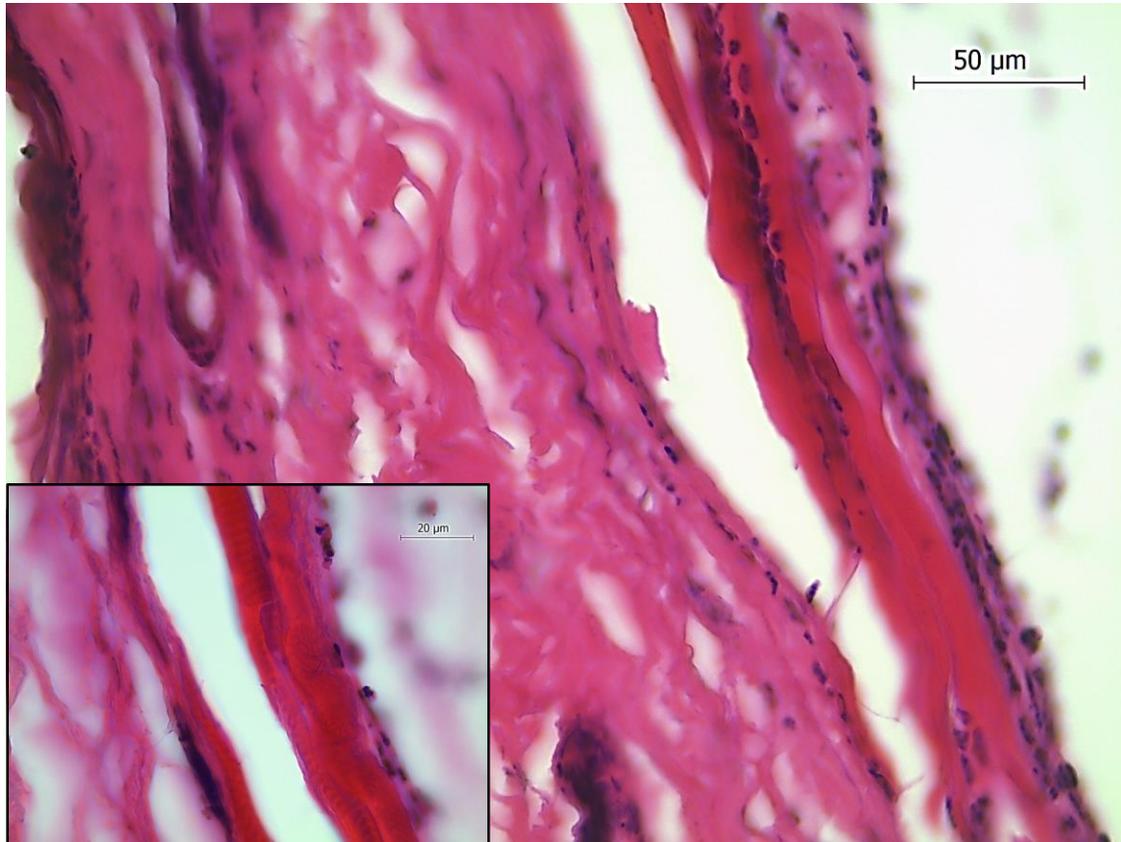


Figura 19. Disminución del volumen fibrilar del músculo en la zona de la lesión. Se observa una disminución del volumen fibrilar del músculo en la UPP de 2° teñida mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina.

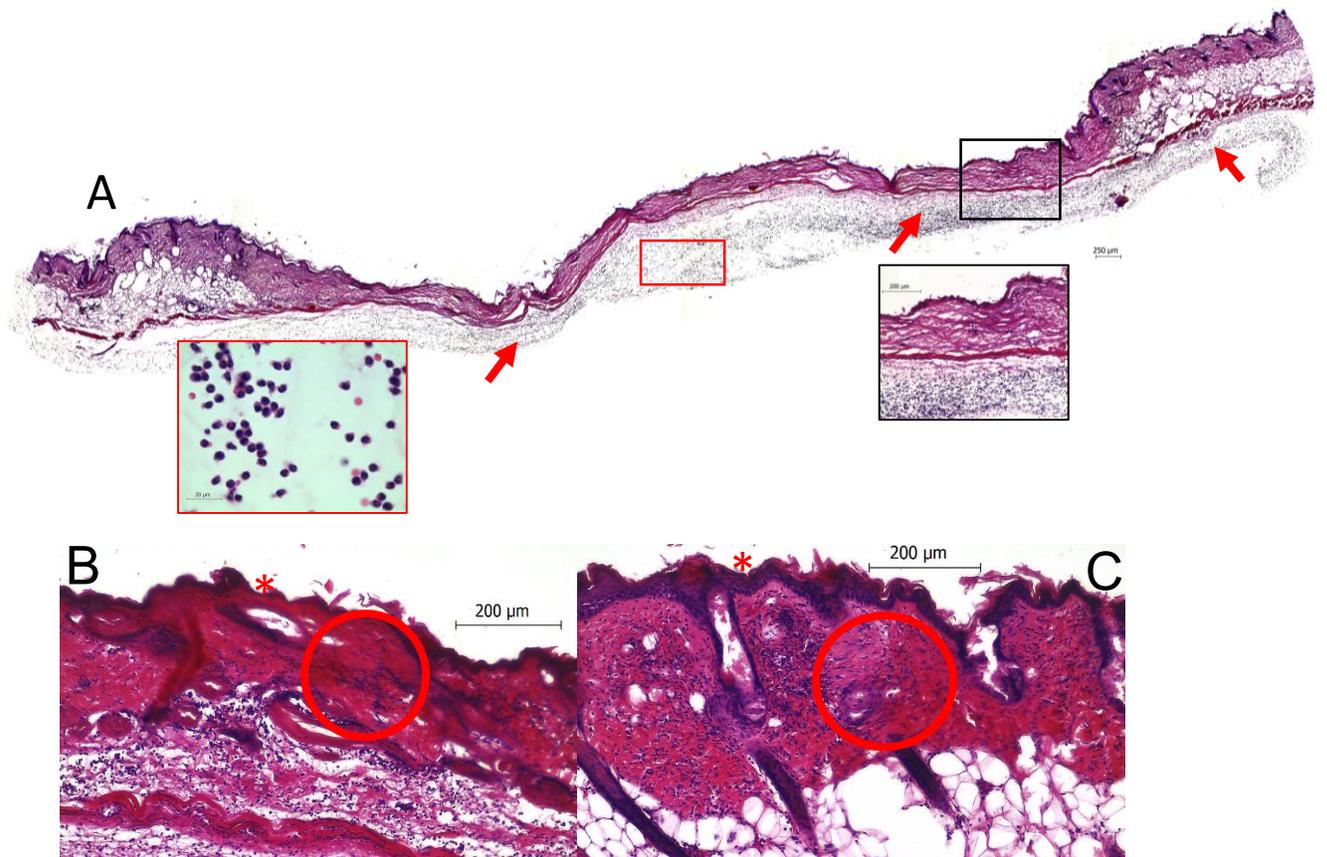


Figura 20. Cortes histológicos de UPP de 2° grado generadas en ratones nu/nu de 8 semanas de edad después de ser sometidos a un ciclo de presión/descompresión de 8 por 12 horas. A) Vista panorámica de la UPP, la flecha muestra el infiltrado inflamatorio presente a lo largo de la lesión y la piel aledaña a la lesión. B) El círculo indica la compactación de la dermis reticular y papilar, por su parte el asterisco muestra un adelgazamiento en la epidermis comparada. Ambos comparados con la dermis y epidermis de la piel aledaña a la lesión mostradas en la figura C.

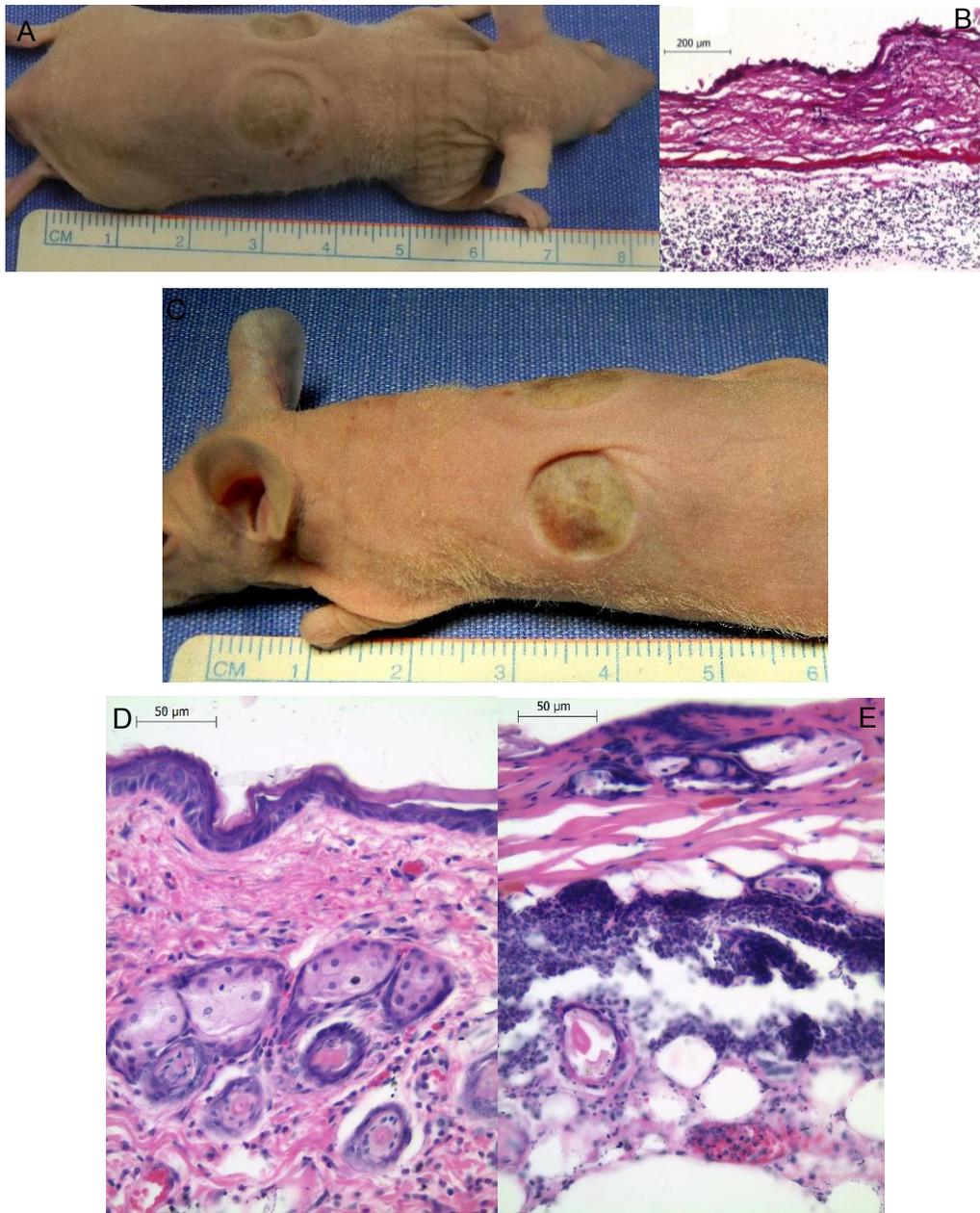


Figura 21. Úlceras por presión de 2° y 4° grado generadas en ratones nu/nu de 8 semanas de edad después de un ciclo de presión/descompresión de 8 por 12 horas. A y C) Ratones nu/nu con UPP de 2° y 4° grado en la zona dorso medial respectivamente con una lesión a cada lado del cuerpo. B) Imagen histológica que muestra una UPP de 2° grado teñida con la técnica de Hematoxilina y Eosina, se muestra un adelgazamiento en la epidermis, compactación de la dermis y un infiltrado inflamatorio moderado difuso de neutrofilos. D y E) Imagen histológica que muestra una UPP de 4° grado teñida con la técnica de Hematoxilina y Eosina, se observa una compactación en la dermis y la presencia de procesos necróticos alrededor de los folículos pilosos. Además en E se observa la pérdida total de la epidermis.

En la **figura 22** se comparan los valores del grosor epidermal de la piel lesionada, piel aledaña a la úlcera y piel de organismos del grupo control. Se observa que hubo un adelgazamiento significativo en la epidermis de la piel ulcerada teniendo como grosor promedio $22.7 \mu\text{m} \pm 5.1$, mientras que en promedio el grosor de la epidermis en la zona lesionada y la piel del grupo control fue de $47.9 \mu\text{m} \pm 11.5$ y $42.2 \mu\text{m} \pm 9.9$ respectivamente. Por su parte, el grosor total de la piel en la lesión se vio disminuido, presentando un grosor promedio de $572.6 \mu\text{m} \pm 103.7$, mientras que el grosor de la piel del grupo control fue de $1010.9 \mu\text{m} \pm 88.8$ (**figura 23**).

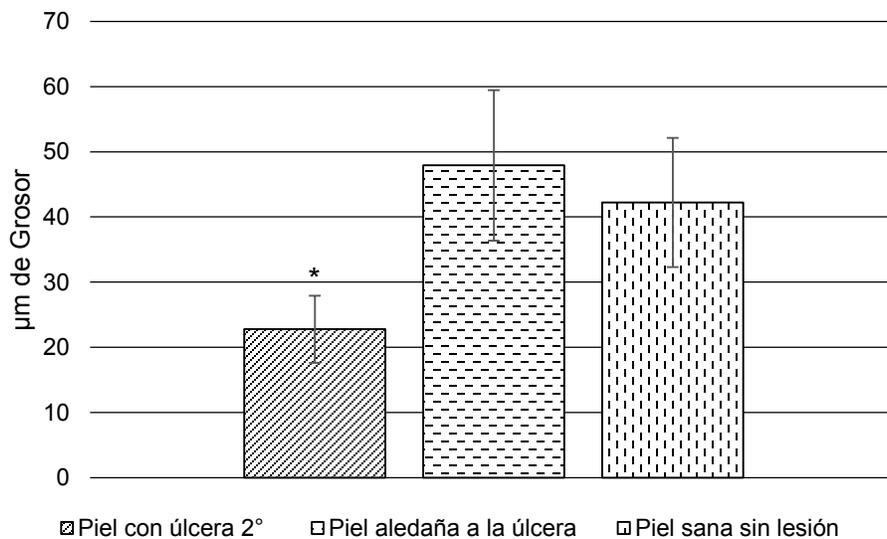


Figura 22. Grosor epidermal. Comparación entre piel con úlcera de 2° grado, piel aledaña a la úlcera y piel sana sin lesión. Se observan diferencias significativas entre la piel con UPP y los 2 grupos restantes. $p < 0.05$.

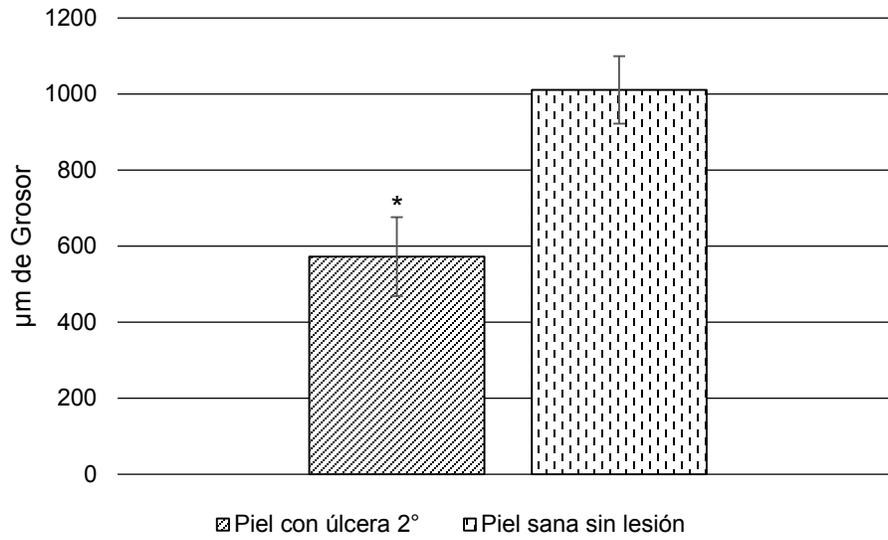


Figura 23. Grosor total de piel. Comparación entre piel con úlcera de 2° grado y piel de organismos del grupo control. Existe una disminución significativa del grosor de la piel con respecto al grupo control. $p < 0.05$.

C. Pruebas de unión y viabilidad celular sobre PGAL.

Para demostrar la posibilidad de que los polímeros se pudieran utilizar como acarreadores celulares, se neutralizó su pH, ya que durante su síntesis adquieren un pH ácido, mismo que acidifica el medio de cultivo al hacer cultivo celular sobre de dichos polímeros. Los polímeros que se utilizaron en el proceso de neutralización fueron PGAL 52, 103, 104 y 154 (**figura 24**). El material 104 se degradó totalmente después de ser expuesto durante 1 minuto al NaOH 0.1 M, razón por la cual no se realizó cultivo celular sobre de él. Por su parte, los materiales 154, 103 y 52 no presentaron daños estructurales aparentes al ser sometidos al tratamiento de neutralización. Se sembraron 17,600 FbH en cada membrana y pozo de cultivo (**figura 25**).

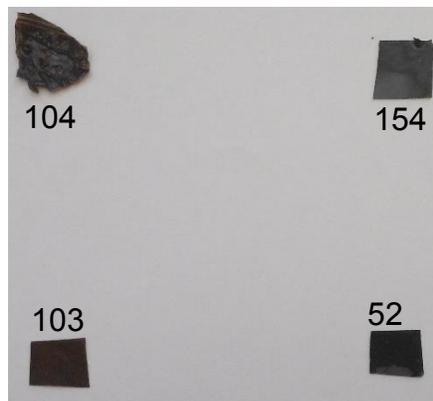


Figura 24. PGAL en membrana. Fragmentos de PGAL utilizados con un área de alrededor de 1 cm² utilizados en el proceso de neutralización.

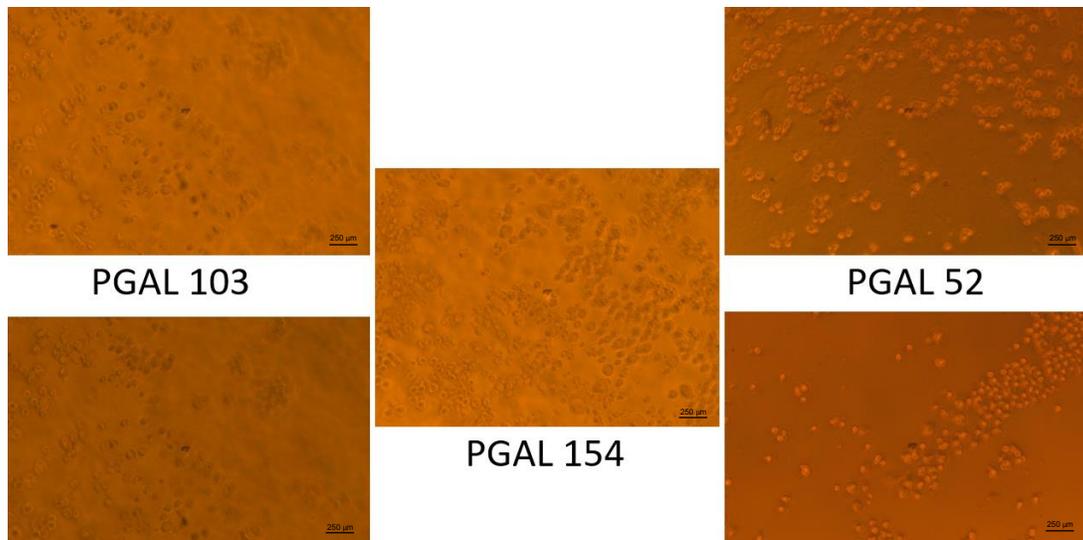


Figura 25. FbH sobre PGAL en membrana después de 2 horas de cultivo. Se observa FbH sobre del material.

Luego de 5 días de cultivo celular ninguna célula se unió al material 154, mientras que en los materiales 52 y 103 si se presentó unión celular. Así, se observó que el porcentaje más alto de unión celular fue sobre del material 103 con un 45.7% (**figura 26.A**) con respecto al grupo control, también fue el material que mayor porcentaje de viabilidad celular presentó con un 73.06% con respecto al control, como se ilustra en la **figura 26. B**. También se puede observar que las células cultivadas tanto sobre de las membranas 52 como 103 no formaron las prolongaciones citoplasmáticas características de FbH adheridos a cualquier superficie.

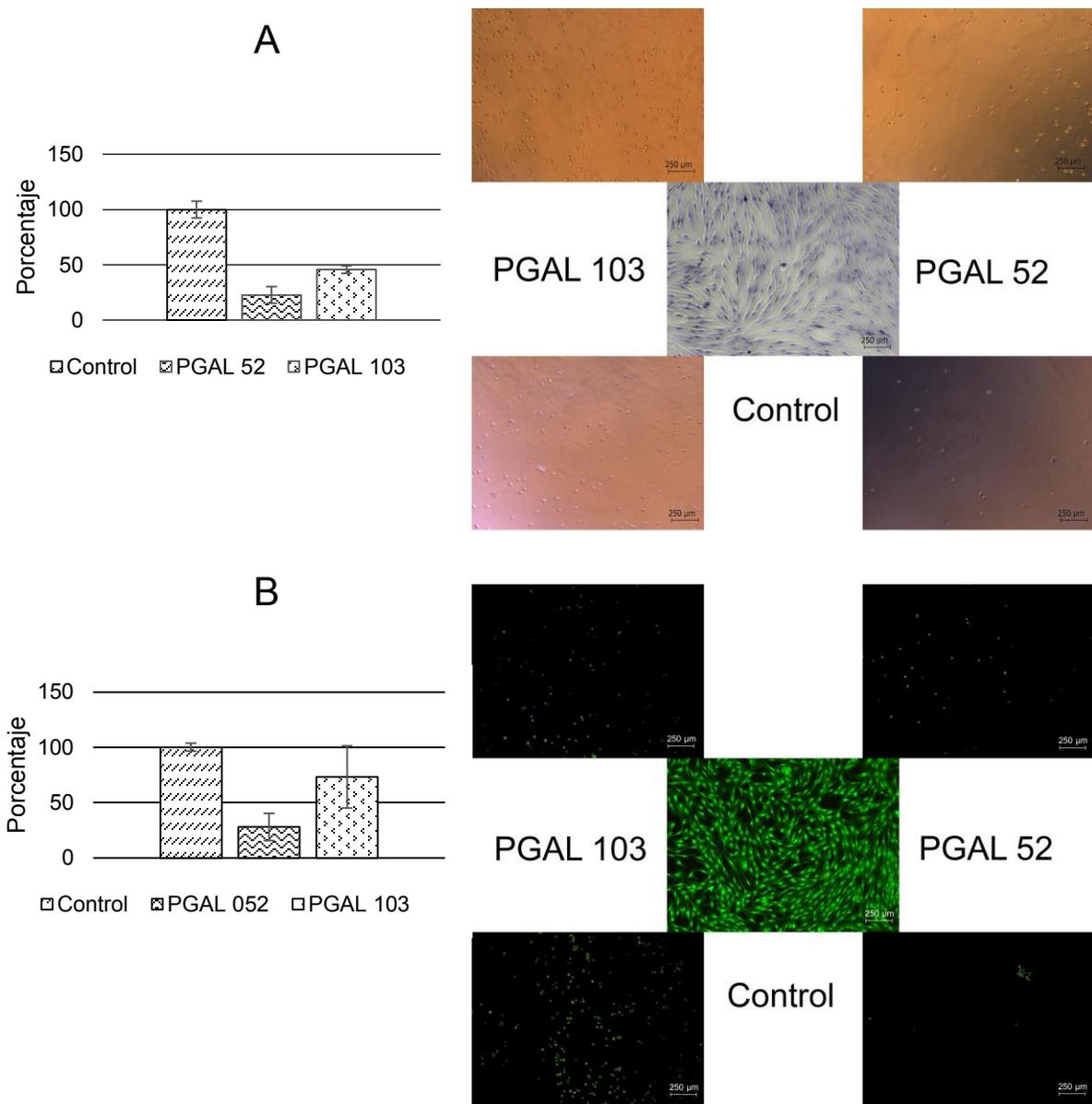


Figura 26. Porcentajes de unión y viabilidad celular sobre membranas de PGAL 52 y 103. A) Se ilustra la unión celular mediante el método de azul tripano, el material 103 es el que mayor porcentaje de unión celular presentó. $p < 0.05$. B) Se observa el porcentaje de viabilidad celular utilizando el ensayo de LIVE/DEAD cells, la membrana hecha a partir del PGAL 103 fue la que permitió una mayor viabilidad celular. $p < 0.05$.

D. Ensayo de viabilidad con PGAL en solución.

Una vez analizados los datos obtenidos en los cultivos *in vitro* sobre membranas de PGAL se realizaron pruebas con PGAL en solución para evaluar cómo se comportan los FbH en presencia del polímero sin que éste se presente como membrana para determinar si dicho polímero en solución era una alternativa para el tratamiento de las UPP generadas en el modelo. Se determinó que en todas las condiciones en donde se cultivaron las células en presencia de PGAL en solución hubo un crecimiento celular significativamente menor comparado con el control, como se observa en la **figura 27**. No obstante, desde el día cero hasta el 5 la viabilidad celular se mantuvo por encima del 90% (**figura 28, parte superior**). Las concentraciones de 100 µg/ml y 200 µg/ml no presentaron diferencias significativas entre ellas en cuanto a células vivas se refiere a lo largo del tiempo del estudio. Por su parte, la viabilidad celular en los cultivos con concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml no presentó diferencias significativas a los 2, 4 y 5 días de cultivo.

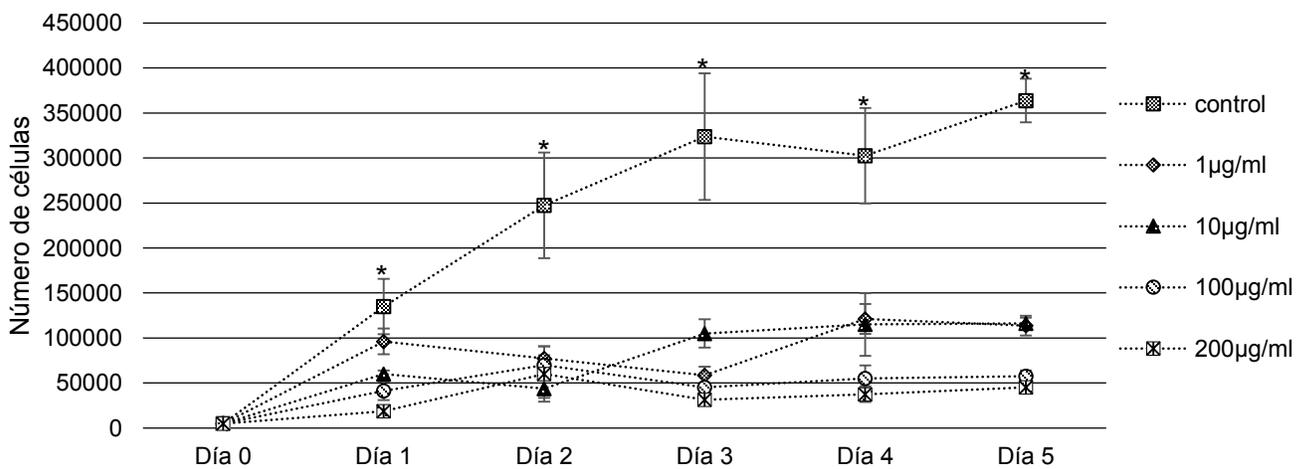


Figura 27. Número de células a lo largo de 5 días de cultivo celular en presencia de diferentes concentraciones de PGAL en solución. Se observa que todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. $p < 0.05$.

Aunado a esto, el porcentaje de células vivas y muertas se comportó de manera constante y sin diferencias estadísticamente significativas a lo largo de los 5 días del estudio y entre las diferentes concentraciones utilizadas como se ve en la **figura 28**.

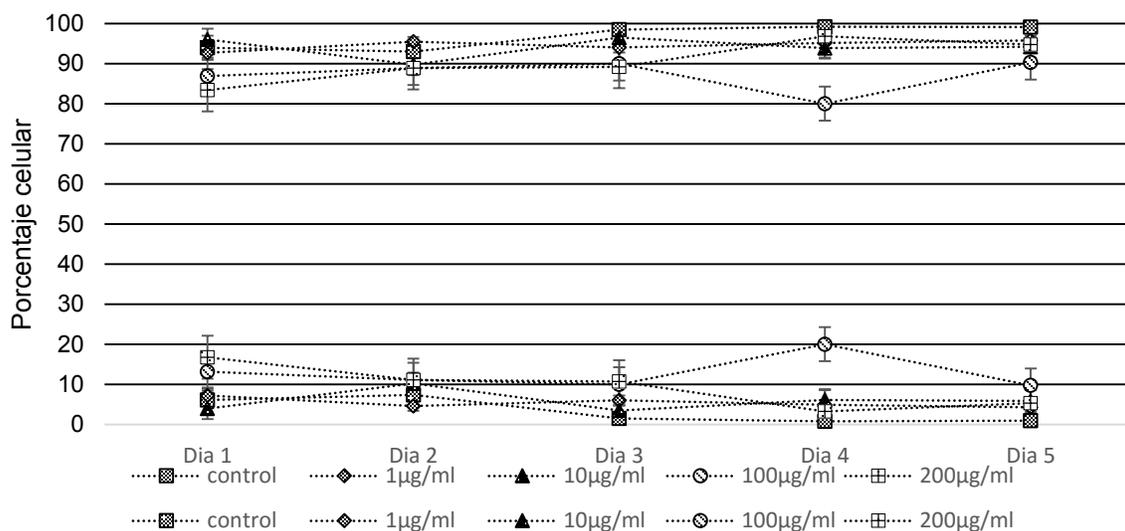


Figura 28. Porcentaje de células vivas (parte superior) comparado con el porcentaje de células muertas (parte inferior) a lo largo de 5 días de cultivo celular en presencia de diferentes concentraciones de PGAL en solución. $p < 0.05$.

Discusión.

Se diseñó el instrumento para medir presión tomando en cuenta las recomendaciones del fabricante de sensores FSR¹⁰. En comparación con otros utilizados con el mismo fin, estos sensores tienen características de sensibilidad, flexibilidad y manejo que los hacen ideales para éste tipo de investigaciones, ya que por ejemplo los sensores piezoeléctricos o strain gages, también utilizados en la medición de presión, no se acoplan a investigaciones que involucren organismos vivos dadas sus características de tamaño y sensibilidad^{23, 5}. Luego de la calibración de dicho dispositivo las lecturas de presión se comportaron de manera lineal hasta llegar al límite de saturación del sensor, tal y como el fabricante indica que debería de comportarse el sensor FSR al acoplarse a un circuito determinado¹⁰.

Los ratones utilizados presentan diferentes ventajas al estandarizar éste modelo experimental de UPP. Una de ellas es que están inmunosuprimidos, lo que permite evaluar el comportamiento de andamios y constructos con células humanas en el modelo sin que exista una respuesta inmune de por medio. Aunado a esto, se trata de organismos desnudos, lo que supone una cantidad mínima de folículos pilosos, característica similar a la de la mayor parte del cuerpo humano y que por lo tanto se presenta como una ventaja al escalar las investigaciones hacia la clínica.

Existe un antecedente de un modelo experimental de UPP en *M. músculos sepa nu/nu* publicado por Screi *et al.* en 2009, sin embargo no reporta la presión utilizada, por lo que no se puede reproducir. Además, el modelo involucra un procedimiento quirúrgico obligatorio que involucra disecciones, mantenimiento del animal durante el procedimiento y suturas en cada unidad experimental, lo que implica poca practicidad al intentar repetirlo y una desventaja en comparación con el modelo descrito en este estudio.

Existen reportes que indican que para generar una UPP bastan 50 mmHg^{1, 11, 33}, sin embargo los autores no mencionan el grado de esta lesión y lo que es más,

Kawamata *et al.* en 2014 indican que no es posible generar una UPP utilizando dicha presión, incluso aplicándola durante 4 días seguidos.

Los usuarios de sillas de ruedas y de colchones comunes pueden experimentar presiones de hasta 300 mmHg que pueden causar UPP, pero las presiones más comunes que generan lesiones de diferentes grados según el tiempo de exposición y el estado de la piel son del orden de 100 mmHg. Por esto, la zona elegida para generar las úlceras fue la dorso medial ya que ahí es donde se presentaron las presiones más altas durante las pruebas *in vivo* y similares a las presiones señaladas en la literatura como necesarias para generar UPP. Esta intensidad de presión podría deberse a la falta total de pelo y a la alta cantidad de tejido adiposo de la zona.

Así, se logró estandarizar un modelo clínicamente relevante y de fácil reproducción de lesiones que involucran un bloqueo en la irrigación de la zona, que con una posterior reperfusión, promueven la generación de UPP^{26, 33, 40}. La mayoría de las úlceras generadas fueron de 2° grado, sin embargo se presentaron úlceras de 4° grado relacionadas directamente con el tiempo de exposición al instrumento. Las características presentes en dichas lesiones coinciden con lo reportado por Stadler *et al.*, 2004; Wassermann *et al.*, 2009 y Kawamata *et al.*, 2015. La diferencia entre el grado del daño tisular obtenido se debe a la relación entre la presión que ejercen los imanes y el tiempo que se mantienen presionando la piel, a mayor tiempo de exposición a la presión mayor es el grado de la lesión⁴⁰. Las muestras de cada úlcera fueron tomadas 12 horas después de la generación de la herida, debido a esto, se pudo observar que se presentó infiltrado inflamatorio en la UPP y en las zonas aledañas a ella, característica propia de los neutrófilos, ya que migran a las zonas lesionadas durante las primeras 24 horas después de generarse una herida⁹.

Para el tratamiento de diferentes lesiones la ingeniería de tejidos ha utilizado diferentes materiales con características que les permiten funcionar como acarreadores celulares y andamios, que además pueden ser antisépticos. Por las

características bactericidas y fungicidas del Ácido Gálico reportadas en la literatura^{35, 42} se propuso al PGAL como uno de dichos materiales. Una propiedad del PGAL es ser soluble en agua, por lo que también lo es en los diferentes medios de cultivo utilizados para el cultivo celular. Por ello, para que se mantengan en forma de membrana es necesario entrecruzarlos con carboximetilcelulosa y glicerol. Una de las membranas utilizadas para las pruebas; la generada a partir de PGAL, la 104, se degradó durante el proceso de neutralización, esto podría explicarse por las concentraciones de PGAL y entrecruzantes presentes en el material. Al poner en contacto el material con NaOH, este interaccionó con el glicerol permitiendo que el Ácido Gálico de la membrana se solubilizara tanto en el NaOH en solución como en el agua destilada.

No se presentó unión celular sobre de la membrana 154, esto se le puede atribuir principalmente a la alta concentración de PGAL presente en ella; que es de 15%, en comparación con las otras membranas. Aunado a esto, el Ácido Gálico, componente principal del PGAL, en condiciones *in vitro* no permite la polimerización de la tubulina³⁵; proteína implicada en la generación de prolongaciones citoplasmáticas que permiten la adhesión celular como filopodios y lamelipodios, además dicho compuesto promueve un decremento en las concentraciones de Ca^{+28} lo que perjudica la actividad de las proteínas de adhesión calcio dependientes como integrinas y cadherinas.

Es importante señalar que no existen reportes específicos en la literatura sobre PGAL en membrana, por lo que éste es un trabajo inédito, lo que sugiere continuar con futuras investigaciones sobre dichas membranas.

Después de evaluar la respuesta de los FbH sobre las membranas de PGAL se caracterizó la respuesta de estas células con PGAL en solución para profundizar en la comprensión de la interacción célula-material. Se ha descrito que el Ácido Gálico produce un arresto en el ciclo celular entre la fase G2 y la fase M, lo que aunado a la falta de polimerización de tubulina ya mencionada, dificulta que la mitosis se lleve

a cabo³⁵. Esto explica la presencia de una disminución dosis dependiente en la proliferación celular, que sin embargo, mantuvo el porcentaje de células vivas y muertas constante en todos los experimentos independientemente de la dosis o el tiempo de exposición al material.

Conclusiones

Se logró fabricar un dispositivo capaz de medir la presión ejercida utilizando un sensor FSR que puede estar en contacto con la piel, que además es portátil, lo que permite su uso tanto en laboratorios como en quirófanos al realizar diferentes investigaciones. Es posible mejorar las características del dispositivo acoplándolo a una fase digital que realice los cálculos; que en este estudio se realizaron de manera manual, para agilizar la evaluación de la presión.

Así mismo se estandarizó con éxito un modelo animal experimental, poco invasivo, que no necesita cirugía, clínicamente relevante y de fácil reproducción, útil en el análisis y desarrollo de futuros mecanismos de tratamiento y prevención de UPP de 2° grado. Para detallar aún más éste modelo, se podrían realizar pruebas que confirmen y evalúen la necrosis observada, así como pruebas que denoten una correlación de diferentes tiempos de exposición a la presión y el grado de lesión que ésta genera, para no solo tener referencias de una UPP de 2° grado, sino también de todos los grados existentes.

Luego de evaluar la respuesta de los FbH sobre membranas de PGAL se determinó que dichos materiales no se presentan como una opción viable de constructo ni acarreador celular para el tratamiento de UPP, ya que no favorecen significativamente la unión celular y presentan muy baja proliferación celular al cultivar sobre ellas; características primordiales en el desarrollo y aplicación de biomateriales para tratar cualquier tipo de lesión mediante ingeniería de tejidos. Sin embargo, es posible que estas membranas si sean propensas a ser usadas como constructos temporales que no se integren a la lesión y doten solo de factores de crecimiento a las células locales para promover la regeneración tisular en las UPP. Además, es probable que luego del proceso de neutralización las membranas hayan sufrido cambios en su estructura, por lo que se debe realizar un estudio que descarte dicha posibilidad, para determinar si este posible cambio no afectó la viabilidad y proliferación celular.

Es importante realizar futuras investigaciones que muestren a detalle la interacción del PGAL con FbH, para que así se diluciden los posibles usos del mismo. Por su

parte los resultados obtenidos en los experimentos en donde se utilizó PGAL en solución muestran que se abre una ventana hacia futuras investigaciones que propongan al PGAL como una alternativa al uso de sustancias que pausan la mitosis celular, que son utilizadas en diferentes técnicas de cultivo celular.

Por las razones ya citadas, no se procedió al tratamiento experimental de las UPP generadas utilizando los materiales fabricados a partir de PGAL. Sin embargo los resultados obtenidos en el presente trabajo abren la puerta no solo a buscar nuevas alternativas de tratamiento para las UPP, sino también a futuras investigaciones que permitan evaluar las posibles aplicaciones biotecnológicas del PGAL.

Bibliografía

1. Assis de Brito T.L., Monte-Alto-Costa A., Romana-Souza B. 2014. Propranolol impairs the closure of pressure ulcers in mice. *Life Sciences* 100:138–146.
2. Asociación Mexicana de Cirugía General. 2009. Guía Práctica Clínica (GPC) para la prevención, diagnóstico y tratamiento de las úlceras por presión.
3. Bello Y. 2000. Recent Advances in wound healing. *Contempo Updates JAMA* 283(6):716-718.
4. Canty E.G., Kadler K.E. 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* 118(7):1341-1353.
5. Cimbala J.M. 2013. Stress, Strain, and Strain Gages. Penn State University.
6. Durán Yaneth J.C., Alarcón C., Velásquez D. 2012. Aplicación de biomateriales de base biológica, moléculas bioactivas e ingeniería de tejidos en cirugía plástica periodontal. Una revisión. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* 5(3):142-149.
7. Escuela Andaluza de Salud Pública. 2000. Tratamiento local de las úlceras por presión. 16(5):17-20.
8. Fabres V.C. 2010. Técnicas del Futuro: Ingeniería de Tejidos y uso de Células Madre en Medicina Reproductiva. *Rev. Clin. Med. Condes.* 21(3):488-493.
9. Gantwerker E.A., Hom D.B. 2011. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. *Facial Plastic Surgery Clinics* 19:3.
10. Interlink Electronics. S/A. Force Sensing Resistor. Integration Guide and Evaluation Parts Catalog. Disponible en <http://www.interlinkelectronics.com>
11. Kasuya A., Sakabe J., Tokura Y. 2014. Potential application of in vivo imaging of impaired lymphatic duct to evaluate the severity of pressure ulcer in mouse model. *Scientific Reports* 4:4173.
12. Kawai K., Suzukib S., Tabatac Y., Nishimurad Y. 2005. Accelerated wound healing through the incorporation of basic fibroblast growth factor impregnated gelatin microspheres into artificial dermis using a pressure-induced decubitus ulcer model in genetically diabetic mice. *British Journal of Plastic Surgery* 58:1115–1123.

13. Kawamata S., Kurose T., Kubori Y., Muramoto H., Honkawa Y. 2015. Effects of the magnitude of pressure on the severity of injury and capillary closure in rat experimental pressure ulcers. *Med. Mol. Morphol.* 48:24–32.
14. Khavkin J., Ellis D.A.F., 2011. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast. Surg. Clin.* 19 229–234.
15. Li Z., Tamb E.W.C., Lau R.Y., Soc K., Wu W., Mak A.F.T. 2009. Post pressure response of skin blood flowmotions in anesthetized rats with spinal cord injury. *Microvascular Research* 78:20–24.
16. Li Z., Tam E., Kwan M.P., Mak A.F.T., Lo S.C., Leung M.C. 2006. Effects of prolonged surface pressure on the skin blood flowmotions in anaesthetized rats—an assessment by spectral analysis of laser Doppler flowmetry signals. *Phys. Med. Biol.* 51:2681–2694.
17. Liao F., O'Brien W.D., Jan Y. 2013. Assessing complexity of skin blood flow oscillations in response to locally applied heating and pressure in rats: Implications for pressure ulcer risk. *Physica A* 392:4905–4915.
18. Lin F., Pandya A., Cichowski A., Modi M., Reprogle B., Lee D., Kadono N., Makhsous M. 2010. Deep tissue injury rat model for pressure ulcer research on spinal cord injury. *Journal of Tissue Viability* 19:67-76.
19. Loomis C.A., Koss T., Chu D. S/A. Desarrollo de la piel fetal.
20. Luo Y., Wanga Y., Taib B.L., Chenb R.K., Shihb A.J. 2015. Bone Geometry on the contact stress in the shoulder for evaluation of pressure ulcers: Finite element modeling and experimental validation. *Medical Engineering and Physics* 37:187–194.
21. Maldonado A.A., Lara C., López J.M., Mallén M., García-Honduvilla N., Buján J. 2014. A Novel Model of Human Skin Pressure Ulcers in Mice. *PLoS One* 9(10).
22. McGrath J.A., Eady R.A., Pope F.M. 2004. Rook's Textbook of Dermatology. 7° edición. Blackwell Publishing. pp. 31–36.
23. Moreno J.C., Fernández J.F., Ochoa P., Ceres R., Calderón L., Rocon L., Pons J.L. 2004. Aplicación de sensores piezoeléctricos cerámicos a la caracterización biomecánica. *Bol. Soc. Esp. Ceram.* V. 43(3):668-673.
24. Nandana B., Subhas C. K. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28:325-347.

25. Park C.J., Clark S.G., Lichtensteiger C.A., Jamison R.D., Wagoner Johnson A.J. 2009. Accelerated wound closure of pressure ulcers in aged mice by chitosan scaffolds with and without bFGF. *Acta Biomaterialia* 5:1926–1936.
26. Peirce S.M., Skalak T., Rodehaever G.T. 2000. Ischemia reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: A skin model in the rat. *Wound Repair Regen.* 8:68–76.
27. Peirce S.M., Skalak T.C., Rieger J.M., Macdonald T.L., Linden J. 2001. Selective A_{2A} adenosine receptor activation reduces skin pressure ulcer formation and inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:67–74.
28. Sarjit A., Wang Y., Dykes G.A. 2014. Antimicrobial activity of Gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. *Food Microbiology* 46:227-233.
29. Sarvis C. 2008. Uso de antisépticos para tratar heridas infectadas. *Nursing* 26(9): 44–45.
30. Sener G., Sert G., Sehirli O., Arbak S., Uslu B., Gedik N., Ayanoglu-Dulger G. 2006. Pressure ulcer-induced oxidative organ injury is ameliorated by β-glucan treatment in rats. *International Immunopharmacology* 6:724– 732.
31. Sociedad Ibero-latinoamericana de Úlceras y Heridas. 2013. 2º Jornada Mundial por la prevención de las Úlceras por Presión.
32. Soldevilla J. 2003. Directrices generales sobre el tratamiento de las úlceras por presión. GNEAUPP, Logroño España.
33. Stadler I., Zhang R., Oskoui P., Whittaker M.S., Lanzafame R.J. 2004. Development of a Simple, Noninvasive, Clinically Relevant Model of Pressure Ulcers in the Mouse. *Journal of Investigative Surgery* 17:221–227.
34. Strong A.L., Bowles A.C., MacCrimmon C.P., Lee S.J., Frazier T.P., Katz A.J., Gawronska-Kozak B., Bunnell B.A., Gimble J.M. 2014. Characterization of a Murine Pressure Ulcer Model to Assess Efficacy of Adipose-derived Stromal Cells. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 3:334.
35. Tan S., Guana X., Grün C., Zhou Z., Schepers U., Nick P. 2015. Gallic acid induces mitotic catastrophe and inhibits centrosomal clustering in HeLa cells. *Toxicology in vitro, in press.*
36. Thomas C. 2001. Tratamiento de las úlceras por presión. *Nursing* 41.
37. Vela A. 2013. Magnitud del evento adverso: Úlceras por presión. *Rev. Enferm. Inst. Mex. Seg. Soc.* 21(1).

38. Vela G., Aparicio A., Jiménez S., Rodríguez S. 2013. Estudio económico descriptivo de la atención a las heridas crónicas en México.
39. Vohra R.K., McCollum C.N. 1994. Fortnightly Review: Pressure Sores. *BMJ Journals* 309:853-857.
40. Wassermann E., Griensven M., Gestaltner K., Oehlinger W., Schrei K., Redl H. 2009. A chronic pressure ulcer model in the nude mouse. *Wound Rep. Reg.* 17:480–484.
41. Xiao D.Z.T., Wu S.Y.Q., Mak A.F.T. 2014. Accumulation of loading damage and unloading reperfusion injury — Modeling of the propagation of deep tissue ulcers. *Journal of Biomechanics* 47:1658–1664.
42. Ya-Ling S., Shu-Hua C. 2015. Sensitive and selective determination of gallic acid in green tea samples based on an electrochemical platform of poly(melamine) film. *Analytica Chimica Acta*, *in press*.
43. López J., Hernández-Alcántara J.M., Roquero P., Montiel C., Shirai K., Gimeno M., Bárzana E. 2013. Trametes versicolor laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97:100–105.
44. Masson. Dermatología pediátrica. Texto y atlas en color. S/A. Ed. Elsevier. Cap. 1.