UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENDODONCIA

“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE LA PIEL POSTERIOR A UN PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN QUÍMICA”

AUTOR:

M.E. MARÍA JOSÉ SANMIGUEL ACOSTA

Tésis presentada para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN ENDODONCIA

DIRECTOR: …….PhD. Hector Eduardo Flores Reyes.

CO-DIRECTORA: ……..……..PhD. Diana Maria Escobar Garcia.

ASESOR……PhD. José Manuel Gutierrez Hernandez.

ASESOR……..……MsC. María Verónica Méndez González.

ASESOR……..…… PhD. Amaury de Jesús Pozos Guillén.

.

San Luis Potosí, S.L.P., 12 de Noviembre del 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN ENDODONCIA

“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE LA PIEL POSTERIOR A UN PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN QUÍMICA”

AUTOR:

M.E Maria José Sanmiguel Acosta

Tésis presentada para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN ENDODONCIA

DIRECTOR ……..……PhD. Hector Eduardo Flores Reyes

Profesor Investigador Maestría en Endodoncia

UASLP San Luis Potosí, S.L.P.

CO-DIRECTORA: ……. PhD. Diana Maria Escobar Garcia

Profesor Investigador del Laboratorio de Ciencias Basicas en la Facultad de Estomatología.

UASLP San Luis Potosí, S.L.P.

ASESOR……PhD. José Manuel Gutierrez Hernandez.

Investigador Post Doctoral

ASESOR……MsC. María Verónica Méndez González.

Profesor Investigador Maestría en Endodoncia.

UASLP San Luis Potosí, S.L.P.

ASESOR……PhD. Amaury de Jesús Pozos Guillén

Profesor Investigador Facultad de Estomatología.

UASLP San Luis Potosí, S.L.P.

San Luis Potosí, S.L.P., 12 Noviembre del 2024

“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE LA PIEL POSTERIOR A UN PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN QUÍMICA”

AUTOR: M.E María José Sanmiguel Acosta

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia por las siguientes autoridades:

_____

Dr. Alan Martínez Zumarán
Director de la Facultad de Estomatología

_____

Dra. Yolanda Hernández Molinar
Jefa de la División de Posgrados de la Facultad de Estomatología

_____

MsC. María Verónica Méndez González
Coordinadora de la Maestría en Endodoncia

“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE LA PIEL POSTERIOR A UN PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN QUÍMICA”

AUTOR: M. E. MARÍA JOSÉ SANMIGUEL ACOSTA

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia por los siguientes asesores:

_____

PhD. Héctor Eduardo Flores Reyes
Director de Tésis

_____

PhD. Diana María Escobar Gárcia
Co-Directora de Tésis

_____

MsC. María Verónica Méndez González
Asesor

“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE LA PIEL POSTERIOR A UN PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN QUÍMICA”

AUTOR: M.E. MARÍA JOSÉ SANMIGUEL ACOSTA

Trabajo de grado aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia por las siguientes sinodales:

_____

Dra. Norma Verónica Zavala Alonso.
Presidente

_____

Dra. Claudia Denisse Casillas Contreras.
Secretaria

_____

_____

Dr. Mario Aurelio Martínez Jiménez
Vocal

AGRADECIMIENTOS:

Se agradece a todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo de investigación.

A mi poderosisismo Team de Ciencias Básicas LITERAL sin ustedes esto no hubiera podido ser posible.

Dr. Hector: por retarme con este tema de tesis, gracias por hacerme enamorarme de la endodoncia, empezando por odiarla, me enseño a no tomarme las cosas tan en serio, a cuestionarme y a no quedarme en lo que ya se, me reto y dejeme decirle que sufri con esta tesis pero no me arrepiento de nada, no hubiera elegido otro tema y no hubiera querrido otro director, simplemente GRACIAS.

Dra. Diana: mi poderosa Dra Diana, nunca se rindio conmigo, no hubo duda que no pudiera preguntar, ni explicación que no me diera, desde lo mas básico a lo mas complicado, me llevo de la mano y me escucho en mis miles de ataques de frustración, gracias por entenderme y demostrarme que siempre puedo más.

Dr. Manuel: desde mis quejas hasta el llanto, simplemente gracias por ser parte de este proyecto, sin usted hubiera caído en la locura, por permitirme sentir que esta bien estar mal, por enseñarme desde 0 y no rendirse, por siempre un comentario positivo, por demostrarme que el arte de enseñar sigue vivo en doctores como usted, gracias!

Carito, Sam y Mau: desde 0 me enseñaron todo, con sentido el humor y paciencia, sin tener una obligación conmigo siempre me brindaron su apoyo y su mano, estoy agradecida con la vida de haberlos conocido, me brindaron su inteligencia sin arrogancia y me enseñaron que siempre se puede superar a uno mismo, gracias por acompañarme en este proyecto.

Dra. Vero Zavala gracias por brindarme su apoyo a lo largo de este proyecto, su corazon desprende amor y amabilidad, la llevo en mi corazón.

Un agradecimiento especial al Laboratorio del Departamento de madera, celulosa y papel del centro universitario de ciencias exactas e ingeniería de la Universidad de Guadalajara.

DEDICATORIA

A mi madre, la definición de feminismo, gracias por desafiarme cada día por hacerme una mejor mujer y demostrarme lo que se puede llegar a hacer con dedicación y ganas, por impulsarme a no quedarme en mi zona de confort y hacer este posgrado, por no dudar en mi y todos los días recordarme lo poderosa que soy, eres mi mayor ejemplo y eres el estándar que anhelo algún dia superar, simplemente te amo madre.

A mi hermana que aún en la distancia tus animos no faltaron, siempre encontre en ti un apoyo y sobre todo siempre me escuchaste, al igual que mami nunca has dudado de mi capacidad y siempre me haces sacar lo mejor de mi, eres mi mejor amiga, mi complice y me encanta que esta familia este llena de pura mujer ejemplar, gracias por darnos el regalo y la inspiración a mejor cada dia, nuestra Valentina, mi rayito de sol.

Mi ale, gracias por atravesar este viaje nada facil a mi lado, no solo en lo academico, sufrimos el estrés juntos, mi depresión y lo que derivo de esta, eres mi equipo y aunque no seamos perfectos siempre, somos todo lo que el otro necesita, mi mayor admirador en todo lo que hago, mi numero uno en cada aspecto de mi vida, que no duda nunca de lo que soy capaz de dar, simplemente tu y yo.

A mis hermanos de otra madre, Clara, Lu, Andy y Toñito, mis reales, los unicos y verdaderos, los que estuvieron desde que odiaba la endodoncia hasta que me enamore profundamente de ella, gracias por brindarme su hermandad todos estos años y celebrar mis logros como suyos, los amo.

A mis compañeros, gracias por tantas risas, peleas y por demostrarme los seres humanos que son, sin mascaras, sin duda no hubiera elegido pertenecer a otra generación, me hicieron crecer en este proceso y a conocerme, la maestría no nos preparo solo academicamente, nos preparo para la vida y ustedes fueron parte fundamental de este aprendizaje, me los llevo en el corazon y ojala para toda la vida.

Mis doctorcitos, Dr Ale aldrete, Dra. Clau Casillas, Dr Ducky y mi Doctorcita Karlita, gracias por darse el tiempo de conoceme, de ver lo que hay detrás de este carácter fuerte y a veces un poco molesto, gracias por brindarme su apoyo siempre que lo necesite y por simple y sencillamente estar, hacer este proceso mas ameno y darme todo lo necesario para volar tanto academicamente como persona, espero tenerlos en mi vida por muchos años mas, me los llevo en el corazón.

"Everybody want to know what I would do if I didn't win... I guess we'll never know"

“caracterización de las propiedades físicas de la piel posterior a un proceso de descelularización química” by María José Sanmiguel Acosta is licensed under CC BY-NC-ND 4.0



ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Fig. 1 Rata Wistar 23
Fig. 2 Piel de porcino 23
Fig. 3 Piel humana donada por el Hospital Dr. Ignacio Morones Prieto 24
Fig. 4 Pasos para la obtención de la piel de rata siguiendo un orden cronológico..... 25
Fig. 5 Piel de porcino post protocolo de obtención, dividida en muestra control y muestra a descelularizar..... 26
Fig. 6 proceso de descelularización (1) Muestras en rotación constante en equipo Roller mixer, (2) muestras en tripsona al 0.03%, (3) FBS de Biowest utilizado en el protocolo, (4) muestras en Roller mixer con triton X-100 e Hidroxido de amonio 27
Fig. 7 Piel de rata en maquina universal sometida a ensayo de fuerza. 28
Fig. 8 (A) Sputter Coater (B) se colocan las muestras en el sputter coater (C) generación de plasma al vacio para baño de oro (D) muestras con baño de oro €(F) colocación de muestra SEM 29
Fig. 9 Micrografías obtenidas del SEM 31
Fig. 10 Micrografías de piel no descelularizada (untreated) y descelularizada (treated) de rata, porcino y humano a 500X..... 32
Fig. 11 (A) Muestras de Piel preparadas para ensayo de reología (B) Reómetro modelo MCR 302e Anton Paar. 33
Fig. 12 micrografía de piel humana a X30 40

Gráfica 1 Resultados de Barrido de Frecuencia 35
Gráfica 2. Comparación de Pieles, comparando la fuerza utilizada hasta el momento de modificación de la muestra, utilizando Prueba KW y un post hoc Dunn´s, (*) relaciona los elementos que fueron estadísticamente significativos. 36
Gráfica 3 Comparación de Tensión de muestras de piel, utilizando prueba KW y post hoc Dunn´s, , (*) relaciona los elementos que fueron estadísticamente significativos. . 37
Gráfica 4 Comparación del desplazamiento de las muestras en mm; Se realiza prueba ANOVA y un post hoc Tukey, (*) relaciona los elementos que fueron estadísticamente significativos..... 37
Gráfica 5 Se realiza comparación de muestras en piel en % de deformación, prueba KW con post hoc Dunn´s, (*) relaciona los elementos que fueron estadísticamente significativos..... 38
Gráfica 6-7 Barrido de amplitud para piel de rata, porcino y humano. 43
Gráfica 7 de Barrido de Frecuencia de estudio de investigación de Miyasaka 2024 44

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1
2. MARCO TEÓRICO 4
2.1 MATRIZ EXTRACELULAR 4
2.1.1 COLÁGENO 4
2.1.2 FIBRONECTINA 5
2.1.3 LAMININA 5
2.1.4 ÁCIDO HIALURÓNICO 5
2.2 FUNCIONES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR 5
2.3 DESCELULARIZACIÓN 6
2.4 METODOS QUÍMICOS 7
2.4.1 SURFACTANTES. 8
2.4.2 ÁCIDOS Y BASES 9
2.4.3 SOLUCIONES HIPER E HIPOTÓNICAS 9
2.5 METODOS BIOLÓGICOS 9
2.6 MÉTODOS FISICOS/MECÁNICOS 10
2.7 METODOS COMBINADOS. 11
2.8 PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN 11
2.9 MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA (dECM) 12
2.9.1 APLICACIONES dECM 12
2.10 MATRIZ DÉRMICA ACELULAR (ADM) 14
2.10.1 APLICACIONES ADM 14
2.11 PIEL 15
2.11.1 PROPIEDADES FISICAS DE LA PIEL 16

2.11.2 SIMILITUDES ENTRE LA PIEL HUMANA, PORCINO Y RATA. 16
3. Justificación 16
4 Pregunta de investigación 17
5 Objetivo general 17
6 Objetivos específicos 18
1. Hipótesis 18
2. Metodología 18
8.1 Lugar de realización 18
8.2 Diseño de estudio. 18
8.2.1 Tipo de estudio 18
8.3 Número de grupos 18
8.4 Criterios de selección 19
8.4.1 Criterios de Inclusión. 19
8.4.2 Criterios de Exclusión 19
8.4.3 Criterios de Eliminación 19
3. Variables 20
9.1 Variables Independientes 20
9.2 Variables Dependientes 21
10 PLAN DE TRABAJO 23
10.1 Obtención de muestras 23
10.2 Preparación de piel. 24
10.3 Protocolo de descelularización 26
10.4 Pruebas de fuerza en maquina universal 28
10.5 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) 28
11 CONSIDERACIONES ÉTICAS 30

12 RESULTADOS 31
12.1 SEM 31
12.2 REOLOGÍA 33
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 36
14. DISCUSIÓN 39
15. CONCLUSIÓN 45
16. PERSPECTIVAS 45
13 BIBLIOGRAFíA 47

1. INTRODUCCIÓN

El termino de ingeniería tisular fue utilizado por primera vez en la medicina en el año 1987, podemos definirla como una interdisciplina (colaboración de varias disciplinas) que aporta los principios de la ingeniería y los combina con las ciencias biológicas así manteniendo la función correcta de los tejidos y/u órganos.

La ingeniería o la regeneración tisulares ahora se pueden encontrar como sinónimos ya que estas están basadas en la regeneración de los tejidos perdidos de una manera funcional. Esta materia interdisciplinaria tiene un modelo en la cual se llegan a mezclar biomateriales estos derivando en andamio o moléculas para en conjunto o separados organizar la formación de los tejidos.

Acorde a la definición otorgada por el National Institute of Health (NIH) se define al biomaterial como “Componente o mezcla de elementos de origen natural o sintético, distintas de los medicamentos, que puedan emplearse para potenciar o sustituir de manera parcial o total cualquier tejido, órgano, con la terminación de conservar o prosperar la condición de vida.” (1)

Los biomateriales actualmente están divididos en 3 ramas:

I. BIOINERT: se desglosa como los biomateriales farmacológicamente inertes, no hay una reacción con el tejido del huésped.
II. MATERIALES BIOACTIVOS: materiales que al contactar con el tejido tienen un efecto.
III. MATERIALES CON RESPUESTA CELULAR: la principal función de estos materiales es fomentar que exista una respuesta celular con el tejido.

Algunos de los biomateriales deben de estar presentados en forma de andamio para poder cumplir con su función. Ya que este andamio será la guía celular para poder tener una regeneración se espera que este cumpla ciertos requisitos, como son:

I. Una red porosa en 3D para intercambio de nutrientes.
II. Degradación y reabsorción adecuada.
III. Rugosidad para así poder tener una adhesión celular.

IV. Adaptación al sitio de implantación
V. Fácil manejo del material para poder adaptarlo a la forma y tamaño de donde se quiere posicionar.

Los órganos y tejidos del cuerpo humano están constituidos por células, moléculas y por una matriz extracelular (ECM) la cual es clave para la homeostasis y la curación de los tejidos por lo que es importante no ignorar que los andamios deben de tener una similitud con la matriz extracelular, un componente no celular el cual es fundamental para la ingeniería tisular ya que permite darle una estructura y guía a las células, es un componente específico para la señalización, otras de las funciones de la ECM son; el anclaje celular, la guía para la señalización y la migración o adhesión celular, entre otras.

Al remover el contenido de la ECM esta se convierte en una matriz extracelular descelularizada (dECM), al quedar sin contenido esta juega un papel muy importante en la medicina regenerativa ya que queda como una estructura tridimensional perfecta para poder crear un ambiente adecuado para la función que se necesita. La descelularización consta de un proceso en el cual por diferentes métodos ya sean: químicos, físicos y biológicos, se busca aislar la ECM eliminando elementos como los antígenos o elementos de señalización celular para poder obtener el andamio perfecto para la regeneración tisular. Es necesario llevar a cabo este proceso de descelularización para evitar un rechazo autoinmune.

En el área estomatológica se pueden presentan varios tipos de ausencia de tejidos tanto duros como blandos, estas pérdidas o ausencias de tejido se pueden deber a diversos factores como son:

1. Enfermedades
2. Infecciones
3. Trauma
4. Cáncer
5. Afecciones genéticas.

Una de las causas más comunes de perdida de tejido en la cavidad oral es la periodontitis que se ha reportado afecta a más del 47% de la población refiriendo solamente la población estadounidense.

La periodontitis provoca la destrucción de los tejidos duros y blandos, así como la destrucción del ligamento periodontal. En el año de 1976 Melcher fue el primero en utilizar biomateriales al utilizar una membrana como guía para el proceso de curación.

Para la regeneración periodontal es indispensable el uso de biomateriales para la regeneración tisular guiada (GTR) utilizando los andamios como una barrera física, ya que esta nos permite utilizarla como un muro para evitar la entrada de tejido en el sitio afectado y así promover una señalización celular, proliferación celular y de esta forma acelerar el proceso de curación.

Al encontrarnos con estos defectos y contar con la tecnología y los conocimientos adecuados para poder realizar GTR de manera controlada, adecuada y de manera rápida y eficaz por lo que el objetivo de este trabajo de investigación es comparar algunas características físicas de piel descelularizada humana, porcino y rata, propuestas como materiales para ser usados como soporte y protección de lesiones en piel promoviendo su regeneración.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (ECM) es una estructura bien organizada en 3D, la cual tiene funciones en la organización, regulación y remodelación en procesos celulares. Esta ECM está compuesta por; proteoglicanos (PGs), glucosaminoglicanos (GAGs), elastina, fibras de colágeno, fibronectina, entre otras múltiples fibras y proteínas. Esta se puede dividir en dos grupos:

I. Intersticial: red organizada en contacto con las células.
II. Pericelular: red que se conecta con otras a través de enlaces.

La ECM tiene como funciones principales la morfogénesis celular, el desarrollo, la homeostasis, el crecimiento diferenciación y adhesión celular. (2)

La composición de la ECM es común que dependa del tejido en el cual se encuentra, por lo que podemos esperar diferencias en otros sitios como lo son el tamaño de la porosidad, topografía, cantidad y tamaño celular y de fibras.

Se han identificado más de 200 genes en el cuerpo humano componentes de la ECM el cual es llamado matrisoma un ensamble entre genes y proteínas, sin embargo, el número exacto de componentes extracelulares hasta la fecha es desconocido.

Las siguientes macromoléculas son indispensables para la correcta organización y función de la ECM. (2,3)

2.1.1 COLÁGENO

Este es el mayor compuesto de la EMC se ha reportado que el colágeno se encuentra en el 90% de la ECM. El colágeno se encuentra presente en varios procesos celulares como lo es la adhesión, proliferación y migración celular.(3)

El tipo de colágeno más presente en la ECM es I, II y III, estos operan en la estabilidad, elasticidad y soporte de la matriz, esto hablando de la ECM en general, sin embargo, el tipo encontrado en la ECM variara dependiendo del tipo de tejido, en el tejido epitelial

principalmente abarcando la piel, órganos, pulmones y arterias que son tejidos ricos en fibras elásticas podemos encontrar con mayor abundancia el colágeno tipo XIII y XVII.(2)

2.1.2 FIBRONECTINA

La fibronectina regula las propiedades mecánicas como la tensión y los cambios que esta produce en la ECM produciendo señales externas que señalizan la topografía, composición y rigidez, esta señalización incluye a la familia de las Rho GTPasas (familia de proteínas G para la señalización), TGFβ (Factor de Crecimiento Transformante Beta, proteína presente en la apoptosis, señalización, migración, proliferación celular). (2–4)

2.1.3 LAMININA

Una Glicoproteína que está compuesta por 3 cadenas; α, β, y γ que en conjunto actúan sobre la adhesión, proliferación y migración. La laminina es fundamental para la migración ya que se unen a la membrana basal de la ECM utilizando el colágeno tipo IV utilizándolo como un tipo de “pegamento”. La laminina 322 es encontrada en el epitelio. (2,3)

2.1.4 ÁCIDO HIALURÓNICO

El ácido hialurónico (HA) fue descubierto hace aproximadamente 100 años por los farmacéuticos de origen alemán Karl Meyer and John Palmer, este es un glucosaminoglicano abundante en la ECM, entre sus funciones podemos encontrar, retención de agua, aporte de estructura, él HA puede controlar el movimiento de biomoléculas ayudando a estas a que distribuyan o transporten moléculas o sustancias en gran cantidad o tamaño, también tiene una importante función en la señalización específica a tejidos. (2,4)

2.2 FUNCIONES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La función más destacable de la ECM es proporcionar un anclaje celular, que no es solo una estructura, sino que es necesaria para la señalización biofísica y bioquímica. Su participación en la evolución humana es indispensable ya que permite señalizar los

cambios necesarios para pasar de un embrión a un adulto. El desarrollo de tejidos y órganos se da gracias a la presencia de proteínas de la ECM, con su alineamiento y estructura permite el desarrollo controlado de estos.

También tiene una importante función en la homeostasis ya que a medida de la formación de órganos y tejidos la ECM debe de ir cambiando constantemente siguiendo la formación de estos, es una interacción bidireccional. (4)

Se ha reportado a través de los años en la literatura la presencia abundante de células en la ECM que puede de repercutir de manera no deseada en el trabajo *in vitro* de la matriz, el proceso de remoción de estas células para poder obtener la matriz de la manera más pura y poder obtener un andamio perfecto acelular es llamado descelularización.

2.3 DESCELULARIZACIÓN

La descelularización es la remoción de todas las células, antígenos, que pudieran llegar a provocar una respuesta autoinmune, dando como resultado un andamio acelular que pueda preservar la compleja estructura en 3D de la matriz extracelular. (5)

Como antecedentes en la historia de la descelularización podemos destacar los siguientes acontecimientos:

- El primer reporte de una descelularización fue reportado en el año de 1948.
- Membrana basal aislada por primera vez en 1970.
- Submucosa del intestino delgado sujeta a un proceso de descelularización en el año de 1995.
- Matriz dérmica acelular comercial desarrollada en 1995 (AlloDerm™).
- Primera aplicación de matriz dérmica acelular en 1996.
- Andamio descelularizado de corazón en 2008.
- Andamio descelularizado de pulmón 2010.
- Andamio descelularizado de riñón 2013.
- Recelularización de piel de rata descelularizada 2016 (6).

El principal objetivo de la descelularización es minimizar cualquier efecto autoinmune para así poder obtener una base biocompatible para las células del nuevo huésped. (5,7,8)

La efectividad del proceso de descelularización dependerá de los siguientes factores:

1. Completa eliminación de las células.
2. Preservación integral de la matriz.
3. Densidad del tejido.
4. Capacidad de poder realizar una recelularización.

La deficiencia en un proceso de descelularización dependerá de lo siguiente:

1. Persistencia del ácido desoxirribonucleico (ADN), la persistencia de este puede provocar una respuesta proinflamatoria
2. Respuesta inhibidora sobre la proliferación celular.
3. Efecto citotóxico. (5)

Existen diversos métodos de descelularización como son los químicos, físicos, biológicos y enzimáticos, todos estos métodos suelen tener ciertas deficiencias al ser utilizados por si solos, por lo tanto, estos son utilizados en conjunto para potenciar su acción.

2.4 METODOS QUÍMICOS

La eficiencia de los métodos químicos será variable dependiendo del tamaño, densidad, grosor, cantidad celular y contenido lípido del tejido, los agentes químicos naturalmente son la primera opción para realizar la descelularización ya que se ha demostrado su rapidez y eficacia para eliminar células.

Sin embargo, los métodos químicos suelen tener una gran desventaja, ya que suelen ser incapaces de eliminar en su totalidad el ADN mitocondrial, mitocondrias y fosfolípidos. Esto puede poner en riesgo un proceso de recelularización ya que se puede tener un efecto proinflamatorio y las células pueden ser rechazadas.(9)

Se pueden utilizar varios agentes químicos para este proceso como lo son; ácidos/bases, detergentes también conocidos como surfactantes (iónicos y no iónicos), soluciones hiper o hipotónicas, alcohol.

2.4.1 SURFACTANTES.

Los agentes detergentes o surfactantes pueden ser iónicos, no iónicos o Zwitter-ionico dependiendo de su carga. Estos son los agentes químicos más utilizados en la descelularización esto debido a 3 grandes ventajas: económico, eficiencia y rapidez.

Los agentes iónicos trabajan solubilizando los componentes citoplasma y componentes celulares, rompiendo los enlaces de los ácidos nucleicos. Los dos surfactantes más utilizados son el Triton X-100 y el Dodecilsulfato sódico (SDS), estos llegando a eliminar el 90% de ADN.

- Triton X-100: este compuesto no iónico se caracteriza por eliminar el contenido celular rompiendo los enlaces DNA- lípido, lípido-lípido y lípido-proteína, sin llegar a afectar las interacciones proteína-proteína. El Triton X-100 se caracteriza por mantener la integridad y propiedades mecánicas del tejido a descelularizar. Una de las ventajas de utilizar este detergente no iónico es que suele ser un poco más amable con el tejido a comparación de los iónicos. En la mayoría de los protocolos de descelularización se suele usar el Triton X-100 al 1 %. En las desventajas que podemos encontrar en este surfactante se encuentra lo siguiente; hay una mayor rigidez en la matriz descelularizada, menor probabilidad de recelularización debido a los restos citotóxicos y una pérdida importante de biomoléculas como lo son GAGs y Proteoglicanos. (6,8,9)
- SDS: es un surfactante iónico que remueve el material nuclear en un periodo de tiempo más corto comparado con otros agentes químicos. Sin embargo, el SDS suele provocar un daño irreversible al matrisoma de la ECM por lo tanto alterará la estructura y la integridad biomecánica de la matriz. (9)
- Zwitterionico: poseen las características de los surfactantes iónicos tanto no iónicos, el (3-cholamidopropyl) (dimethylammonio]-1-propane sulfonate CHAPS es muy eficiente en preservar las proteínas estructurales de la ECM como lo son colágeno y elastina, sin embargo, se ha demostrado una deficiencia en remoción

de contenido celular. CHAPS descelulariza tejidos delgados rompiendo los enlaces lípido-proteína y lípido-lípido, posee capacidad de eliminar el ADN celular. (9)

2.4.2 ÁCIDOS Y BASES

Los ácidos y las bases catalizan la degradación hidrolítica de las biomoléculas solubilizando el citoplasma. Un ácido común utilizado en los procesos de descelularización es el ácido peracético ya que elimina los ácidos nucleicos restantes sin afectar la estructura de la ECM. El ácido peracético es altamente corrosivo por lo que suele preferirse como agente desinfectante que como agente descelularizante

Otro ácido es el acético que provoca la eliminación del colágeno presente en la ECM, por consiguiente, habrá una debilidad estructural en la ECM, pero una de sus ventajas es que no afecta los glucosaminoglicanos.

Las bases pueden eliminar en su totalidad los factores de crecimiento de la ECM, habitualmente se suelen utilizar en las etapas tempranas de la descelularización ya que ayuda a eliminar el pelo de las muestras, las bases más comúnmente utilizadas son: hidróxido de calcio, hidróxido de sodio, sulfuro de sodio, etc.

Un ejemplo de cómo actúan estas bases lo podemos tomar con el hidróxido de sodio, esta base reduce las propiedades mecánicas de las fibrillas de colágeno e interrumpen los enlaces de estos mismos. (8,10)

2.4.3 SOLUCIONES HIPER E HIPOTÓNICAS.

Las soluciones hipertónicas separan al ADN de las proteínas mientras que las hipotónicas provocan lisis celular por efectos osmóticos.

A diferencia de otros agentes químicos, las soluciones hiper e hipotónicas suelen no tener un efecto negativo en el proteosoma de la ECM con una degradación del ADN. (9,10)

2.5 METODOS BIOLÓGICOS

En este tipo de método de descelularización podemos encontrar los métodos enzimáticos, aquí se encuentran las siguientes enzimas: nucleasas, tripsina y lipasa y el

quelante Ácido Etilen Diamino Tetracético (EDTA). Es muy complejo que las enzimas logren un proceso de descelularización por si solas, lo más común es que actúen en conjunto para poder eliminar el mayor número celular posible. Una desventaja de estos métodos es que si llegan a quedar residuos de estas es alta la posibilidad de provocar una respuesta autoinmune.

La tripsina y el EDTA es común que sean utilizados en conjunto, la tripsina puede remover remanente celular y eliminar el colágeno, elastina, GAGs, mientras que el EDTA puede ayudar a las proteínas de la ECM a disociarse del contenido celular y así de alguna forma protegerse. (11)

2.6 MÉTODOS FISICOS/MECÁNICOS

Los métodos físicos y mecánicos funcionan rompiendo la membrana celular y creando un ambiente hostil que llega a resultar en la apoptosis.

Una ventaja de los métodos físicos y mecánicos es que podemos obtener una descelularización uniforme del tejido, sin embargo, estos métodos suelen ser insuficientes para la descelularización, por lo que estos métodos son utilizados en conjunto principalmente con los métodos químicos. (8,9)

- Congelación-descongelación (Freeze–thaw): este método consiste en formar cristales de hielo que actuaran rompiendo la membrana celular provocando lisis celular, sin embargo, puede causar alteraciones en la estructura de la ECM.
  Este método utiliza la alteración de la temperatura de congelación (-80ºc) y la temperatura biológica, después de este ciclo es cuando se utilizaran los surfactantes. (12,13)
- Métodos mecánicos: se induce una fuerza sobre el tejido lo que provocara lisis celular, este método utiliza algún instrumento con una punta activa (puntiaguda) que al momento de hacer contacto con el tejido y “raspar” la muestra eliminara la capa celular más superficial de esta, provocando una disminución en el número celular, sin embargo esta técnica suele ser descartada debido a que se necesita medir de manera precisa la fuerza a utilizar ya que podemos provocar daños irreversibles a los tejidos. (8)

- Métodos Ultrasónicos: las ondas ultrasónicas provocan un fenómeno conocido como cavitación, en este fenómeno las ondas provocan una serie de burbujas que golpearan el tejido provocando una ruptura de la membrana celular resultando en que todo el contenido celular salga y así lograr tener contacto con los agentes químicos y a su vez estos provocaran la descelularización. Una desventaja de este método es que se puede dañar la estructura del tejido ocasionando daños mecánicos. (13)

2.7 METODOS COMBINADOS.

Cada uno de los métodos antes mencionados posee tanto ventajas como desventajas, por lo que varias de estas técnicas son utilizadas en conjunto con otras, así se pueden complementar estos métodos logrando el resultado deseado para cada tejido a descelularizar.

Sin embargo, los métodos combinados suelen utilizar más agentes químicos, así como más tiempo en el proceso, pero se puede asegurar que se obtendrá un resultado más eficiente. Los tejidos gruesos/anchos requieren de más procesos de descelularización y más técnicas incluyendo la utilización de métodos químicos, mecánicos y enzimáticos. También se puede trabajar estos métodos en tejidos por hasta 5 días. (14)

2.8 PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN

Como se ha mencionado el objetivo principal de la descelularización es la eliminación de los componentes celulares que pueden llegar a provocar una reacción adversa. Cada tejido tiene una estructura y una organización especifica por lo que el protocolo de descelularización debe de optimizarse para el tejido a tratar, de manera que se consiga proteger la estructura y proteínas de la ECM y los GAGs.

Chun, Lim et al. Desarrollaron un protocolo para la descelularización de materiales con un propósito regenerativo y de biocompatibilidad, a continuación, se describe el protocolo:

I. Tejido lavado en agua destilada por 2 días (48 hrs) bajo agitación constante (200 rpm) a 4ºc.
II. El tejido fue colocado después en tripsina al 0.03% por 1 hr, continuando en agitación constante de 200 rpm.
III. Al concluir esta hora el tejido fue lavado con suero bovino fetal (FBS) al 10% en PBS 1X en agitación constante durante toda la noche a una temperatura de 4ºc
IV. Después el tejido fue tratado con Triton X-100 e Hidróxido de Amonio (0.05%) en agitación constante de 200 rpm por 72 hrs. Cambiando la solución cada 24 hrs, a una temperatura de 4ºc. (15)

2.9 MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA (dECM)

Los andamios de dECM son biomateriales provenientes de tejido animal o humano, eliminando los componentes inmunológicos celulares a través de los procesos de descelularización antes mencionados. El proceso de descelularización reduce la inmunogenicidad de la ECM permitiendo a los tejidos y/u órganos donados una mayor facilidad a ser aceptados por el huésped al ser trasplantados.

La dECM es biodegradable y no es proinflamatoria, esta también contiene fibrillas de colágeno y GAGs, con esto obtiene las propiedades fisicomecánicas y señalización biológica de la ECM. Es adecuada la utilización de la dECM como un sustrato biológico en 3D para una posterior inoculación celular.

Los andamios derivados de la dECM se pueden clasificar en dos:

I. Tejido Específico (Tissue-specific ECM (TS-ECM)) : esta es derivada de tejidos u órganos de fuentes homologas o heterólogas.
II. Derivado de Células (Cell-derived ECM (CECM): esta es obtenida de células cultivadas autólogas o células madre in vitro. (16)

2.9.1 APLICACIONES dECM

La matriz extracelular descelularizada preserva la estructura y las funciones de la ECM, así como son: nanoestructura, complejo bioquímico y bioinductividad, se han

descelularizado varios órganos como son: piel, corazón, hígado, tejido nervioso, tendones y vasos sanguíneos y estos han sido utilizados en varias aplicaciones de la ingeniería tisular.

Los biomateriales pueden derivar de tejidos humanos o animales, así como puede ser la piel, el pericardio, peritoneo, membrana amniótica, estos suelen ser utilizados para la regeneración de tejidos, sin embargo, la piel tiende a ser más difícil de descelularizar debido a que es un tejido muy denso y con una estructura compleja con un gran contenido lipídico, para descelularizar la piel es utilizada la tripsina como agente químico enzimático que removerá los componentes celulares de la ECM. El alcohol es utilizado para inducir la lisis celular por medio de deshidratación y produciendo la solubilización de los lípidos.(17,18)

1. dECM derivado de animales:
   Los porcinos son la mayor fuente de estos andamios debido a la gran cantidad y disponibilidad de estos. La piel de porcino es muy parecida en composición y función a la piel humana, por lo que es el tejido más utilizado para injertos, junto a la mucosa del intestino delgado. Estos tejidos han sido comercializados desde hace tiempo, como lo son: Permacol®, StratticeTM® (ambas pieles de porcino descelularizada) también esta Oasis® (mucosa del intestino delgado del porcino acelular) los cuales han sido utilizados para la regeneración de tejidos. Sin embargo, estos andamios presentan ciertas desventajas como son; una incompleta descelularización puede traer consigo una transmisión de la enfermedad o inclusive un rechazo autoinmune.
2. dECM derivado de Humanos: la piel humana, el tejido adiposo y el tejido perinatal, son los tejidos más utilizados para la regeneración de tejidos. En estos andamios hay un menor riesgo de una transmisión de enfermedades o de actividad proinflamatoria. (6)

2.10 MATRIZ DÉRMICA ACELULAR (ADM)

La matriz ADM está formada por biomateriales que provienen de tejidos dérmicos de humanos o animales, con una descelularización completa, pero manteniendo la estructura y la composición de la ECM, debido a que estos andamios que son acelulares evitan la autoinmunogenicidad.

ADM puede ser dividido en dos:

I. ADM alogénico: se fabrica a partir de donadores humanos.
II. ADM xenogénico: se obtiene principalmente de bovino o porcinos.

Sin embargo, al comparar estas dos, aunque el ADM xenogénico tiene similitudes en la estructura con ADM alogénico, las diferencias moleculares podrían resultar en una respuesta inflamatoria después del trasplante del injerto xenogénetico.

ADM contiene fibronectina, elastina, laminina, ácido hialurónico y GAGs que este eventualmente será llenado de nuevos vasos y células por el huésped que lo recibe, ya que los antiguos componentes serán degradados por la colagenasa y eventualmente serán conformados por las nuevas células del huésped que migrarán hacia el andamio. (19,20)

2.10.1 APLICACIONES ADM

Se ha reportado en la literatura el uso de ADM en el tratamiento del paladar hendido, palatoplastia, pacientes con lesión periapical persistente que provocan defectos radiculares, pacientes quemados, recubrimiento radicular, etc.

Se ha demostrado que el uso de ADM en lesiones crónicas ayuda a una recuperación de manera profunda en los pacientes que padecen estas afecciones.

Aunque el injerto de tejido conectivo es considerado el estándar de oro debido a su predictibilidad y su aumento de tejido queratinizado, sin embargo, presenta varias desventajas como son:

- Requiere de un segundo sitio quirúrgico.

- Limitada disponibilidad cuando es necesario el tratamiento de varios defectos radiculares.
- Dolor post operatorio.
- Incomodidad al paciente.
- Riesgo de dañar las arterias del paladar.
- Hemorragia.
- Mayor tiempo quirúrgico.
- Riesgo de necrosis del paladar.

Por lo antes mencionado el uso de estos andamios descelularizados se han propuesto como una gran alternativa.

Debido a la gran variedad de tejidos humanos y su inmunogenicidad lo más recomendable sería el proponer un protocolo de descelularización estandarizado. (12,21,22)

2.11 PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, es un organismo complejo con múltiples estructuras celulares que protegen a los órganos internos del medio externo. Por lo antes mencionado la piel es sometida a estrés constante por lo que esta posee propiedades para no sufrir de traumas constantemente.

La piel está compuesta principalmente por 3 capas:

A. EPIDERMIS: esta es la capa más externa, superficial de la piel, compuesta por epitelio estratificado con una extensa red celular, de está siendo principalmente los queratinocitos.
B. DERMIS: esta capa está compuesta principalmente por un tejido compacto conectivo, con un contenido extenso de proteínas, este siendo unas veinte veces más grande que la epidermis
C. HIPODERMIS: la capa más profunda de la piel, compuesta principalmente por tejido adiposo, cuya función consiste en actuar como un aislante y conforma una conexión hacia el tejido cartilaginoso y el sistema esquelético. (23–25)

2.11.1 PROPIEDADES FISICAS DE LA PIEL

Entre las propiedades físicas de la piel podemos encontrar; heterogénea, viscoelasticidad, tensión.

- ♥ HETEROGÉNEA: Lo que le otorga la falta de homogeneidad a la piel, recae en su composición rica en fibras como son; colágenas y elásticas.
- ♥ VISCOELASTICIDAD: se refiere a elasticidad cuando una fuerza es aplicada momentáneamente y el tejido es capaz de volver a su estado neutro, mientras que viscosidad habla sobre una fuerza que se mantiene constantemente y se produce un cambio duradero.
- ♥ TENSIÓN: capacidad del tejido de soportar la presión sometida y no romperse.(24)

2.11.2 SIMILITUDES ENTRE LA PIEL HUMANA, PORCINO Y RATA.

Diversos estudios han reportado las características físicas de la piel porcina, humano y rata demostrando en primer lugar que la piel porcina es similar a la piel de humano tanto en propiedades histológicas y fisiológicas especialmente en el grosor; en el estrato córneo, granular. (26) Sobre su viscoelasticidad, especies más pequeñas como rata o conejo muestran mayores efectos viscoelásticos en comparación a especies más grandes como el porcino; reportándose cierta diferencia en piel humana *In vivo* y *Ex vivo*, pero con similitudes entre éstas, con piel de porcino tanto grande como pequeño. (27)

3. Justificación

Los biomateriales son definidos como aquellos componentes o mezclas de componentes que se utilizan para potenciar o mejorar las condiciones de un órgano o tejido, son utilizados hoy en día para poder sustituir alguna falta o tejido dañado, en el área estomatológica son utilizados para mejorar las condiciones post quirúrgicas de algunos procedimientos, sin embargo hay poco entendimiento del funcionamiento o las ventajas que nos ofrecen estos materiales; la adaptabilidad de estos materiales al huésped, evitar

una reacción autoinmune, mejora la etapa postquirúrgica, pueden tratar una variedad de afecciones.

La descelularización es un procedimiento que nos permite eliminar todas las células que habitan dejando solo la estructura de la ECM que puede ser infiltrada de las células del huésped obteniendo una mejor adaptación de los tejidos a estos andamios, permitiendo una curación profunda con excelentes resultados estéticos. Estos biomateriales al ser ingresados al área odontológica deben de ser sometidos a pruebas de fuerza y reológicas para poder analizar su potencial como futuros andamios, analizando su capacidad de adaptabilidad en boca, proporcionando un medio confiable para el paciente.

Por lo que el objetivo del siguiente trabajo de investigación es comparar algunas características físicas de piel descelularizada humana, porcino y rata, propuestas como materiales para ser usados como soporte y protección de lesiones en piel promoviendo su regeneración.

4 Pregunta de investigación

¿La piel descelularizada humana mantiene sus propiedades físicas después del proceso de descelularización?

5 Objetivo general

Comparar las principales propiedades físicas de piel descelularizada humana, porcina y rata, propuestas como materiales para ser usados como soporte y protección de lesiones en piel promoviendo su regeneración.

6 Objetivos específicos

- Descelularizar piel de humano, porcina y rata
- Evaluar las propiedades Físico-Mecánicas de la piel humana, porcina y de rata.
- Analizar morfología de muestras bajo SEM

1. Hipótesis

Hi. La piel descelularizada humana, porcino y rata mantienen las mismas propiedades físico mecánicas, así como morfológicas, posterior a un proceso de descelularización química.

H0. La piel descelularizada humana, porcino y rata no mantienen las mismas propiedades físico mecánicas, así como morfológicas, posterior a un proceso de descelularización química.

2. Metodología

8.1 Lugar de realización

El siguiente trabajo de tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Laboratorio de nanomateriales de la maestría en Ciencias Odontológicas y el Laboratorio de Microscopia de la Facultad de estomatología de la misma universidad, con apoyo del Laboratorio del Departamento de madera, celulosa y papel del centro universitario de ciencias exactas e ingeniería de la Universidad de Guadalajara.

8.2 Diseño de estudio.

8.2.1 Tipo de estudio

- Experimental *In vitro*.

8.3 Número de grupos

GRUPOS.

1. Piel humana descelularizada
2. Piel humana nativa

3. Piel porcina descelularizada
4. Piel porcina nativa
5. Piel de rata descelularizada
6. Piel de rata nativa.

8.4 Criterios de selección

8.4.1 Criterios de Inclusión.

- ♥ Piel humana donada perteneciente a la pierna, piel seccionada en cuadros de 2x1 cm, grosor de 2 a 3mm, previamente desinfectada con yodo.
- ♥ Piel porcina perteneciente a la panceta, piel seccionada en cuadros de 2x1 cm, grosor de 3mm, previamente desinfectada con yodo.
- ♥ Piel de rata perteneciente al lomo – obtenida del bioterio de la facultad de medicina, piel seccionada en cuadros de 2x1 cm, grosor de 1mm., previamente desinfectadas con yodo.

8.4.2 Criterios de Exclusión

- ♥ Piel humana donada no perteneciente a la pierna, con un grosor mayor a 3 mm, piel con infecciones bacterianas o alguna lesión evidente como quemaduras ó lesión física, piel con una longitud mayor a 2x1 cm.
- ♥ Piel porcina no perteneciente a la panceta, con un grosor mayor a 3 mm, longitud mayor a 2x1 cm, piel en periodo de descomposición o con alguna lesión o trauma.
- ♥ Piel de rata no perteneciente al lomo de rata, rata no obtenida del bioterio de medicina, piel en periodo de descomposición, con un grosor mayor a 1 mm. y una longitud mayor a secciones de 2x1 cm.

8.4.3 Criterios de Eliminación

- ♥ Descomposición de la muestra.

- ♥ Desgarrado de muestra.

3. Variables

9.1 Variables Independientes

Variable	Clasificación	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Piel de Humano (Pierna)	Cualitativo	Órgano que reviste en totalidad el cuerpo humano	Piel a la cual se le realizaron protocolos de descelularización y de dejo otra muestra en control en la cual se realizaron pruebas de fuerza, reológicas y se visualizó en el SEM	Nominal
Piel porcina (Panceta)	Cualitativo	Órgano grueso que reviste en su totalidad al animal con gran contenido adiposo.	Piel a la cual se le realizaron protocolos de descelularización y de dejo otra muestra en control en la cual se realizaron pruebas de fuerza, reológicas y se visualizó en el SEM	Nominal

Piel de Rata (lomo)	Cualitativo	Órgano delgado con muy poco contenido adiposo que se encarga de proteger los órganos internos del animal	Piel a la cual se le realizaron protocolos de descelularización y de dejo otra muestra en control en la cual se realizaron pruebas de fuerza, reológicas y se visualizó en el SEM	Nominal

9.2 Variables Dependientes

Variables	Clasificación	Definición conceptual	Definición operacional	Escala
Tensión / Desplazamiento	Cuantitativo	Estado de un cuerpo donde es sometido a fuerzas opuestas.	Aplicada a través de la maquina universal.	Continúa de razón
Deformación	Cuantitativo	Fuerza que se emplea para elongar o contraer un tejido.	Aplicada a través de la maquina universal.	Continúa de razón
Fuerza	Cuantitativo	Fenómeno que provocara un movimiento o una	Aplicada a través de la maquina universal.	Continúa de razón

		deformación en una masa		
Elasticidad	Cuantitativo	Propiedad que presentan los cuerpos que al momento en el que se les ejerce una fuerza, recobran de alguna manera su forma original	Aplicada a través de la maquina universal.	Continúa de razón
Pruebas Reológicas	Cuantitativo	Ensayos realizados sobre una materia para analizar su comportamiento de deformación bajo fuerzas aplicadas.	Aplicada a través de la maquina universal.	Continúa de razón

10 PLAN DE TRABAJO

10.1 Obtención de muestras

I. Se obtuvo una rata tipo Wistar macho de 250 mg. Color blanco albino, espécimen obtenido del bioterio de medicina de la Facultad de Medicina por parte de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. (Fig. 1)



Fig. 1 Rata Wistar

II. La piel de puerco fue obtenida por la carnicería “La Blanquita”, la muestra fue obtenida de un porcino que fue sacrificado ese mismo día, obteniendo la piel de la panceta. (Fig. 2)



Fig. 2 Piel de porcino

III. La piel humana fue obtenida por donación debido a una amputación de pierna realizada en el Hospital Dr. Ignacio Morones Prieto en la capital potosina del estado de San Luis Potosí. (Fig. 3)



Fig. 3 Piel humana donada por el Hospital Dr. Ignacio Morones Prieto

10.2 Preparación de piel.

PIEL DE RATA.

I. La rata se trasladado al Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Estomatología de San Luis Potosí.
II. La piel del lomo se desinfectó con Yodo.
III. Después fue retirada con instrumental para disección y hoja de bisturí del No. 22.
IV. Posteriormente se lavó con PBS 1X para eliminar el exceso de Yodo.

V. Se dividió la piel en la que fue puesta a descelularizar y la muestra control.

VI. La muestra a descelularizar se puso a rotación constante a 4ºC. (Fig. 4)

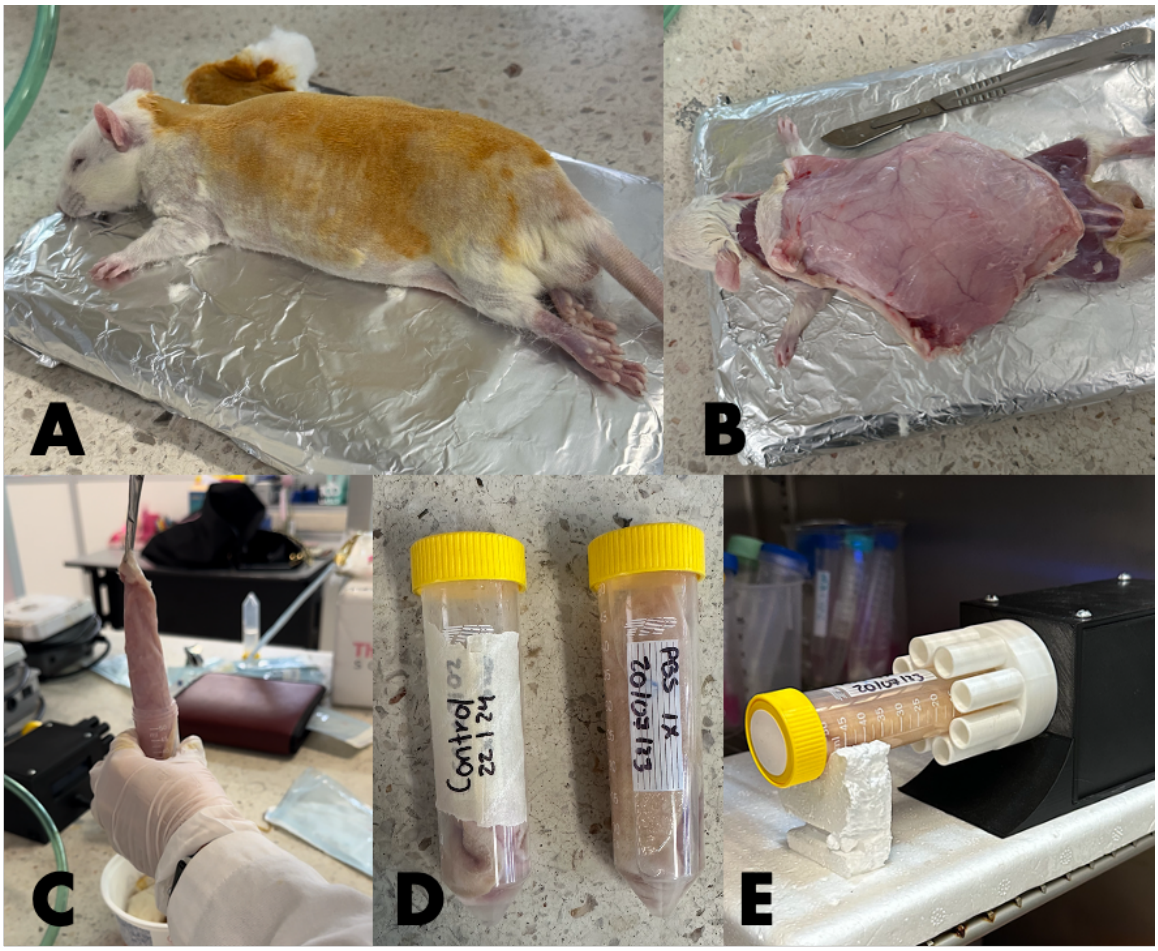


Fig. 4 Pasos para la obtención de la piel de rata siguiendo un orden cronológico.

PIEL PORCINA.

I. La muestra se trasladó al Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Estomatología de San Luís Potosí.

II. La piel se desinfectó con Yodo.

III. Se retiro el tejido adiposo con bisturí y hoja del No. 15, conservando solo la dermis y la epidermis de la panceta del porcino.

IV. La piel se lavó con PBS 1X para retirar el exceso de yodo.
V. Se dividió la piel en la que fue puesta a descelularizar y la muestra control.(Fig. 5)
VI. La muestra a descelulariza se pusó en rotación constante a 4ºC.



Fig. 5 Piel porcina post protocolo de obtención, dividida en muestra control y muestra a descelularizar

PIEL DE HUMANO.

I. La muestra se traslado del Hospital Dr. Ignacio Morones Prieto al laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Estomatología de San Luis Potosí.
II. La piel se desinfectó con Yodo.
III. Se retiro el tejido adiposo con bisturí y hoja del No. 15, conservando solo la dermis y la epidermis de la panceta del porcino.
IV. La piel se lavó con PBS 1X para retirar el exceso de yodo.
V. Se dividió la piel en la que fue puesta a descelularizar y la muestra control.
VI. La muestra a descelulariza fue puesta en rotación constante a 4ºC.

10.3 Protocolo de descelularización

Se utilizó el protocolo de Chun, Lim et al. Para el proceso de descelularización.

- Tejido lavado en agua destilada por 2 días (48 hrs) bajo agitación constante (200 rpm) a 4ºc.
- El tejido fue colocado después en tripsina al 0.03% por 1 hr, continuando en agitación constante de 200 rpm.

- Al concluir esta hora el tejido fue lavado con suero bovino fetal (FBS) al 10% en PBS 1X en agitación constante durante toda la noche a una temperatura de 4ºc
- Después el tejido fue tratado con Triton X-100 e Hidróxido de Amonio (0.05%) en agitación constante de 200 rpm por 72 hrs. Cambiando la solución cada 24 hrs, a una temperatura de 4ºc.(15)Fig. 6



Fig. 6 proceso de descelularización (1) Muestras en rotación constante en equipo Roller mixer, (2) muestras en tripsona al 0.03%, (3) FBS de Biowest utilizado en el protocolo, (4) muestras en Roller mixer con triton X-100 e Hidroxido de amonio

10.4 Pruebas de fuerza en maquina universal

Se trasladaron las muestras al laboratorio de nanomateriales de la maestría en ciencias odontológicas. Donde se encuentra la maquina universal Shimadzu modelo SCG – 1kNA, donde fueron colocadas en las mordazas de la maquina las muestras de piel de rata, porcino y humano tanto la muestra control como la piel descelularizada y se realizó en ensayo, que nos permitiría medir, la máxima tensión, desplazamiento, deformación y fuerza. (Fig. 7)

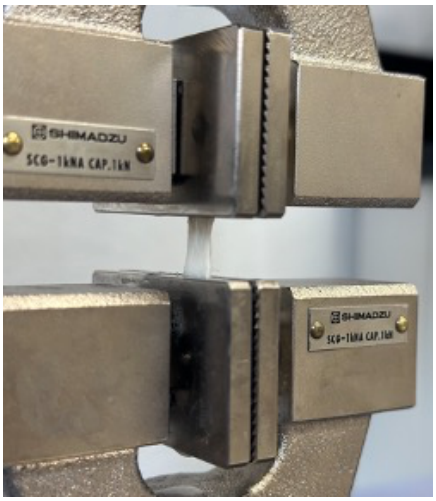


Fig. 7 Piel de rata en maquina universal sometida a ensayo de fuerza.

10.5 Microscopio Electrónico de Barrido (SEM)

Se llevaron las muestras a el Laboratorio de Nanobiomateriales Aplicados. Para realizar el protocolo de preparación de muestras para observarlas en el Microscopio Electrónico de barrido (SEM, siglas en ingles).

1. El SEM utiliza electrones para poder observar la muestra a analizar amplificada con una magnificación de hasta un millón de veces en comparación con el microscopio óptico, una ventaja del SEM es que se pueden analizar las muestras sin dañar o destruir estas.
2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS: las muestras para analizar en el SEM pueden ser materia biológica, estas son montadas en una platina y para fijarse se puede utilizar cinta adhesiva de doble cara, ya que las muestras biológicas no poseen una conductividad eléctrica se deben bañar en un material conductor como puede ser el oro, platino, paladio así conseguimos que la muestra pueda tener un efecto de carga y pueda ser analizada en el SEM. (28)

Para este trabajo realizamos una deshidratación de las muestras colocándolas en alcohol al 60 %, 70 %, 80 %, 90% y 100% cambiando el porcentaje de alcohol cada hora hasta dejarlas secar a medio ambiente por 24 hrs. (Fig. 8)

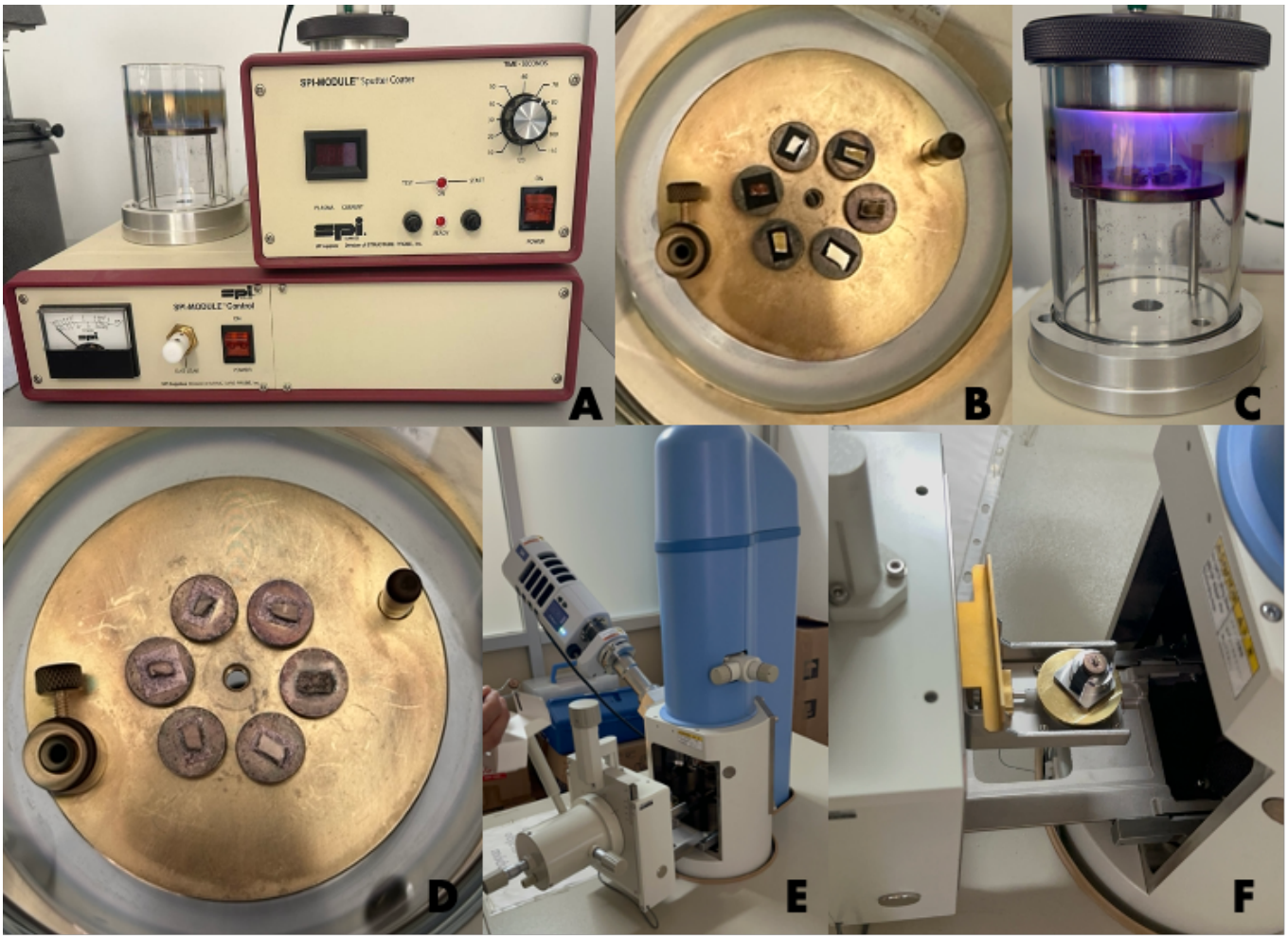


Fig. 8 (A) Sputter Coater (B) se colocan las muestras en el sputter coater (C) generación de plasma al vacio para baño de oro (D) muestras con baño de oro (F) colocación de muestra SEM.

11 CONSIDERACIONES ÉTICAS

a. El presente trabajo de investigación fue sometido a revisión al Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, con clave de aprobación **CEI-FE-075-023.**
b. La presente investigación de acuerdo con la clasificación de los riesgos en investigación corresponde a “Investigación con riesgo mínimo”.
c. Los residuos séricos se dispondrán de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para el manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos, y se tomarán los cuidados establecidos en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para las Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado, y uso de los animales de laboratorio.
d. No se contó con ningún tipo de financiamiento para el siguiente trabajo de investigación.
e. Se pretende que la difusión de resultados sea por medio de un trabajo de tesis, para su divulgación en congresos a forma de cartel o exposición.

12 RESULTADOS

12.1 SEM

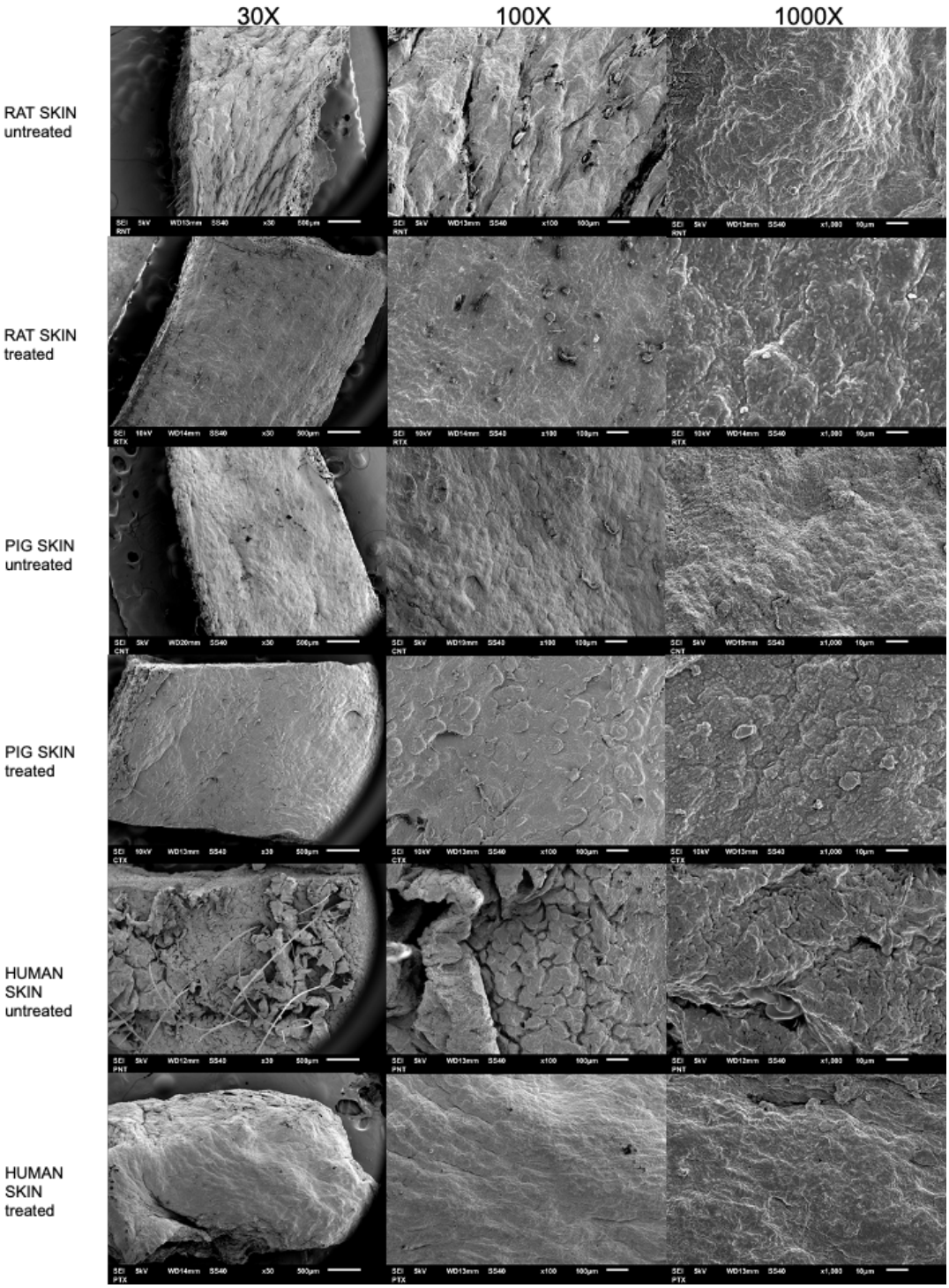


Fig. 9 Micrografías obtenidas del SEM

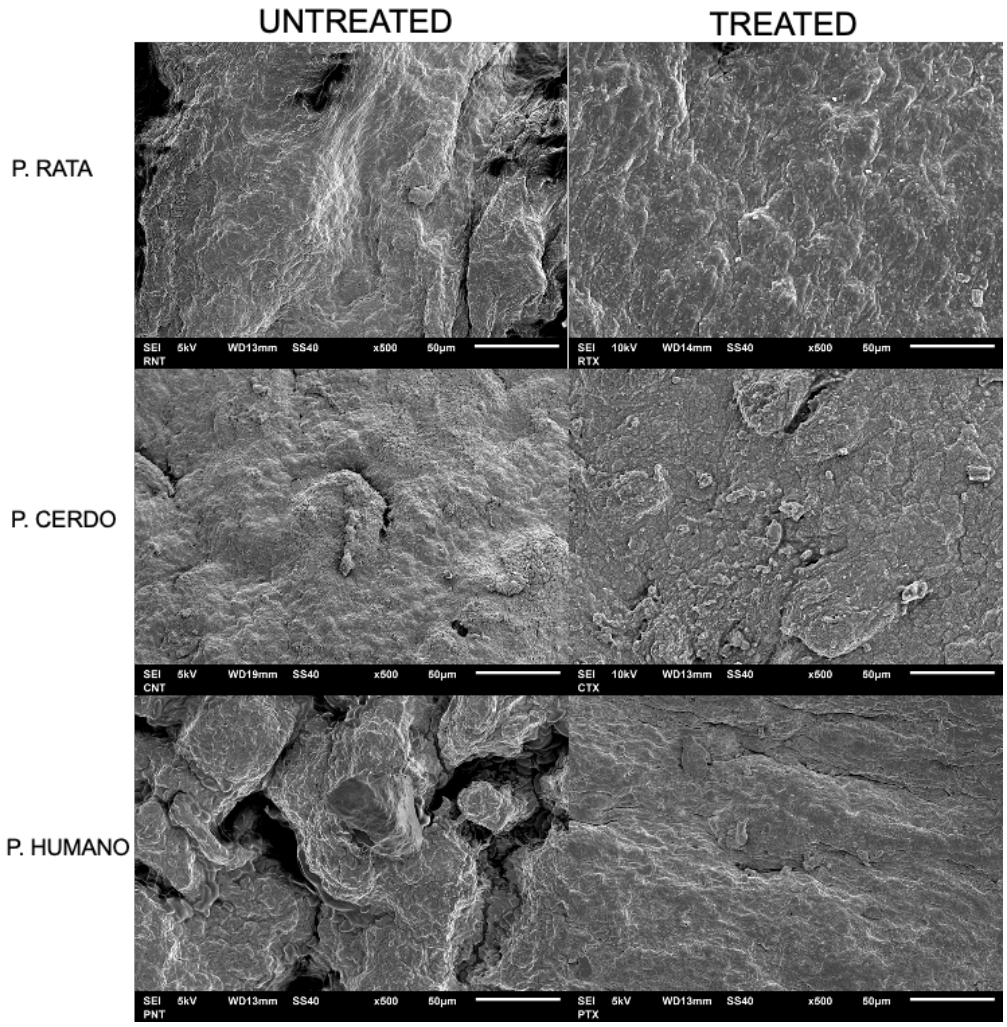


Fig. 10 Micrografías de piel no descelularizada (untreated) y descelularizada (treated) de rata, porcino y humano a 500X

12.2 REOLOGÍA

La reología se define como la ciencia que estudia la deformación de la materia. Al momento de realizar un ensayo de barrido de amplitud se analiza el estado de un material deformándolo hasta que este se rompa o comience a presentar un cambio irreversible. Esta prueba es indispensable para obtener los datos viscoelásticos de las muestras. (29)

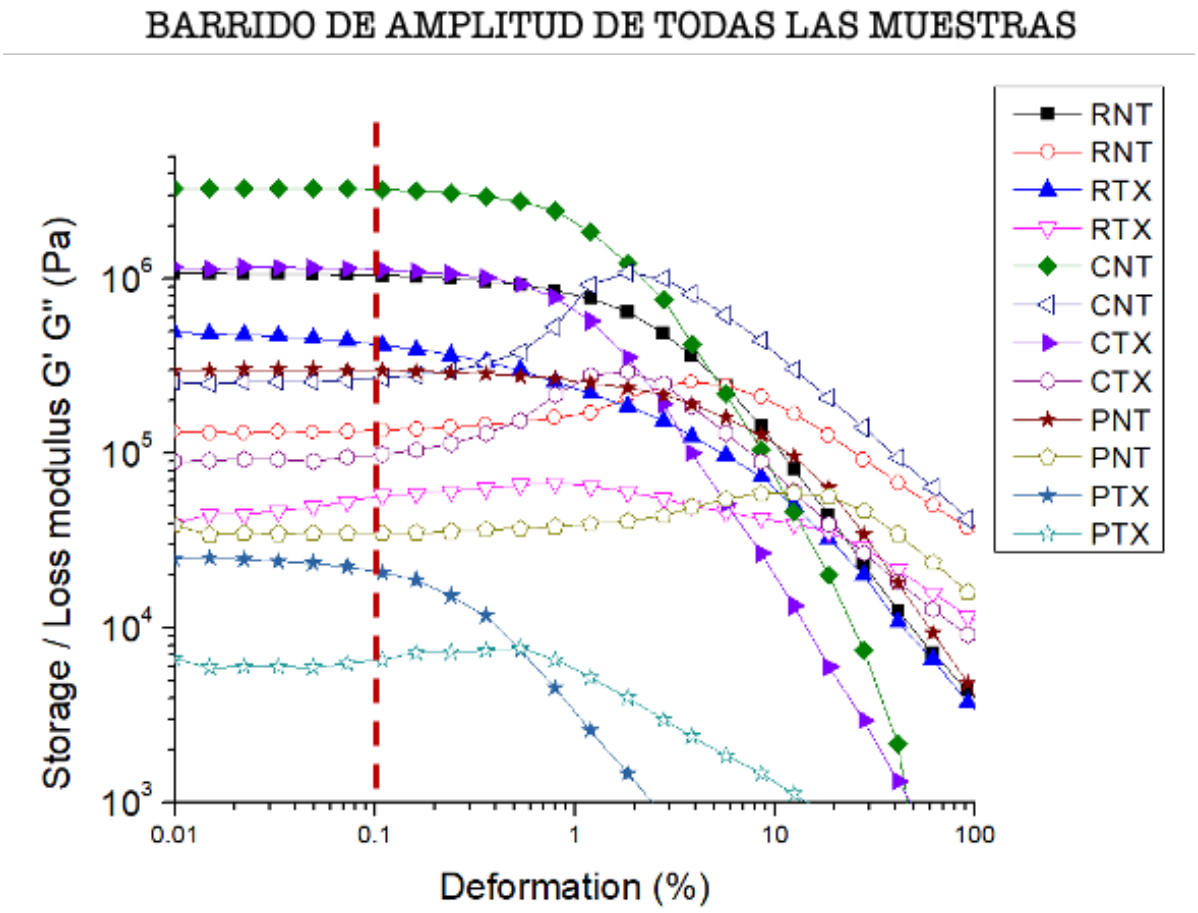
Se utilizó un reómetro modelo MCR 302e, de la marca Anton Paar y se evaluaron las muestras por Barrido de amplitud y frecuencia, posteriormente se realizó una comparación de todas las muestras (Fig. 11)



Fig. 11 (A) Muestras de Piel preparadas para ensayo de reología (B) Reómetro modelo MCR 302e Anton Paar.

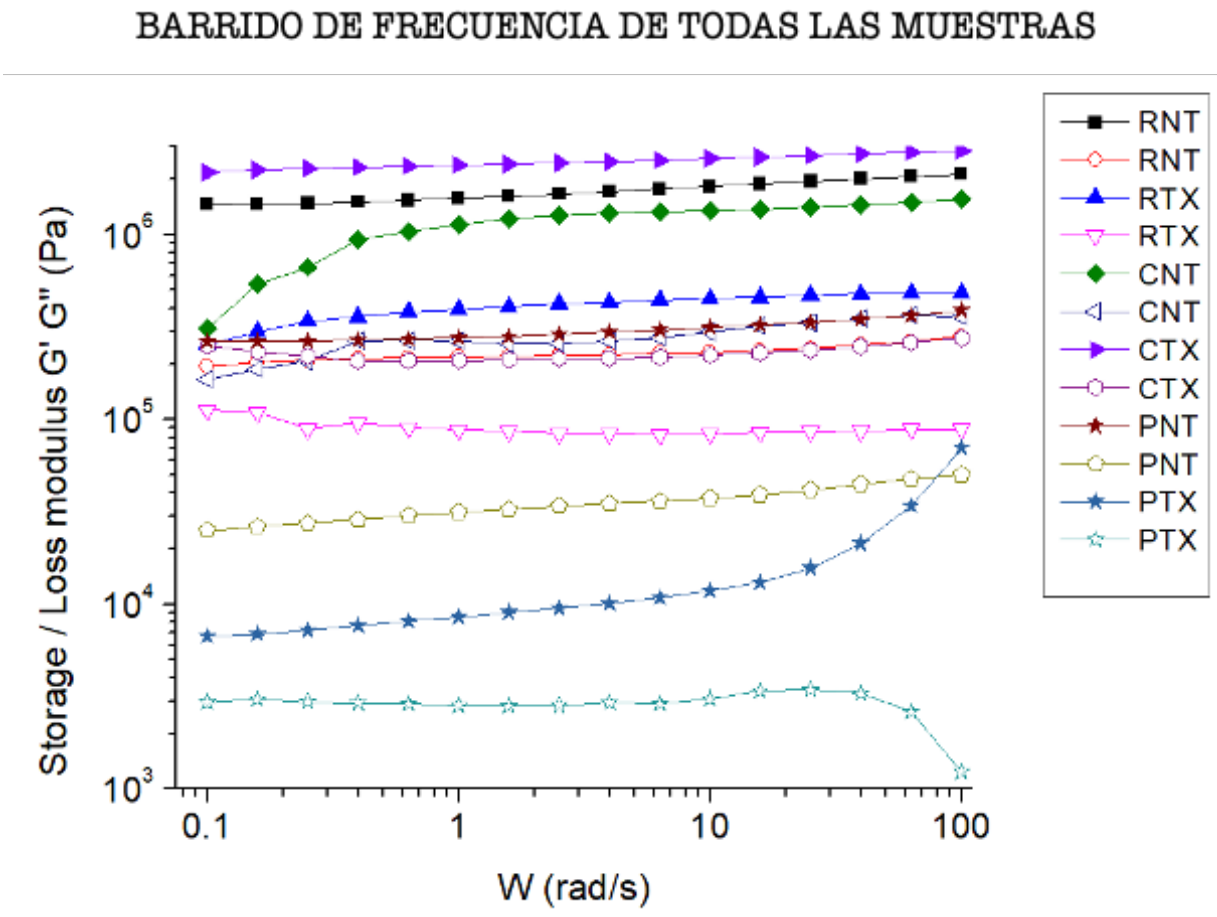
BARRIDO DE AMPLITUD: describe el comportamiento de una muestra en una deformación no destructiva.

Para la realización de este ensayo se trabajó a una fuerza constante de 1 Hz. A una temperatura de 25ºC.



BARRIDO DE FRECUENCIA: ensayo realizado para poder obtener información sobre el comportamiento interno, así como su estructura.

Se realizo el análisis de la muestra a 0.1 a 100 rad/s. a una temperatura constante de 25ºC.

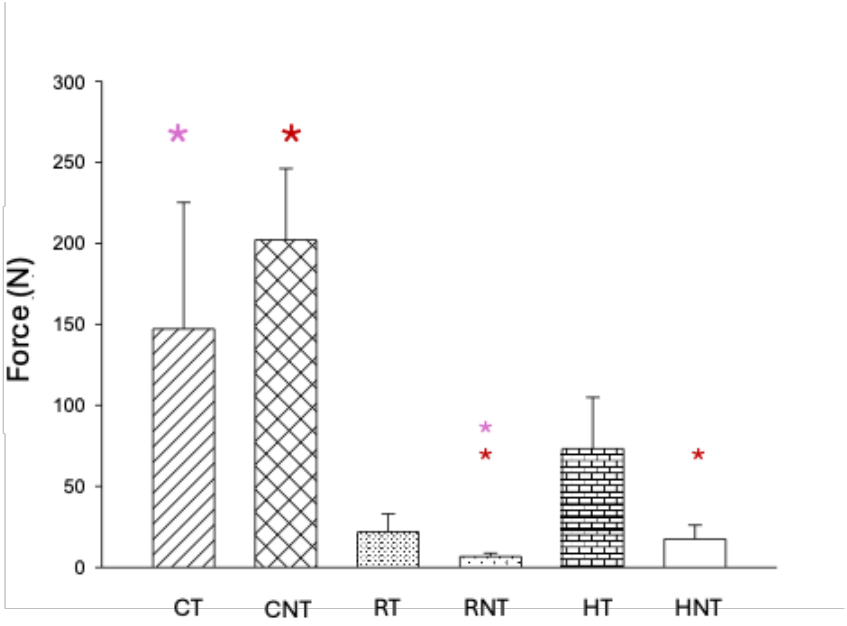


Gráfica 1 Resultados de Barrido de Frecuencia

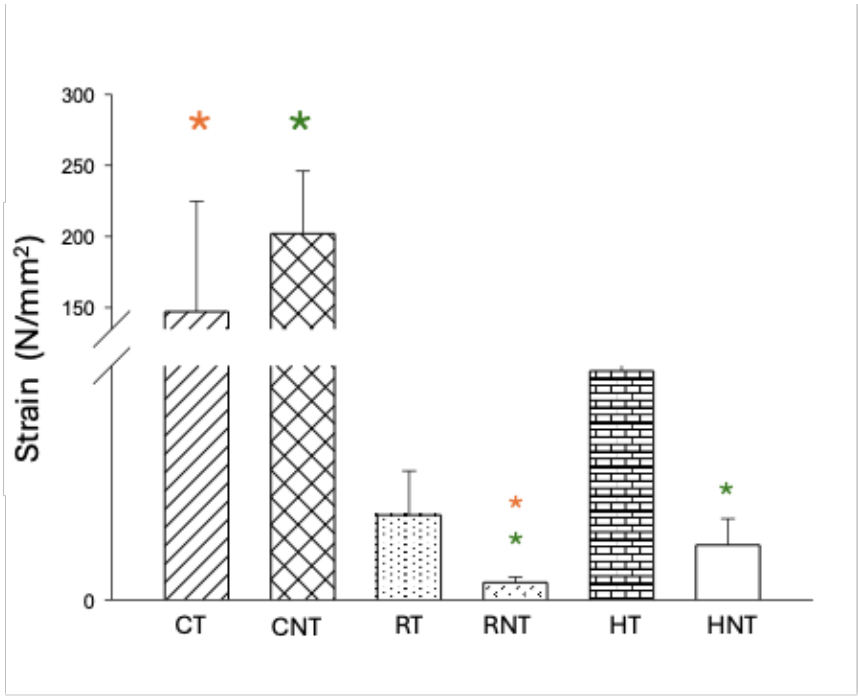
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el análisis estadístico se utilizó el software Sigma Plot, utilizando pruebas paramétricas como ANOVA y no paramétricas como Kruskal-Wallis (KW), posteriormente utilizando pruebas post-hoc para comparar los resultados. Considerando una $p<0.05$ como un dato estadísticamente significativo.

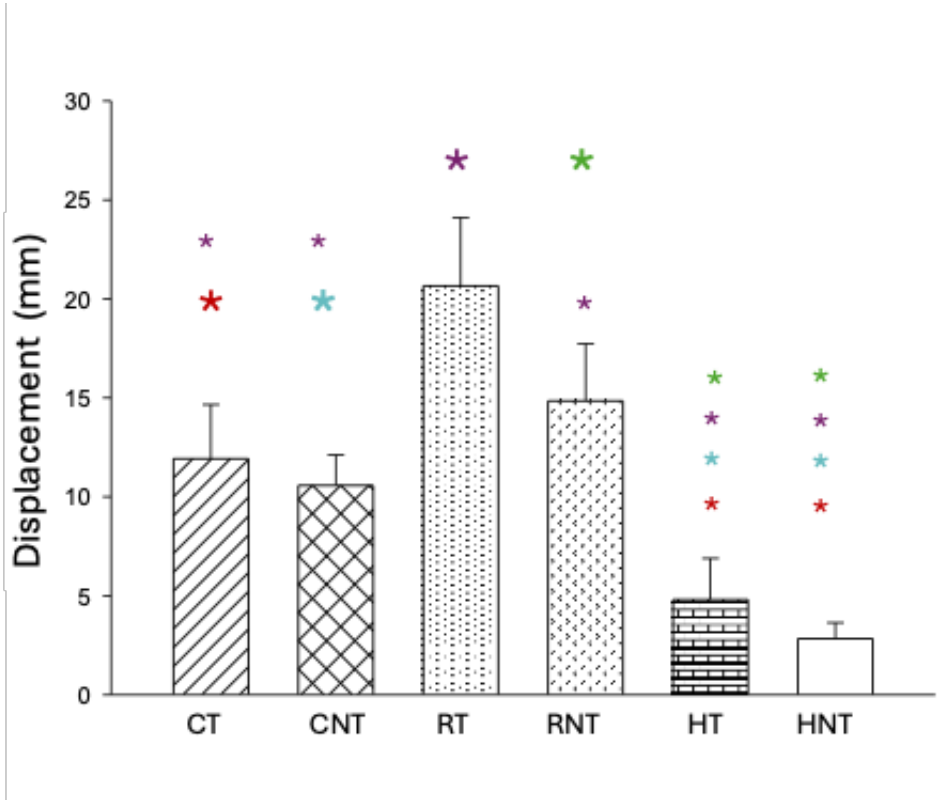
A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la maquina universal, cada barra de la gráfica representa un grupo estudiado: CT; porcino tratado/descelularizado, CNT; porcino no tratado/piel nativa; RT rata tratada/descelularizada; RNT rata no tratada/piel nativa; HT humano tratado/descelularizado; HNT piel humana no tratada/piel nativa.



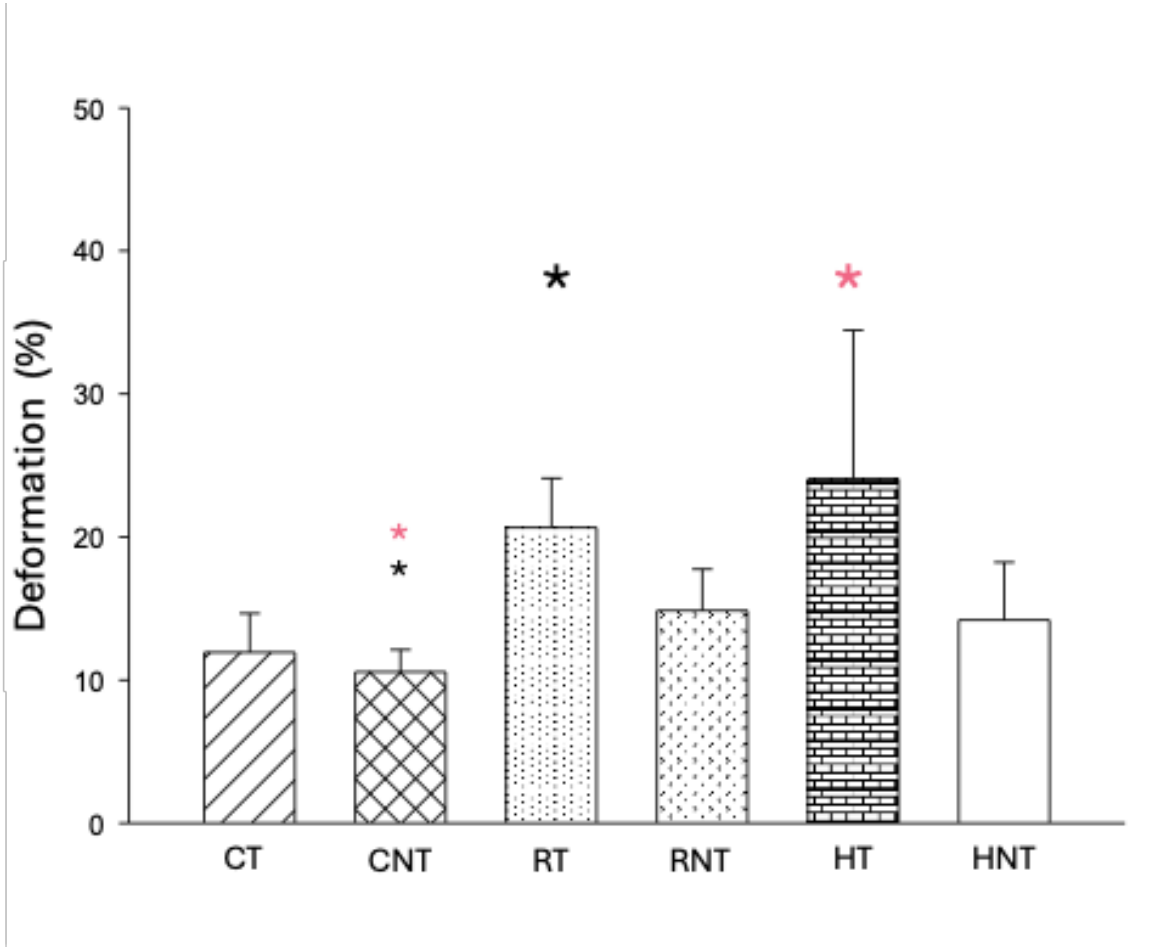
Gráfica 2. Comparación de Pieles, comparando la fuerza utilizada hasta el momento de modificación de la muestra, utilizando Prueba KW y un post hoc Dunn´s, (*) relaciona los elementos que fueron estadísticamente significativos.



Gráfica 3 Comparación de Tensión de muestras de piel, utilizando prueba KW y post hoc Dunn´s, , (*) relaciona los elementos que fueron estadísticamente significativos.



Gráfica 4 Comparación del desplazamiento de las muestras en mm; Se realiza prueba ANOVA y un post hoc Tukey, (*) relaciona los elementos que fueron estadísticamente significativos.



Gráfica 5 Se realiza comparación de muestras en piel en % de deformación, prueba KW con post hoc Dunn´s, (*) relaciona los elementos que fueron estadísticamente significativos.

14. DISCUSIÓN

Hoy en día se puede encontrar una alta demanda de andamios debido a la alta perdida de tejidos o necesidad de sustitución de estos.

La descelularización es un método confiable que puede ser aplicado a tejidos y órganos como lo es la piel, ya sea de humano, porcino o rata, este tipo de procedimiento es adaptable a cualquier tejido ya que se busca obtener una ECM acelular para que después esta pueda ser infiltrada por las células del huésped y así evitar una reacción autoinmune.

La piel de pequeños mamíferos ha sido utilizada previamente como reemplazo de la piel humana. Sin embargo, en las pieles animales estudiadas, se han observado diferencias anatómicas como fisiológicas en comparación con la piel humana. Siendo el modelo más preciso de piel humana, la piel porcina, desde un punto de vista anatómico y fisiológico. (30)

En el presente trabajo de investigación se realizó la descelularización de 3 tipos de piel: humana, porcino y rata, por medio de agentes enzimáticos como la tripsina y surfactantes como el Triton X-100 siguiendo el protocolo de Chun, Lim et al. (15) previamente utilizado en el estudio realizado por Benítez et al. donde fueron descelularizada Matriz de vejiga urinaria porcina de manera exitosa, teniendo como antecedente un protocolo de descelularización seguro y efectivo. (31)

Para obtener un análisis de la estructura de la piel de manera que se pueda observar la estructura de una manera microscópica es de gran utilidad el SEM, sus ventajas para analizar este tipo de muestras radican en su técnica para analizar de una manera donde no se dañan los tejidos a analizar. Las micrografías obtenidas por el SEM coinciden con los estudios de Liu, Huang et al.(32) Donde se puede observar en las micrografías de tejido no tratado los poros, textura y presencia de lo que parecen ser vellos, sin embargo, en los tejidos que fueron tratados para descelularización mediante un procedimiento químico se detecta ausencia de lo que simulan vellos y ausencia de cavidades o porosidad en el tejido, como se puede observar en la (Fig. 12) (32)

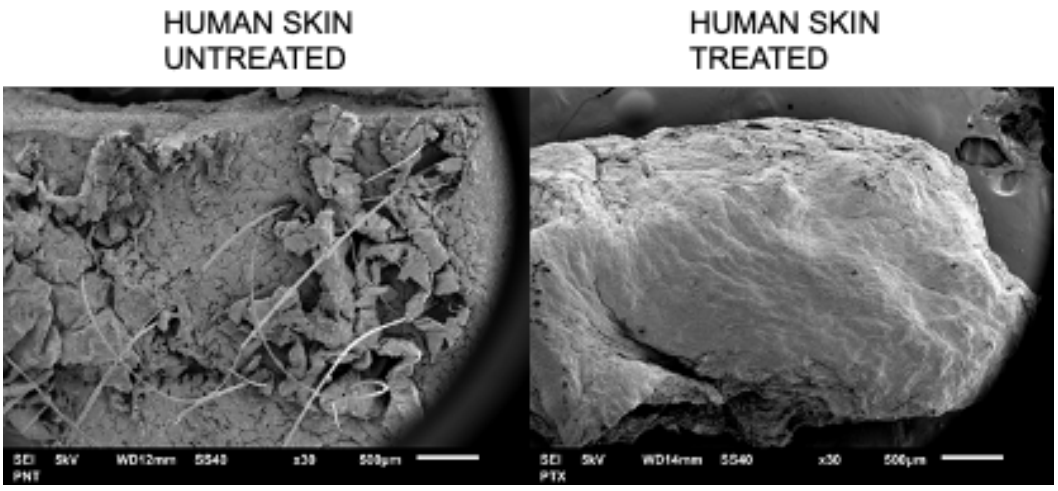


Fig. 12 micrografía de piel humana a X30

Gzik-Zroska et al. realizó un estudio comparativo utilizado distinto surfactantes observándose diferencias mínimas entre cada uno de ellos. Reportándose valores de resistencia en piel humana al utilizarse Triton X-100 de 3.1 MPa en concordancia con lo presentado en nuestras pruebas (2.93 N) (33)Al igual que Gzik-Zroska otros autores han estudiado procesos de descelularización por ejemplo Bual et al. en 2022(34) compararon dos surfactantes para descelularizar piel de pescado tipo chano resultando en la reducción de propiedades mecánicas al incrementar la concentración del surfactante coincidiendo con los resultados del presente estudio en el caso de la piel de porcino donde se observó una resistencia a la tensión mayor para la piel no descelularizada (202 N/mm^2) contra la descelularizada (147 N/mm^2). Por otro lado, la descelularización de piel de rata y humano mostro una mayor resistencia a la tensión. (34) Patel por otro lado utilizó anillos de AlloDerm™ con el objetivo de probar las propiedades mecánicas de este utilizando una metodología distinta a la de este estudio resultando en una resistencia a la tensión similar a la piel humana descelularizada de nuestro estudio, sin embargo menores posiblemente debido a la metodología utilizada ya que los autores utilizaron anillos, ganchos y el uso de lijas para sostener las muestras.(35) Brouki Milan a pesar de presentar una metodología similar a la nuestra presento porcentajes de deformación mayores a los nuestros (no tratado: 14.19%, tratado: 24.07%) esto se puede deber debido a las medidas de la muestra utilizadas en nuestro estudio las cuales fueron 2x1

cm. En contraste con las de Brouki Milan que fueron de 5x5 cm. Además, se presentaron mediciones de fuerza para estas muestras reportando valores menores a los de nuestro estudio, posiblemente por el grosor de las muestras. (36)

Otros estudios han reportado distintos valores para fuerza tal como Holmdahl(37), que con valores menores. Observando una tendencia en la falta de estandarización al realizar este tipo de pruebas a las propiedades mecánicas de las distintas pieles estudiadas. Como en el estudio utilizaron lijas sobre el tejido para evitar el desplazamiento de las muestras, otras incorporando el uso de sutura para aplicar la fuerza; pudiendo ser la posible razón de las variaciones de los estudios presentados.

Por lo reportado en la literatura, y los resultados presentados; los andamios de piel de porcina parecen prometedores para ciertos casos de andamios, ya que se ha demostrado que presentan similitudes en fijación de la piel, vellosidad, epidermis, dermis y mecanismo de curación. (38) Nuestros resultados indican mayores valores de resistencia en sus propiedades físicas al someterlo a estrés, en comparación tanto a piel humana como de rata, en sus presentaciones descelularizadas como las no tratadas. Pissarenko realizó investigaciones sobre piel de porcino reportando mediciones cuantitativas utilizando principalmente el método Trouser para determinar la cantidad de fuerza necesaria para provocar un desgarramiento de la piel, sin encontrar relevancia en la dirección de colocación de la muestra al evaluar. (39) Otros estudios han reportado los cambios a favorables debido al proceso de descelularización a piel de porcino; Primasari indicando un aumento significativo en la fuerza tensional hasta el desgarre en piel descelularizada a diferencia de la piel no tratada, indicando que las fibras colágenas no fueron destruidas por el proceso químico. (40)

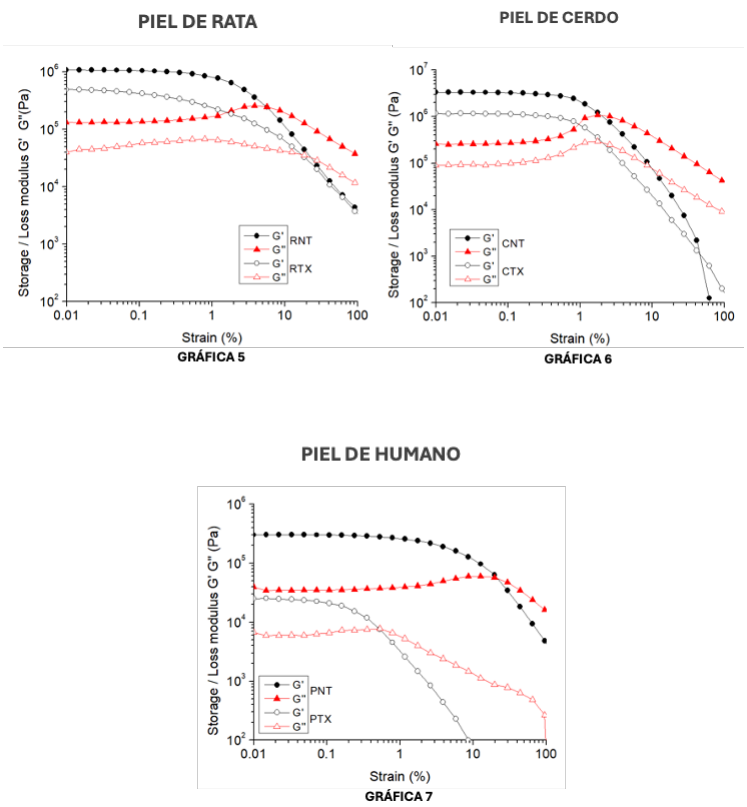
Bellare y Gorodetsky(41) al evaluar la fuerza necesaria para provocar un desgarre en tejido de rata, observaron un promedio de 2.3 N para ocasionar esto, datos distintos a los presentados en nuestro estudio (6.72 N). Posiblemente debido a los distintos genotipos de rata utilizados, y la metodología para medir estos valores en los distintos estudios. (41)

La tendencia observada en la literatura consultada es a la diferencia de resultados entre cada una de las pruebas realizadas al medir las propiedades mecánicas de cada una de

las muestras. Pudiendo ser la razón, que en nuestro caso se utilizó la máquina universal, con medidas estandarizadas para todas las muestras; donde en los diversos artículos, se observaron distintos métodos para evaluar cada una de las características reportadas, principalmente fuerza y tensión. Entre los métodos utilizados, se utilizó sutura atada a los extremos de la muestra, colocando la fuerza aplicada en un solo punto, anillos de tejido, y el método de Trouser. Las distintas variaciones entre las formas de medir estas características pueden ser la razón de los resultados distintos observados en la literatura consultada. Para esto; se utilizan además los estudios reológicos para dar más información para dar más claridad.

La reología estudia cómo se deforman los materiales en todas sus dimensiones; incluyendo el comportamiento de los fluidos y sólidos.

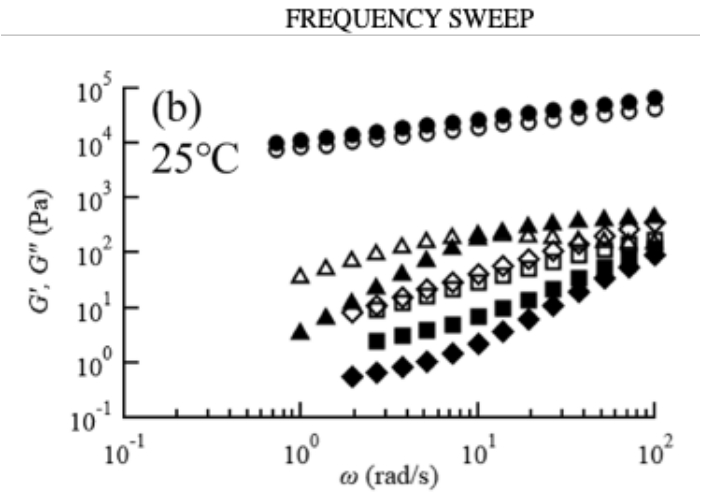
Esto se realiza por medio de ensayos dinámicos oscilatorios basados en el modelo de Maxwell, el cual utiliza dos componentes; un módulo de almacenamiento G', es decir la cantidad de energía que debe de aplicarse para deformar un material y un módulo de perdida G'', o sea la energía que se pierde a medida que el material recupera su forma original después de la deformación.(29,42) Entre los materiales estudiados la piel de distintas especies. Las propiedades de la piel están directamente relacionadas con su composición y estructura. La piel es un material que consiste principalmente en redes de fibras (su parte solida) y de macromoléculas de proteoglicanos (PG), contenidos en la sustancia fundamental, esta abarca el 70-90% del volumen total de la piel. Los proteoglicanos mantienen al tejido hidratado, por otra parte, el colágeno representa el 60-80% del peso en seco de la piel y el 4% es representado por fibras elásticas. Debido a esta composición y a sus propiedades se dice que la piel es un material anisotrópico, no lineal y viscoelástico y que experimenta distintos cambios dependiendo de la fuerza ejercida. (43)



Gráfica 6-7 Barrido de amplitud para piel de rata, porcino y humano.

Se realizó un barrido de amplitud para determinar la cantidad de fuerza necesaria para provocar una deformación del 0.1%. Los resultados de esta prueba indican que todas las muestras analizadas tienen un comportamiento más elástico que viscoso tal como se observa en las Gráfica 6-7 en la posición de G' se encuentra en una posición por encima de G''. (42) Una vez realizada esta prueba se continuó con un barrido de frecuencia para encontrar la relación entre G' y G'' y confirmar la elasticidad del tejido estudiado, donde se utiliza una fuerza usualmente cercana a 10 Pa para determinar esta relación. Cuando en esta medida se observa una recta en la pendiente el comportamiento es totalmente elástico, siendo el caso para las muestras analizadas. (Gráfica 1) De acuerdo con la literatura el módulo elástico (G') se observa normalmente independiente de la frecuencia, como lo es en caso de un material sólido, por otro lado, entre más dependiente sea de la frecuencia, más fluido será el material. (44)

En contraste a nuestro estudio Yoshiyuki Miyasaka en 2024 realizo la comparación entre una sustancia control con base de vaselina contra sustancias con base aceitosa por medio de barridos de frecuencia confirmando su naturaleza viscosa.(45)



Gráfica 7 de Barrido de Frecuencia de estudio de investigación de Miyasaka 2024

Los estudios reológicos no se limitan únicamente a materiales líquidos o viscosos, si no se han utilizado en investigaciones enfocadas a andamios de piel. Fernández Carro et al. descelularizaron piel de humano y extrajeron la dECM para posteriormente realizar un barrido de amplitud resultando en una naturaleza más elástica por la posición de G' más superior a G'' al igual que en nuestro estudio.(46) Contrastando los resultados de nuestro estudio Lokshin et al. aplicaron un modelo nuevo de estudio en piel de rata mostrando una naturaleza más viscoelástica, posiblemente debido al preacondicionamiento de las muestras con colágeno y elastina o a la novedad del modelo de estudio presentado como una limitación por los autores. (47) Mitra reporto las características viscoelásticas de 3 distintas zonas de piel de porcino comparadas con piel abdominal humana, al igual que nuestro estudio presenta valores más altos para G' en contraste con G'' confirmando la naturaleza elástica de la piel de porcino, con las mismas conclusiones para la piel humana. (48)

15. CONCLUSIÓN

Al comparar las propiedades de fuerza, tensión, desplazamiento y deformación, se observó un incremento de estos valores en la piel humana y rata con decremento en las características de tensión y fuerza de piel porcina sin diferencias estadísticamente significativas, por lo que se acepta la Hi.

El proceso de descelularización altera las propiedades principales de las muestras sometidas a este método, sin embargo, debido a las características inherentes entre la dermis y la epidermis de las especies evaluadas sometidas a descelularización, se obtuvieron unos valores disminuidos en las pruebas de tracción debido a la firme adherencia de las fibras colágenas, se sugiere un cambio en el proceso de descelularización para el tejido de esta especie; sea en tiempo o en concentración.

Las pruebas reológicas confirman la predominancia de la naturaleza elástica sobre la viscosa de los tejidos evaluados, siendo un aspecto necesario a considerar para biomateriales a ser utilizados como potenciales andamios para la regeneración en el área estomatológica.

.

16. PERSPECTIVAS

I. Realizar comparaciones entre diferentes protocolos de descelularización y analizar las propiedades mecánicas y reológicas.
II. Comparar piel de porcino y humano con productos disponibles comercialmente como AlloDerm ™
III. Estudiar el comportamiento del tejido descelularizado una vez ya implantado.

13 BIBLIOGRAFíA

1. Farag MM. Recent trends on biomaterials for tissue regeneration applications: review. Vol. 58, Journal of Materials Science. Springer; 2023. p. 527–58.
2. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. FEBS Journal. 2021 Dec 1;288(24):6850–912.
3. Cruz Walma DA, Yamada KM. The extracellular matrix in development. Vol. 147, Development (Cambridge). Company of Biologists Ltd; 2020.
4. Dzobo K, Dandara C. The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis. Vol. 8, Biomimetics. MDPI; 2023.
5. Macagonova O, Risnic D, Cociug A, Nacu V. Comparative analysis of the skin decellularization methods. The Moldovan Medical Journal [Internet]. 2021 May;64(2):79–86. Available from: http://moldmedjournal.md/wp-content/uploads/2021/05/moldovan-med-j-2021-64-2-macagonova-et-al-full-text.pdf
6. Jiang S, Zhuang Y, Cai M, Wang X, Lin K. Decellularized extracellular matrix: A promising strategy for skin repair and regeneration. Vol. 4, Engineered Regeneration. KeAi Communications Co.; 2023. p. 357–74.
7. Shang Y, Wang G, Zhen Y, Liu N, Nie F, Zhao Z, et al. Application of decellularization-recellularization technique in plastic and reconstructive surgery. Vol. 136, Chinese Medical Journal. Lippincott Williams and Wilkins; 2023. p. 2017–27.
8. Allu I, Sahi AK, Koppadi M, Gundu S, Sionkowska A. Decellularization Techniques for Tissue Engineering: Towards Replicating Native Extracellular Matrix Architecture in Liver Regeneration. Vol. 14, Journal of Functional Biomaterials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
9. Moffat D, Ye K, Jin S. Decellularization for the retention of tissue niches. Vol. 13, Journal of Tissue Engineering. SAGE Publications Ltd; 2022.
10. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Vol. 32, Biomaterials. 2011. p. 3233–43.
11. Yang JZ, Qiu LH, Xiong SH, Dang JL, Rong XK, Hou MM, et al. Decellularized adipose matrix provides an inductive microenvironment for stem cells in tissue regeneration. Vol. 12, World Journal of Stem Cells. Baishideng Publishing Group Co; 2020. p. 585–603.
12. Neishabouri A, Soltani Khaboushan A, Daghigh F, Kajbafzadeh AM, Majidi Zolbin M. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine:

Evaluation, Modification, and Application Methods. Vol. 10, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A.; 2022.

13. Barbulescu GI, Bojin FM, Ordodi VL, Goje ID, Barbulescu AS, Paunescu V. Decellularized Extracellular Matrix Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering: Current Techniques and Challenges. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
14. Rabbani M, Zakian N, Alimoradi N. Contribution of physical methods in decellularization of animal tissues. J Med Signals Sens. 2021;11(1):1.
15. Chun SY, Lim GJ, Kwon TG, Kwak EK, Kim BW, Atala A, et al. Identification and characterization of bioactive factors in bladder submucosa matrix. Biomaterials. 2007 Oct;28(29):4251–6.
16. Wang B, Qinglai T, Yang Q, Li M, Zeng S, Yang X, et al. Functional acellular matrix for tissue repair. Vol. 18, Materials Today Bio. Elsevier B.V.; 2023.
17. Jorgensen AM, Chou Z, Gillispie G, Lee SJ, Yoo JJ, Soker S, et al. Decellularized skin extracellular matrix (dsECM) improves the physical and biological properties of fibrinogen hydrogel for skin bioprinting applications. Nanomaterials. 2020 Aug 1;10(8):1–10.
18. Xiao H, Chen X, Liu X, Wen G, Yu Y. Recent advances in decellularized biomaterials for wound healing. Vol. 19, Materials Today Bio. Elsevier B.V.; 2023.
19. Xiao H, Chen X, Liu X, Wen G, Yu Y. Recent advances in decellularized biomaterials for wound healing. Vol. 19, Materials Today Bio. Elsevier B.V.; 2023.
20. Mohammadyari F, Parvin S, Khorvash M, Amini A, Behzadi A, HajEbrahimi R, et al. Acellular dermal matrix in reconstructive surgery: Applications, benefits, and cost. Frontiers in Transplantation. 2023 Mar 10;2.
21. Dadlani S. Porcine Acellular Dermal Matrix: An Alternative to Connective Tissue Graft - A Narrative Review. Vol. 2021, International Journal of Dentistry. Hindawi Limited; 2021.
22. Srivastava R, Mohan R, Saravana Balaji M, Vijay V, Srinivasan S, Navarasu M. A randomized controlled trial on a minimally invasive microsurgical versus conventional procedure for the management of localized gingival recession in esthetic zone using alloderm. J Pharm Bioallied Sci. 2021 Jun 1;13(5):S476–83.
23. Püllen R, Konrad J, Merkel R, Hoffmann B. Skin under strain: From epithelial model tissues to adult epithelia. Cells. 2021 Jul 1;10(7).
24. Karki D. Physical Properties of Skin.
25. Sarmin AM, Connelly JT. Fabrication of Human Skin Equivalents Using Decellularized Extracellular Matrix. Curr Protoc. 2022 Mar 1;2(3).

26. Uhm C, Jeong H, Lee SH, Hwang JS, Lim KM, Nam KT. Comparison of structural characteristics and molecular markers of rabbit skin, pig skin, and reconstructed human epidermis for an ex vivo human skin model. Toxicol Res. 2023 Jul 1;39(3):477–84.

27. Wei JCJ, Edwards GA, Martin DJ, Huang H, Crichton ML, Kendall MAF. Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: From mice, rats, rabbits, pigs to humans. Sci Rep. 2017 Dec 1;7(1).

28. Ali A, Zhang N, Santos RM. Mineral Characterization Using Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review of the Fundamentals, Advancements, and Research Directions. Vol. 13, Applied Sciences (Switzerland). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.

29. Ramli H, Zainal NFA, Hess M, Chan CH. Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. Chemistry Teacher International. 2022 Dec 1;4(4):307–26.

30. Ranamukhaarachchi SA, Lehnert S, Ranamukhaarachchi SL, Sprenger L, Schneider T, Mansoor I, et al. A micromechanical comparison of human and porcine skin before and after preservation by freezing for medical device development. Sci Rep. 2016 Aug 25;6.

31. Silva-Benítez E, Soto-Sáinz E, Pozos-Guillen A, Romero-Quintana JG, Aguilar-Medina M, Ayala-Ham A, et al. Quantification of DNA in urinary porcine bladder matrix using the ACTB gene. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2015 Jun 20;51(10):1040–6.

32. Liu YW, Huang CC, Wang YY, Xu J, Wang GD, Bai XP. Biological evaluations of decellularized extracellular matrix collagen microparticles prepared based on plant enzymes and aqueous two-phase method. Regen Biomater. 2021 Mar 1;8(2).

33. Gzik-Zroska B, Joszko K, Wolański W, Suchoń S, Burkacki M, Ples M, et al. Assessment of the impact of decellularization methods on mechanical properties of biocomposites used as skin substitute. Materials. 2021 Sep 1;14(17).

34. Bual R, Labares M, Valle KDD, Pague J, Bantilan ZC, Ducao PG, et al. Characterization of Decellularized Extracellular Matrix from Milkfish (Chanos chanos) Skin. Biomimetics. 2022 Dec 1;7(4).

35. Patel B, Wonski BT, Saliganan DM, Rteil A, Kabbani LS, Lam MT. Decellularized dermis extracellular matrix alloderm mechanically strengthens biological engineered tunica adventitia-based blood vessels. Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1).

36. Brouki Milan P, Pazouki A, Joghataei MT, Mozafari M, Amini N, Kargozar S, et al. Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery. Methods. 2020 Jan 15;171:62–7.

37. Holmdahl V, Backman O, Gunnarsson U, Strigård K. The Tensile Strength of Full-Thickness Skin: A Laboratory Study Prior to Its Use as Reinforcement in Parastomal Hernia Repair. Front Surg. 2019 Dec 4;6.

38. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. Vol. 66, Molecular Immunology. Elsevier Ltd; 2015. p. 14–21.

39. Pissarenko A, Yang W, Quan H, Poyer B, Williams A, Brown KA, et al. The toughness of porcine skin: Quantitative measurements and microstructural characterization. J Mech Behav Biomed Mater. 2020 Sep 1;109.

40. Primasari M, Saputro ID, Hariani L, Velusamy GPB. Developing Porcine Acellular Dermal Matrix by Using Sodium Dodecyl Sulfate and Biomechanical Property Testing. Biomolecular and Health Science Journal. 2024 Jan;7(1):23–8.

41. Bellare A, Epperly MW, Greenberger JS, Fisher R, Glowacki J. Development of tensile strength methodology for murine skin wound healing. MethodsX. 2018 Jan 1;5:337–44.

42. Marquez R, Forgiarini A, Salager JL. FUNDAMENTOS DE REOLOGIA INTERFACIAL. Venezuela; 2019.

43. Lokshin O, Lanir Y. Viscoelasticity and preconditioning of rat skin under uniaxial stretch: Microstructural constitutive characterization. J Biomech Eng. 2009 Mar;131(3).

44. Understanding Rheology of Structured Fluids.

45. Yoshiyuki M, Kaname H, Kohsuke S, Makiko F, Hiroyuki T. Rheological Properties and Composition Affecting the Skin. Biol Pharm Bull. 2024;47:245–52.

46. Fernández Carro E, Garcia A, Rosa Remacha Gayán A, del Barrio J, Alcaine C, Ciriza Astrain J, et al. Decellularized human dermal extracellular matrix-derived scaffolds: compositional, mechanical, and in vitro biological characterizations.

47. Lokshin O, Lanir Y. Viscoelasticity and preconditioning of rat skin under uniaxial stretch: Microstructural constitutive characterization. J Biomech Eng. 2009 Mar;131(3).

48. Mitra H, Nonamaker E, Cordera RD, Solorio L, Ardekani AM, Jischke M. Rheological and Lipid Characterization of Minipig and Human Skin Tissue: A Comparative Study Across Different Locations and Depths. Available from: https://doi.org/10.1101/2024.02.25.581953