



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LA RESPUESTA  
LOCAL AL IMPLANTE DE UNA MATRIZ ACELULAR EN  
MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJO**

**ROMY WEINBORN ASTUDILLO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Clínicas

**PROFESOR GUÍA: DR. GINO CATTANEO UNIVASO.**

**SANTIAGO, CHILE**  
2004

## ÍNDICE

• Resumen	
• Summary	
• Introducción	1
• Revisión Bibliográfica	
La piel y sus funciones	2
La epidermis	2
La dermis	4
La matriz extracelular	6
La Hipodermis	8
Reparación de la piel	9
Etapa de injuria	11
Etapa de inducción	11
Etapa de inflamación	12
Etapa de proliferación	13
Etapa de maduración	15
Injertos o implantes de piel	15
Injertos según procedencia	16
Injertos según permanencia	17
Injertos según funcionalidad	17
Alloderm®	18
• Objetivo General y Específicos	21
• Materiales y Métodos	22
• Resultados y Discusión	25
Primera Semana	25
Segunda Semana	29

Tercera Semana	32
Cuarta Semana	35
Infiltración Celular	38
Colágeno	38
Glicosaminoglicanos	39
Proliferación Celular	39
• Conclusiones	41
• Anexos	42
• Bibliografía	51

## **RESUMEN**

Se realizó una caracterización histológica de la respuesta local al implante de una matriz acelular en conejo. Esta matriz es utilizada como sustituto dérmico en pacientes que han sufrido importantes pérdidas de piel, razón por la cual no es factible la recuperación de la zona sin la aplicación de implantes.

Esta matriz, se denomina Alloderm<sup>®</sup>, es elaborada por el Laboratorio LifeCell, mediante un procedimiento durante el cual son removidos los componentes epidérmicos y celulares, manteniendo solo la membrana basal y la estructura dermal, facilitando así la repoblación celular, la adherencia al sustrato y la neovascularización.

El ensayo fue realizado en diez conejos implantados en la cara interna de la oreja izquierda, de los cuales fueron seleccionados al azar tres conejos; las muestras fueron obtenidas semanalmente a lo largo de un mes a partir del 7° día post implantación. Las muestras fueron cortadas en forma semiseriada, montadas en portaobjetos y teñidas por los métodos de Hematoxilina-Eosina, Van Gieson, Método del ácido Peryódico Schiff y con el Antígeno de Proliferación Celular. Se investigó la presencia y el tipo de elementos celulares como respuesta al implante de la matriz, describiendo la actividad de proliferación celular, las características fibrilares de la matriz extracelular y la evaluación en el tiempo del lecho vascular.

Los resultados obtenidos fueron comparados con las características descritas por sus fabricantes, observándose concordancia con algunas de ellas, como por ejemplo, que el colágeno presente en la matriz acelular permitió la repoblación celular por parte del hospedero, en cambio, el tipo de reacción inflamatoria descrita por los fabricantes, no coincidió con los resultados obtenidos en el ensayo, donde se observó una reacción inflamatoria crónica granulomatosa, la cual no ha sido descrita para este tipo de matriz acelular.

## SUMMARY

An histological characterization of the local response to an acellular matrix implant in rabbits was made. The acellular implant is used as a dermic substitute in patients that have suffered loss of mayor areas of skin, areas that will not recover without implants.

Alloderm<sup>®</sup> was developed by Lifecell Laboratories by removing all epidermal and cellular components, keeping only basal membrane and dermal structures aiding in cellular growth, substrate adherence and neovascularization.

The study was conducted implanting the matrix in the medial aspect of the left ear in ten rabbits and three of them were selected at random. Samples from the selected animals were obtained weekly for a month starting 7 days post implantation. Samples were cut semi-serially placed in slides and stained with Hematoxillin-eosin, Van Gieson, Shiff Periodic Acid Method and inmunostained for Cellular Proliferation Antigen.

The presence of cells and their types in matrix implant were investigated describing cellular proliferation activity, extracellular matrix fiber characteristics and evaluation in time of the vascular bed.

The results were compared to the features described by the manufacturer, finding concordance in some of them, for instance, collagen present in the acellular matrix allowed host cellular repopulation. On the other hand, other features found in this study were not described by the manufacturer, such as chronic granulomatous inflammatory response.

## INTRODUCCIÓN

En los seres humanos las lesiones traumáticas son una problemática relevante que pueden implicar casos de grandes pérdidas cutáneas, que son resueltos mediante sustitutos dérmicos. Los implantes de piel cada día son más utilizados, ya que su uso significa resultados rápidos y satisfactorios. La respuesta al injerto ha sido descrita por los fabricantes como exenta de reacciones que compliquen la reestructuración, esto es: estéticamente parecida a la piel, que no evidencia la contracción natural de las heridas, que evita la formación de escaras y la pérdida de líquidos y electrolitos (Wainwright, 1995; Demon Internet UK., 1996; Demling *et al*, 2000b). En la aplicación de estos implantes en cirugía plástica se han observado resultados que despiertan dudas sobre la inocuidad de sus propiedades, lo que ha motivado el diseño de esta experiencia destinada a mostrar, experimentalmente, las características morfológicas de la secuencia de eventos que siguen a la aplicación de un implante comercial en un modelo animal experimental. Esta investigación podría establecer bases experimentales que permitirían desarrollar la técnica de injerto en las diferentes especies animales de interés médico veterinario, que sufren problemas similares a los humanos.

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### **La Piel y sus Funciones.**

La piel es una membrana biestratificada, resistente y flexible, que cubre el cuerpo y se continúa a nivel de los orificios naturales con las mucosas. Se compone de dos partes superpuestas, epidermis y dermis, separadas entre sí por una membrana basal, y de los tejidos más profundos, por el tejido subcutáneo (Scott *et al.*, 1995)

Una de sus principales funciones, es actuar como primera barrera defensiva ante cualquier injuria, y si su continuidad es interrumpida, el sistema inmunológico será el encargado de montar una respuesta adecuada para mantener el estado de salud. Tanto la dermis, como la epidermis poseen funciones específicas. La epidermis evita la desecación, evita la entrada de bacterias, protege de las toxinas, ayuda al balance de fluidos, ya que permite la evaporación, es un neurosensor y finalmente permite interactuar socialmente, mediante el tacto. La dermis protege de los traumas por su elasticidad, regula el balance de fluidos y la termorregulación a través de la circulación periférica, produce factores de crecimiento y orienta la replicación epidermal y reparación dermal (Demling *et al.*, 2000a).

### **La Epidermis.**

La epidermis corresponde a tejido epitelial plano pluriestratificado cornificado. En su capa más fina y externa esta compuesta por células epiteliales muertas, las cuales se han transformado en queratina blanda, por lo que reciben el nombre de queratinocitos. La queratina es una efectiva barrera contra las infecciones y la pérdida excesiva de vapor de agua. En la epidermis se pueden distinguir 5 capas; estrato basal o germinativo, estrato espinoso, estrato

granuloso, estrato lúcido y estrato córneo. (Scott *et al.*, 1995; Monteiro-Riviere, 1998).

El estrato basal corresponde a células cúbicas que se encuentran descansando sobre la membrana basal, unidas a ella por medio de hemidesmosomas. Las células de este estrato son inmaduras, ya que continúan dividiéndose y migrando hacia la superficie para así reemplazar a las células que se pierden o son dañadas, este reemplazo epidermal se lleva a cabo en alrededor de 2-5 semanas. Además en esta capa celular es posible la identificación de melanocitos y células de Merkel. Los melanocitos son el segundo tipo celular en este estrato, en su ultraestructura es posible distinguir melanosomas y premelanosomas, los cuales contienen melanina y en los animales de piel oscura incluso puede llegar a encontrarse a través de toda la epidermis. Las células de Merkel son células epidermales confinadas al estrato basal, o justo debajo de este, y cumplen la función de mecanorreceptores de adaptación lenta (Scott *et al.*, 1995; Stevens y Lowe, 1998).

El estrato espinoso esta compuesto por varias capas de células hijas del estrato basal. Son células poligonales e irregulares, unidas entre ellas por desmosomas. Estos tipos de uniones celulares hacen que en cortes histológicos aparezcan unidas por puentes, dando el aspecto de espinado. En este estrato es posible distinguir células de Langerhans, de forma dendrítica, las cuales tienen receptores para el complemento, sintetizan y expresan antígenos asociados con la respuesta inmune (Scott *et al.*, 1995; Monteiro-Riviere, 1998).

El estrato granuloso se encuentra formado por 3 o más capas celulares, que corresponden a queratinocitos, los cuales se caracterizan por la acumulación de densos gránulos de queratohialina, los cuales contienen lípidos. Los queratinocitos se encuentran en proceso de apoptosis, por lo tanto se van haciendo aplanados, con núcleos poco precisos, sin nucleolos y además con

cambios degenerativos. La cornificación paulatina comienza en este estrato (Scott *et al.*, 1995; Monteiro-Riviere, 1998; Stevens y Lowe, 1998).

El estrato lúcido está compuesto por células carentes de núcleo celular, en las cuales se puede observar una intensa actividad enzimática. En este estrato prosigue la queratinización, la cual engloba también la transformación de los gránulos de queratohialina de la capa granulosa en eleidina. La eleidina, una sustancia acidófila rica en grasas y proteínas y que posee unas fuertes propiedades refractantes, se presenta como una capa homogénea y brillante. Este estrato protege a la piel ante las acciones de las soluciones acuosas (Scott *et al.*, 1995).

El estrato córneo está formado por células queratinizadas y desprovistas de núcleo. Se encuentran situadas unas sobre otras en forma de tejas y están firmemente unidas entre sí por medio de la queratohialina así como también por fibras muy delgadas (tonofibrillas). Las células más profundas de este estrato aún mantienen sus uniones desmosomales, pero a medida que son empujadas hacia la superficie, por las nuevas células que se están formando a nivel del estrato basal, van perdiendo estas uniones y gradualmente se rompen y se pierden, permitiendo el proceso de descamación. El estrato córneo abarca aproximadamente de 15 a 20 estratos celulares, de los cuales el estrato superficial se va perdiendo por descamación (Monteiro-Riviere, 1998).

### **La Dermis.**

A la cara interna de la membrana basal de la epidermis se le une la dermis. Ésta es un tejido conectivo con fibras colágenas tipo I, elásticas y reticulares, que se encuentra en constante recambio; es vascularizada y con abundantes terminaciones nerviosas, que histológicamente se subdivide en dos capas diferentes: en la capa papilar exterior y en la capa reticular interior. Ambas capas se diferencian entre sí por su grosor y la disposición de sus fibras de tejido

conjuntivo, sin embargo a pesar de esta diferenciación no se encuentran separadas una de otra. Además la dermis contiene la mayoría de los fibroblastos, responsables de la producción de colágeno, elastina y sustancia base que da soporte, elasticidad y la dirección necesaria para la replicación dermal. También es posible observar otras células tales como melanocitos y mastocitos cercanos a la superficie de vasos sanguíneos, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, histiocitos y células plasmáticas; además en esta zona de la piel se encuentran estructuras anexas, tales como glándulas y folículos pilosos (Monteiro-Riviere, 1998).

La dermis se encuentra dividida en una capa superficial o zona papilar y en una capa más profunda o zona reticular. La zona papilar esta formada por tejido conectivo laxo, estrechamente unido a la epidermis por medio de pequeñas prominencias cónicas de tejido conjuntivo, que reciben el nombre de papilas del corion. En la zona de las papilas se encuentran las terminaciones nerviosas independientes, receptores sensoriales, vasos linfáticos, así como también las asas capilares que aseguran el abastecimiento nutritivo de la epidermis avascular y además cumplen con la función de termorregulación. El propio tejido conectivo se compone de una estructura de fibrocitos (estado de reposo de los fibroblastos) y es atravesado por aglomerados de fibras colágenas elásticas. Los espacios intercelulares situados entre las tramas de las fibras están rellenos con una sustancia amorfa que recibe el nombre de sustancia fundamental, en la cual se pueden desplazar las células sanguíneas y las células del tejido que se encuentran en movimiento (Scott *et al.*, 1995; Monteiro-Riviere, 1998).

La zona reticular está compuesta por tejido conectivo denso con resistentes fascículos de fibras colágenas entrelazados entre sí, distribuidas en todas las direcciones, entre las cuales se encuentran aglomerados de fibras elásticas, reticulares y colágenas. Esta estructura es la que le otorga elasticidad a la piel, para que de esa manera pueda adaptarse a los diferentes movimientos y

fluctuaciones de volumen del organismo. Además se encuentra capacitada, dentro de un proceso dinámico, para absorber agua y volver a expelerla (Scott *et al.*, 1995; Monteiro-Riviere, 1998).

### **La Matriz Extracelular.**

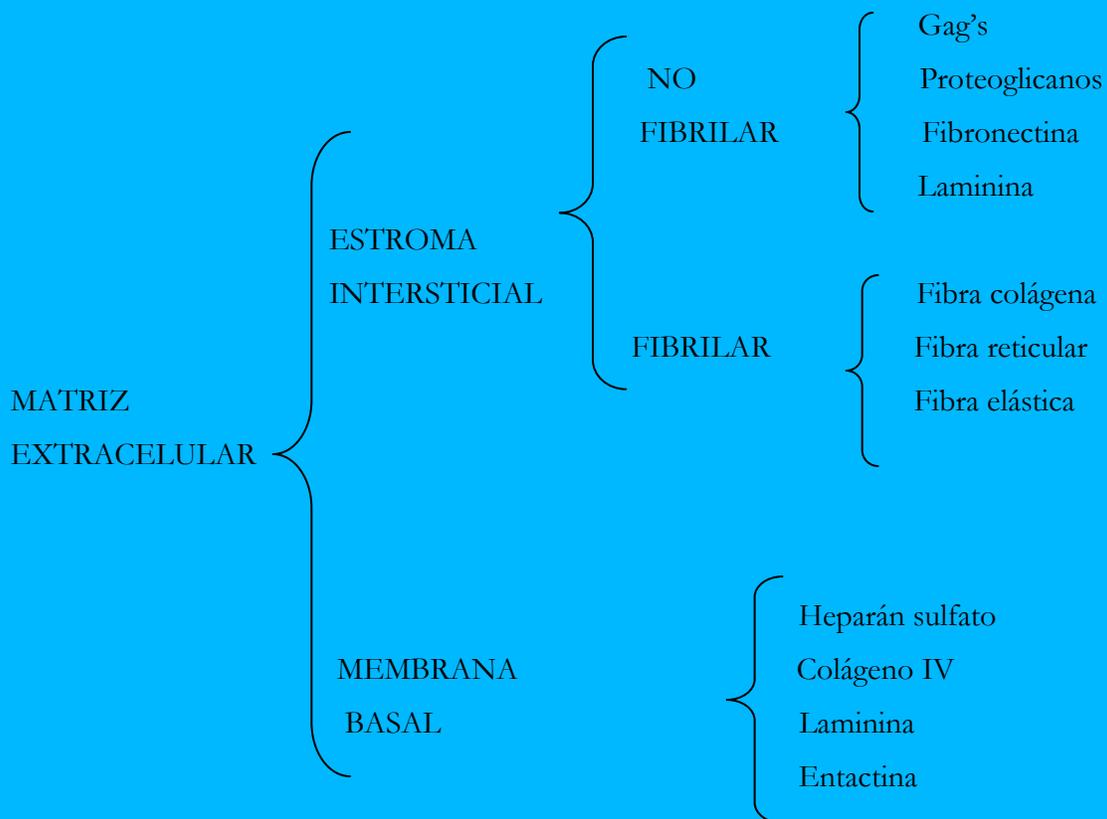
La matriz extracelular, producida por los fibroblastos, esta compuesta por la membrana basal y el estroma intersticial, que a su vez esta compuesto por un componente fibrilar y otro amorfo. La matriz extracelular químicamente esta formada por glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos, glicoproteínas no colagenosas (fibronectina y laminina), fibras colágenas, fibras reticulares, fibras elásticas y membrana basal. La matriz extracelular ocupa el espacio entre las células epiteliales, musculares, nerviosas y del tejido conectivo conectándolas entre sí, dando la orientación y la nutrición necesarias, funcionando como un andamio para las células en migración (Scott *et al.*, 1995; Eurell y Van Sickle, 1998).

En el estroma intersticial en su parte fibrilar se distinguen tres tipos de fibras: fibras colágenas (colágeno tipo I), elásticas (elastina) y reticulares (colágeno tipo III). Las fibras colágenas se encuentran constituidas por la proteína colágeno, su diámetro varía entre 1-20  $\mu\text{m}$ , se organiza en haces laxos o densos. Las moléculas de colágeno se encuentran formadas por tres cadenas polipeptídicas, cadenas  $\alpha$ , entrelazadas para formar una triple hélice, los principales aminoácidos que la conforman son glicina, prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina. Estos dos últimos aminoácidos son sintetizados a partir de la hidroxilación de la lisina y la prolina posterior a su síntesis en el retículo endoplásmico rugoso. Las fibras reticulares se encuentran constituidas por fibras colágenas tipo III delgadas, 0.5-2  $\mu\text{m}$  de diámetro, asociadas a otros tipos de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. Estas fibras tienen la capacidad de

formar una armazón fina para sostener tanto a las fibras musculares, nerviosas, adipocitos y pequeños vasos sanguíneos. Las fibras elásticas se encuentran constituidas por la proteína elastina, glicina, prolina, valina, alanina y en menor cantidad hidroxiprolina e hidroxilisina. Se presentan como filamentos cilíndricos o aplanados, largos y delgados, que se ramifican formando redes. Su diámetro varía entre 10-12  $\mu\text{m}$ . estas fibras son capaces de estirarse y volver a su largo normal cuando cesa la fuerza, en reposo se observan onduladas (Scott *et al.*, 1995; Cotran *et al.*, 2000).

El estroma intersticial en su parte amorfa corresponde a glicosaminoglicanos y a proteínas no colagenosas. Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos lineales, formados por disacáridos que se repiten continuamente, estas cadenas lineales se unen covalentemente a la proteína central llamada proteoglican. Los GAGs que se unen a esta proteína central son principalmente dermatán sulfato, condroitín sulfato, queratán sulfato y heparán sulfato; proteoglicanos formados en el retículo endoplásmico rugoso, que constituyen el componente proteico. La glicosilación se produce en el retículo, pero termina en el aparato de Golgi, en donde son sulfatados. La degradación de los proteoglicanos ocurre gracias a las enzimas lisosomales y la velocidad con que son remplazados varía entre 2-10 días. La función de los GAGs corresponde a lubricación y permite la unión entre las fibras de colágeno. Las proteínas no colagenosas (Fibronectina y Laminina) se encuentran constituidas por un gran componente proteico unido a carbohidratos, tienen importancia en la interacción celular y en la adhesión de las células a su sustrato. La Fibronectina es una glicoproteína sintetizada por los fibroblastos y por algunas células epiteliales, posee sitios de unión para células, colágeno y glicosaminoglicanos, lo que permite la adhesión y migración de las células. La laminina se encuentra en la membrana basal, permitiendo la adhesión de las células epiteliales a esta

membrana. La matriz extracelular en su parte correspondiente a la membrana basal, se encuentra constituida por láminas de colágeno tipo IV, laminina, entactina y proteoglicanos ricos en heparán sulfato. Es una barrera selectiva, ya que determina la polaridad celular, influencia el metabolismo celular, induce diferenciación celular y sirve como guía en la migración celular. La membrana basal es sintetizada por las células que se encuentran relacionadas con ella, dando una fuerte conexión entre epitelios y los tejidos subyacentes a ellos (Scott *et al.*, 1995 Cotran *et al.*, 2000).



### La Hipodermis.

La hipodermis representa el estrato más profundo de la capa corporal exterior. Está compuesta por tejido conjuntivo laxo. En las profundidades se une a los músculos o bien al periostio. En la totalidad de la hipodermis se puede

almacenar tejido adiposo, el cual cumple funciones aislantes, de almacenamiento y modeladoras (Scott *et al.*, 1995).

### **Reparación de la Piel.**

Si la piel es injuriada, total o parcialmente, permitirá la entrada de distintos agentes infecciosos, comprometiendo el estado de salud del paciente. Esto ocurre en las quemaduras y las úlceras crónicas asociadas a diabetes o por decúbito prolongado. Para dichos pacientes es necesario contar con injertos de piel, los cuales permiten reducir el sitio de donación, incrementar el potencial de recuperación de las heridas y reducir el costo de tratamiento por lesiones recurrentes (Demon Internet UK., 1996; Heimbach *et al.*, 1998).

Cuando se ha producido una injuria extensa y profunda de la piel, las opciones que se manejan, son la aplicación de reemplazos epidermales, dermales o sustitutos de piel; ya que los fibroblastos maduros en ausencia de dermis producen colágeno con un patrón alterado, lo cual dejará como consecuencia cicatrices y contracturas de la piel, alterando su funcionalidad y estética (Wainwright, 1995).

Cuando la piel ha sido dañada, da lugar al proceso de reparación. La reparación es el reemplazo de tejido muerto por tejido de granulación, el cual madurará a tejido cicatricial. Este proceso puede diferenciarse en primera y segunda intención (Banks, 1981; Thompson, 1984; Gázquez, 1991).

La reparación por primera intención ocurre cuando la piel dañada constituye una herida con bordes limpios y es cerrada inmediatamente. La herida produce muerte celular de un pequeño número de células epiteliales y del tejido conjuntivo. Este surco se llena de sangre que, posteriormente, coagulará y en la superficie sufrirá una deshidratación formando la costra. A las 24 horas, aparecen los neutrófilos y comienzan a multiplicarse los bordes epidérmicos. Las células,

que se han multiplicado, comienzan a desplazarse hacia la línea media, por debajo de la costra superficial, fusionándose y produciendo una capa epitelial delgada y continua. A las 72 horas predominan los macrófagos, el tejido de granulación invade el espacio creado por la injuria, se produce una proliferación de fibras colágenas y continúa la proliferación de las células epiteliales (Cotran *et al.*, 2000).

Al quinto día el espacio de la incisión se encuentra completamente repleto con tejido de granulación y proceso angiogénico. El colágeno comienza a ser más abundante y sus fibras se empiezan a ordenar, comienza a producirse la unión de los bordes, la epidermis vuelve a tener el mismo grosor y las células epiteliales vuelven a desarrollar la capa queratinizada (Cotran *et al.*, 2000).

A la segunda semana, se deposita colágeno de forma continua y hay proliferación de fibroblastos, el infiltrado leucocitario desaparece, al igual que el edema. Al final del primer mes, la cicatriz esta formada por tejido conjuntivo celular sin infiltrado inflamatorio y cubierto por una epidermis íntegra (Banks, 1981; Cotran *et al.*, 2000).

La reparación por segunda intención sucede cuando ha ocurrido pérdida de tejido, por lo tanto, en este caso es necesario reparar un gran defecto tisular. En los bordes se genera una gran cantidad de tejido de granulación, ya que la regeneración a través de células parenquimatosas no es suficiente. Los defectos tisulares tienen más fibrina, residuos necróticos y exudados que deben ser eliminados, por lo tanto, la reacción inflamatoria es más intensa, se forman cantidades mucho mayores de tejido de granulación y ocurre la retracción de la herida, la cual es parte importante del proceso de reparación normal, pero cuando este proceso se exagera se habla de contractura de la piel, que produce deformidad, por lo tanto, altera su funcionalidad y estética (Banks, 1981; Cotran *et al.*, 2000).

Cuando la piel ha sido injuriada y se ha producido pérdida de tejido, por lo tanto pérdida de continuidad, se requiere la participación de la epidermis, dermis e hipodermis, además de las células como fibroblastos, macrófagos, neutrófilos y los vasos sanguíneos (Thompson, 1984; Banks, 1981; Gázquez, 1991).

El proceso de reparación de la piel es un proceso celular dinámico, el cual es iniciado con la injuria y continúa a través de la reorganización de los tejidos en el sitio injuriado. Ha sido separado en etapas; insulto o injuria, inducción, inflamación, proliferación y maduración (Banks, 1981).

### **Etapas de Injuria.**

Es el estado inicial de la reparación de la piel. Aquí es cuando se rompe la integridad de la piel, que da por resultados hemorragia, muerte celular y contaminación por microorganismos. Los mecanismos hemostáticos actúan a nivel local, para formar el coágulo, el cual detendrá la pérdida de fluidos, dará una estabilidad inicial y formará una zona sellada bajo la zona injuriada (Banks, 1981; Thompson, 1984; Drago, 1999; Cotran *et al.*, 2000).

### **Etapas de Inducción.**

Esta etapa consiste en la instalación de nuevas células en el área injuriada para comenzar la reparación propiamente tal, además existen muchos factores quimiotácticos para neutrófilos, macrófagos y fibroblastos. Por lo tanto estas células comienzan a repoblar la zona injuriada. No se sabe con certeza cual es el estímulo inicial para comenzar la reparación, pero se piensa que es la hipoxia, traducida a acidosis local que induce una neovascularización, la cual permite la llegada de estas células al sitio exacto de injuria. Los fibroblastos responden al ácido láctico acumulado por la actividad de los macrófagos, pero la síntesis de

colágeno no ocurre hasta que metabolitos esenciales llegan a la zona injuriada por medio de la circulación sanguínea (Banks, 1981; Cotran *et al.*, 2000).

### **Etapa de Inflamación.**

Esta etapa comienza inmediatamente después de la injuria. La etapa de inflamación se describe como una reacción compleja en el tejido conjuntivo vascularizado, que además incluye al plasma, células circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas), vasos sanguíneos, constituyentes celulares (mastocitos, fibroblastos, macrófagos, linfocitos) y extracelulares (matriz extracelular). Es una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es liberar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias (Drago, 1999; Cotran *et al.*, 2000).

La respuesta inflamatoria está muy relacionada con el proceso de reparación. Este proceso de reparación se inicia durante las primeras fases de la inflamación, pero no finaliza hasta que termine la noxa. La inflamación es útil para destruir, atenuar o mantener localizado al agente patógeno y, al mismo tiempo, inicia una cadena de sucesos que curan y reconstruyen el tejido lesionado (Banks, 1981; Cotran *et al.*, 2000).

Durante la reparación, el tejido lesionado es reemplazado por la regeneración de las células parenquimatosas nativas o por la proliferación del tejido fibroblástico. En esta etapa se produce una vasoconstricción inmediatamente después de la injuria, que es seguida de una vasodilatación en conjunto con un incremento de la permeabilidad vascular (Drago, 1999; Cotran *et al.*, 2000).

Durante esta etapa se produce liberación de sustancias vasoactivas desde las células endoteliales, mastocitos y plaquetas, por lo tanto histamina, serotonina, bradiquinina y prostaglandinas son liberadas al torrente sanguíneo,

iniciando la respuesta vascular y facilitando la migración de las células hacia el espacio extravascular. También, se liberan factores quimiotácticos a nivel de la zona injuriada, por lo tanto son atraídos hacia la zona neutrófilos, fibroblastos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas (Banks, 1981; Tizard, 1995; Drago, 1999).

Los neutrófilos son las células predominantes en el sitio injuriado por los 3 primeros días, además son fagocitos muy efectivos, por lo cual son capaces de remover detritus celular y hacer fagocitosis efectiva frente a microorganismos. Los fibroblastos comienzan a sintetizar colágeno a las 24 horas post-injuria, pero su depósito es evidenciable alrededor del 4<sup>to</sup> día post-injuria. Los macrófagos son los responsables de la fagocitosis celular y de otros tejidos dañados, como colágeno y elastina. Los mastocitos liberan aminas vasoactivas, cooperando con la respuesta aguda de la inflamación. Los linfocitos y las células plasmáticas juegan un rol de defensa, ya que son importantes para el normal funcionamiento del sistema inmune (Drago, 1999; Cotran *et al.*, 2000).

La duración del estado de inflamación es variable y depende de varios factores, tales como: contaminación, presencia de tejido dañado y/o infección. Una herida sin infección, sin agentes microbianos presentes, generalmente manifiesta un estado de inflamación de alrededor de 3 a 4 días (Tizard, 1995; Cotran *et al.*, 2000).

### **Etapas de Proliferación.**

Corresponde a la fase en que hay proliferación celular o actividad mitótica de las células epidermales, endoteliales y fibroblastos, extendiéndose hasta 10 a 14 días post injuria. Cuando la injuria ha afectado el estrato basal, células marginales, como las de folículos pilosos sin defectos, pueden migrar y así cubrir ese estrato dañado (Banks, 1981; Gázquez, 1991).

El proceso de migración celular comienza en las primeras 24 horas post injuria, pero no es visible hasta que ocurre la queratinización. La epidermis adyacente a la herida proliferará para reemplazar a las células que migraron. Las células que migran mantienen su potencial mitótico, proliferando y reemplazando a la epidermis. El resultado de esta migración y proliferación es el restablecimiento de la barrera epidermal, dermal e hipodermal por debajo de la costra, la cual caerá dentro de unos 7 días (Drago, 1999; Cotran *et al.*, 2000).

Las células endoteliales son las encargadas de restablecer la vascularidad del sitio injuriado, estas células completan su tarea cuando se fusionan con células provenientes de arterias y vénulas, por lo tanto dando origen a la neovascularización. Los fibroblastos perivasculares proliferan y sintetizan matriz extracelular, secretando en primer lugar ácido hialurónico y luego proteoglicanos sulfatados, por lo tanto se recupera el microambiente. Los proteoglicanos son muy hidrofílicos, por lo tanto su acumulación contribuye al aspecto edematoso de la herida. La síntesis de colágeno, por parte de los fibroblastos proliferantes, corresponde en su etapa inicial a colágeno tipo III, pero alrededor de los 7-8 días post-injuria destaca el colágeno tipo I, que eventualmente se convierte en el colágeno principal del tejido cicatricial maduro. Los fibroblastos se han movilizado a través de una malla de fibrina, la cual es temporal, avanzando desde y hacia el sitio injuriado y hacia los vasos sanguíneos. Algunos de estos fibroblastos desarrollan la capacidad de movilizarse por medio de mecanismos contráctiles, las miofibrillas, y así comienzan a aumentar en número a medida que disminuye el estado de inflamación. Este nuevo tejido, de degranulación, es tejido conectivo que repara la zona, posee propiedades colagenolíticas, por lo tanto permite la limpieza de residuos y remodelación del colágeno, además es el responsable del fenómeno de contracción, movimiento de la piel en todo su grosor hacia el centro de la lesión, el cual es dependiente de las miofibrillas

desarrolladas por los fibroblastos (Banks, 1981; Thompson, 1984; Drago, 1999; Cotran *et al.*, 2000).

### **Etapa de Maduración.**

La maduración de una cicatriz corresponde a la gradual reducción del número de fibroblastos con una correspondiente disminución del número de capilares, además de una reducción de la degradación del colágeno y la formación de enlaces cruzados intramoleculares e intermoleculares estables en esta molécula. La etapa anterior era dominada por los fibroblastos y su actividad sintética, por el contrario esta etapa se caracteriza por existir un balance entre síntesis y degradación de los componentes del tejido conectivo. El colágeno es recambiado en la zona gracias a la acción de fibroblastos, macrófagos, células epiteliales y neutrófilos, ya que todos ellos son capaces de producir colagenasa. La mayor parte del colágeno tipo III, que fue secretado en las etapas iniciales, es eliminado, para ser reemplazado por fibras colágenas tipo I reorientadas de acuerdo a las nuevas líneas de fuerzas y produciendo así un incremento gradual de la fuerza que esta zona puede soportar (Banks, 1981; Thompson, 1984; Cotran *et al.*, 2000).

### **Injertos de Piel.**

Siendo lo ideal una rápida reparación de la piel, es difícil de lograr cuando el daño involucra una gran superficie, debiendo ser reparada con sustitutos de piel o injertos, ya sean temporales o definitivos (Demling *et al.*, 2000c).

En los sustitutos o injertos es fundamental incorporar las características de la piel para evitar mayores alteraciones en cuanto a su funcionalidad y aspecto: la cobertura de la herida debe ser biestratificada, los componentes análogos a dermis y epidermis son necesarios para un exitoso reemplazo de la piel, la capa

más externa es la que actúa como barrera protectora, los elementos dermales son los que guían el proceso de reepitelización; además se debe restaurar la arquitectura normal de la piel y evitar la contractura de ella (Demling *et al.*, 2000c).

Los injertos en general, no deben ser aplicados sobre superficies infectadas, en heridas deterioradas ni en pacientes con hipersensibilidad a los componentes del injerto; además es necesario aplicar agentes antimicrobianos alrededor de una semana antes del injerto y justo antes de la aplicación la herida debe ser limpiada con solución salina (Matsui *et al.*, 1996; Demling *et al.*, 2000c).

### **Injertos según Procedencia.**

Los injertos de piel se clasifican como autogénicos, alogénicos o xenogénicos. Se entiende por injertos autogénicos, aquellos que son tomados desde el mismo paciente y son sembrados en laboratorio, para luego ser aplicados sobre la zona injuriada, estos injertos tienen como ventaja el bajo potencial de rechazo y riesgo de transmisión de enfermedades, pero el problema que presentan es la menor cantidad de tejido que se puede obtener, ya que el sitio de donación debe recuperarse antes de donar nuevamente. (Demon Internet UK., 1996)

Los injertos alogénicos son aquellos tomados desde otros individuos de la misma especie, para luego ser colocados sobre la zona injuriada; con este tipo de injerto podemos obtener una mayor cantidad de zonas donantes, lo que involucra un mayor potencial de rechazo y riesgo de transmisión de enfermedades (Demon Internet UK., 1996; Demling *et al.*, 2000b).

Por último, los injertos xenogénicos, son aquellos tomados desde individuos de otra especie y luego aplicados en la zona injuriada. Tienen la

ventaja de poder disponer de una mayor cantidad, pero el riesgo de transmisión de enfermedades y el potencial de rechazo aumentan muchísimo. La eficacia de estos injertos depende de una serie de factores; dar buen soporte al crecimiento celular, proveer un sustrato capaz de dar adherencia, facilitar la proliferación celular y la producción de matriz celular, reabsorción desde el sitio injuriado en forma controlada, baja toxicidad, baja inmunogenicidad y propiedades tensiles similares al tejido sano (Demon Internet UK., 1996; Demling *et al.*, 2000b).

### **Injertos según Permanencia.**

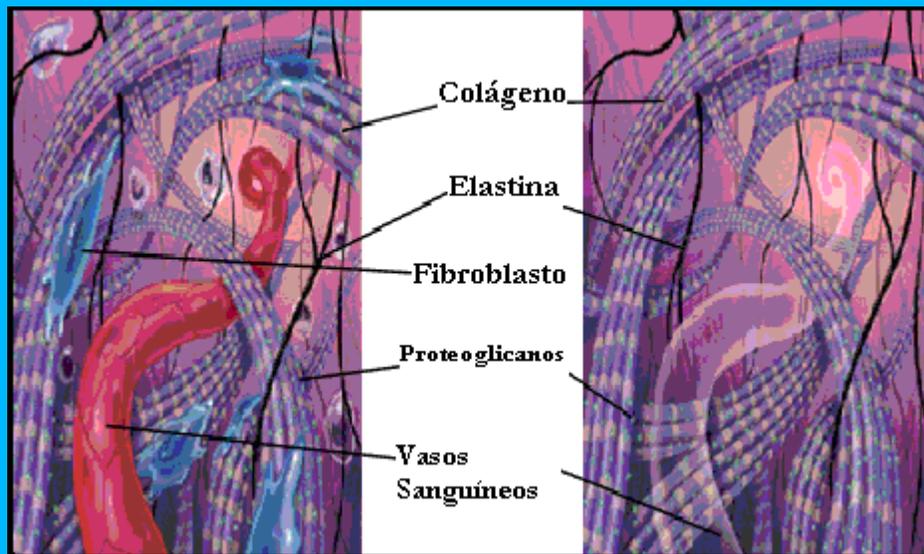
Los injertos pueden ser temporales, semi-temporales y definitivos o permanentes. Los injertos temporales son aquellos que son colocados sobre heridas recientes, superficiales y que son dejados mientras sana la piel, los injertos semi-temporales o transitorios son aquellos que permanecen adheridos a la herida escisionada y que eventualmente son reemplazados por el propio tejido del paciente y los injertos definitivos o permanentes son aquellos que incorporan análogos dermales y/o epidermales permitiendo la formación de neodermis (Demling *et al.*, 2000b; Demling *et al.*, 2000c).

### **Injertos según Funcionalidad.**

Los injertos pueden ser epidermales, dermales o sustitutos de piel. Los injertos epidermales son queratinocitos cultivados, ya sea en asociación de un vehículo, que puede ser polímeros o una matriz. Los injertos dermales corresponden a un soporte estructural capaz de permitir infiltración, adherencia, proliferación y formación de matriz por parte de los fibroblastos del paciente. Los injertos de piel completa o sustitutos de piel corresponden a una combinación de los injertos epidermales y dermales (Demling *et al.*, 2000c).

## **Alloderm®.**

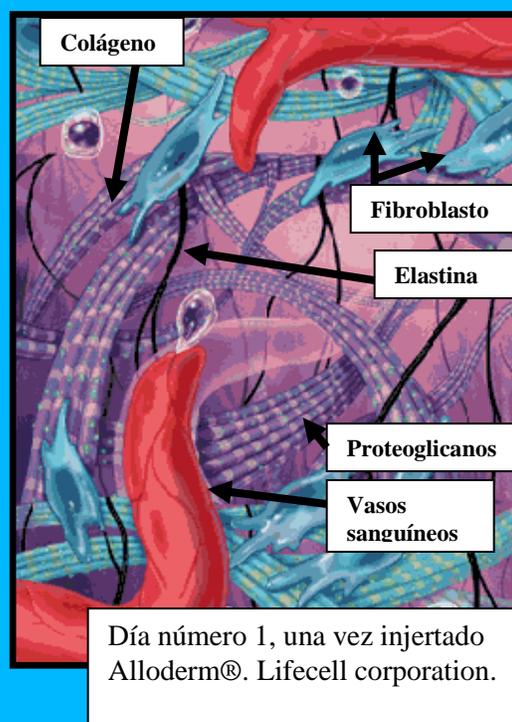
El Alloderm®, es un reemplazo dermal de tipo alogénico, proveniente de piel humana de cadáveres, procesada para remover las células epidérmicas y dérmicas, manteniendo la matriz extracelular como soporte para la repoblación celular cuando la piel ha sido injuriada (Lifecell corporation, 2002a; Lifecell corporation, 2002b).



El sitio donante es sometido a un riguroso protocolo para su obtención bajo la guía de la AATB (American Association of Tissue Banks) y de la FDA. La historia clínica del donante es minuciosamente estudiada y se realizan exámenes sanguíneos para encontrar evidencia de hepatitis B y C, anticuerpos de Virus de Inmunodeficiencia Adquirida I y II, Virus Linfocito T Humano I y II y sífilis. La epidermis es completamente removida, manteniendo la membrana basal. Las células dermales son removidas por medio de un detergente de bajo peso molecular no denaturante, mientras que la matriz es estabilizada a través de la inhibición de las metaloproteinasas. Luego la matriz colágena es crioprotegida sin dañar a los componentes necesarios para la repoblación y revascularización.

Además, se agregan antibióticos para asegurar un proceso aséptico. También, la matriz es revisada por microscopía electrónica para asegurar que no ha sufrido daños, que existe retención de la membrana basal, que hay bandas de colágeno normales y que no existe material celular. La piel resultante de los injertos debe ser estéticamente lo más parecida a la piel, sin alterar la contracción natural de las heridas y evitar la formación de escaras. La respuesta al injerto ha sido descrita por los fabricantes como exenta de reacciones que compliquen la reestructuración antes definida (Wainwright, 1995; Walter *et al.*, 1998; Lifecell corporation, 2002b).

Según describen sus fabricantes, al día 1 el implante Alloderm® es una matriz dermal acelular diseñada como una malla biológica para el tejido normal de remodelación. La matriz Alloderm® contiene información estructural y bioquímica, lo que permite realizar una revascularización y repoblación celular por parte de vasos sanguíneos, colágenos,

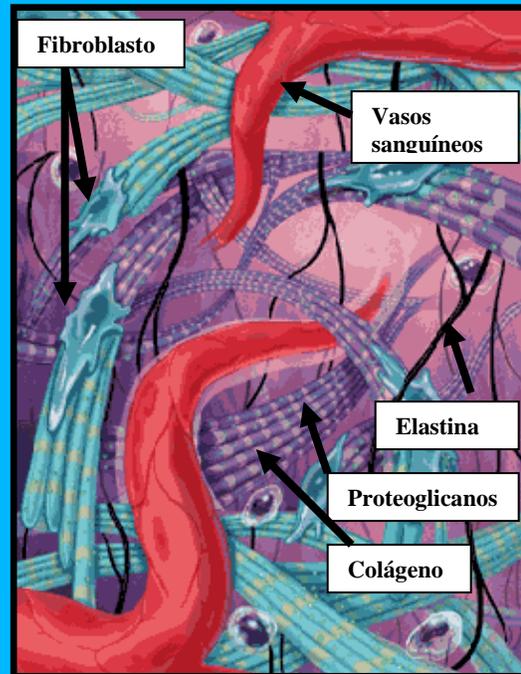


proteoglicanos y elastina. La matriz extracelular contiene los canales de vasos sanguíneos, los cuales sirven como conductos para la revascularización. Los colágenos, elastinas y reticulinas conservadas y en suma con la del tejido receptor inician la revascularización y repoblación celular (Lifecell corporation, 2002a).

Al día 7 a 10 del implante, los fibroblastos y vasos sanguíneos del hospedero responden al trasplante y mantienen el proceso de revascularización y remodelación del tejido (Lifecell corporation, 2002a).

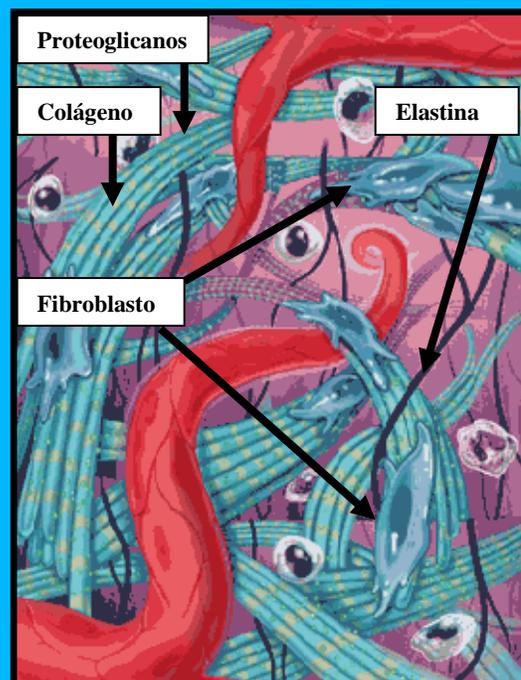
Al día 45, la revascularización del trasplante continúa como tejido conectivo normal, por medio del depósito de colágeno por parte del hospedero (Lifecell corporation, 2002a).

Día número 45, una vez injertado Alloderm®. Lifecell corporation.



Al día 90, el injerto es repoblado por células por parte del hospedero, integrándolo como tejido propio. Los fibroblastos continúan produciendo colágeno.

Día número 90, una vez injertado Alloderm®. Lifecell corporation.



Al día 180, el injerto es naturalmente remodelado dentro de los tejidos del paciente y termina el proceso de reparación sin la producción de fibrosis (Lifecell corporation, 2002a).



Vasos  
sanguíneos

### **OBJETIVO GENERAL**

- Describir histológicamente la respuesta local del área receptora al implante de una matriz acelular en un modelo experimental en conejo.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar y caracterizar histológicamente, a través del tiempo, en la zona implantada:
  - ◆ La infiltración celular.
  - ◆ La matriz extracelular fibrilar.
  - ◆ La actividad proliferativa de las células que infiltran el implante.
- Evaluar en el tiempo el lecho vascular.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Injertos.**

Implantes de Matriz dérmica acelular Alloderm®, diez muestras, Laboratorio LifeCell, Palo Alto, California.

### **Animales.**

Diez conejos, utilizados como modelo experimental en el Servicio de Cirugía de Animales Pequeños de la Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencias Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **Materiales para las tinciones.**

Las muestras fueron teñidas por los métodos de: Hematoxilina-Eosina (H.E) para observar núcleos o restos celulares, Van Gieson (v.G.) para observar fibras colágenas, Método del ácido Peryódico Schiff (P.A.S.) para observar la presencia de mucopolisacáridos (López *et al.*, 1982; Celani de Bassi *et al.*, 1992).

Además, se utilizó inmunomarcación con Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), proteína nuclear de 36 kd. El Antígeno Nuclear de Proliferación Celular es un cofactor para la enzima DNA  $\delta$  polimerasa, involucrado en la síntesis y reparación de DNA, cumpliendo un rol fundamental en la replicación semiconservativa de DNA, la mayor concentración de PCNA se alcanza en la fase tardía de G1 y S, declinando rápidamente en G2, M e inicio de G1 (Fairman, 1990; Shivji *et al.*, 1992; Boenisch, 2002).

### **Equipos.**

Microscopio Óptico Nikon Eclipse E600.

Cámara video digital CoolSnap-Pro; Media Cybernetic.

### **Obtención de muestras.**

Las muestras fueron obtenidas a partir de tres conejos de los diez implantados en la cara interna de la oreja izquierda, en cuatro incisiones distribuidas equidistantes a lo largo de su eje mayor; y retiradas semanalmente a lo largo de un mes a partir del 7° día post implantación.

### **Tratamiento de muestras.**

Una vez retirados los implantes fueron fijados en formalina al 10% por 24 horas, para luego ser procesados según las técnicas convencionales para tejidos incluidos en parafina en el equipo Autotécnico Shandon Citadle 2000 (López *et al.*, 1982; Celani de Bassi *et al.*, 1992). (Anexo V)

Las muestras fueron cortadas en forma semiseriada, con un grosor de 5  $\mu\text{m}$ , por medio de un micrótopo de rotación Leitz, y fueron montadas en portaobjetos con albúmina.

Las placas fueron teñidas por los métodos de: Hematoxilina-Eosina (anexo VI), Van Gieson (anexo VII), Método del ácido Peryódico Schiff (anexo VIII). La tinción Hematoxilina-Eosina permite evidenciar la presencia de núcleos celulares, por medio de la tinción de color azul (Hematoxilina), y además tiñe el citoplasma celular de color rojo-rosado (Eosina). La tinción van Gieson permite diferenciar las fibras colágenas al teñirlas de color rojo brillante. El método del ácido Peryódico Schiff, permite la tinción de glicosaminoglicanos de color fucsia, presentes en las membranas basales (López *et al.*, 1982; Celani de Bassi *et al.*, 1992).

Para la inmunomarcación con antígeno de proliferación celular (PCNA) (anexo IX) los cortes fueron montados en portaobjetos silinizados (anexo X). Se investigó la presencia y tipo de elementos celulares como respuesta al implante de la matriz acelular, describiendo la actividad de proliferación de las células que

infiltraron el implante mediante inmunomarcación con antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Con este fin se utilizó un anticuerpo monoclonal (Acm) primario PC10, anti-antígeno nuclear de proliferación celular (antiPCNA) (Novocastra, Newcastle, UK, clone PC10), que corresponde a una IgG de ratón. Como anticuerpo secundario se utilizó la porción Fab de anticuerpo de burro, anti-IgG de ratón, conjugado con fosfatasa alcalina (Biosource S.A., C.A., EEUU), que reconoce al Acm primario. La reacción inmunohistoquímica se visualizó con Fast Red, que da un color rojo a las células en proliferación (Boenisch, 2002).

### **Análisis de los resultados.**

Se realizó una descripción histológica por cada tinción y semana. Además se realizó una descripción de los resultados obtenidos, del estudio de 5 campos por corte, expresándolos como número absoluto de observaciones por campo y entregando un promedio.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Primera semana.**

Según la técnica Hematoxilina- Eosina, fue posible observar que en el área implantada se podían diferenciar dos zonas, una por la cual el implante era infiltrado y otra no, encontrándose opuestas (Figura 1).

La zona que no se encontraba infiltrada, borde libre, se observaba una línea de células infiltrativas dispuestas una al lado de otra, correspondiendo a menos de un tercio del total de la superficie del implante. Esto puede ser explicado porque el implante de Alloderm® debe ser colocado con la superficie que viene marcada hacia arriba, de este modo, el borde que no se encuentra infiltrado correspondería a la zona marcada, que a su vez corresponde a la zona de epidermis que fue retirada, por lo tanto a la membrana basal que permanece ofrece mayor resistencia a la infiltración celular. En el procedimiento estándar, recomendado por los fabricantes, el implante comienza a ser infiltrado en un inicio por la zona correspondiente a la dermis acelular, como ha sido descrito por sus fabricantes en el estudio realizado por LifeCell Corporation en el 2002 (Figura 2).

Además, las células infiltradas fueron observadas entre las fibras colágenas, describiéndose unas células con núcleo teñido de azul, irregular y lobulado, correspondiendo a células del tipo Polimorfonucleares (PMN), según lo descrito en la literatura por Banks en el 1981. Dentro de las células observadas entre las fibras colágenas fue posible la observación de algunas células en las que se podía describir en su citoplasma gránulos teñidos de color rojo, en otras células los gránulos teñidos de color azul y en otras células se observó el citoplasma claro, por lo tanto, sin afinidad ácida ni básica, correspondiendo a

Eosinófilos, Basófilos y Neutrófilos, respectivamente coincidiendo con lo descrito por Gázquez (1991).

También fue posible la observación de células fusiformes de citoplasma basofílico con prolongaciones citoplasmáticas, correspondiendo a la morfología celular descrita por varios autores para fibroblastos (Gázquez, 1991; Eurell y Van Sickle, 1998).

Por otra parte, fue posible observar células de núcleo esférico, intensamente teñido y con citoplasma escaso, siendo coincidente con lo descrito en la literatura para linfocitos (Tizard, 1995; Cotran *et al.*, 2000).

Por último fueron observadas células con núcleo en forma de herradura, de posición excéntrica y con citoplasma basófilo, siendo este tipo celular las predominantes, corresponden según Banks (1981) a células mononucleares, monocitos-macrófagos, lo cual establece un patrón histológico de inflamación de tipo crónica, que se puede confirmar además con la presencia de células linfocíticas, las cuales en conjunto, reflejan una reacción persistente del organismo frente al implante, discrepando con lo establecido por los fabricantes del implante (LifeCell Corporation, 2002a; LifeCell Corporation, 2002b).

Además, fueron observadas células gigantes multinucleadas, tipo epitelioides, que representan a una inflamación crónica de tipo granulomatosa, la cual se presenta en presencia de cuerpos extraños al organismo, por lo tanto, esto implica una respuesta de rechazo frente al implante por parte del hospedero, contradiciendo lo planteado por los fabricantes del implante (LifeCell, 2002a; LifeCell, 2002b).

Los bordes superior e inferior se encontraban sin mayores diferencias, siendo ambos infiltrados por los mismos tipos celulares. Para la primera semana el promedio de área infiltrada, con la tinción H-E, correspondió a  $1174 \mu\text{m}^2$ .

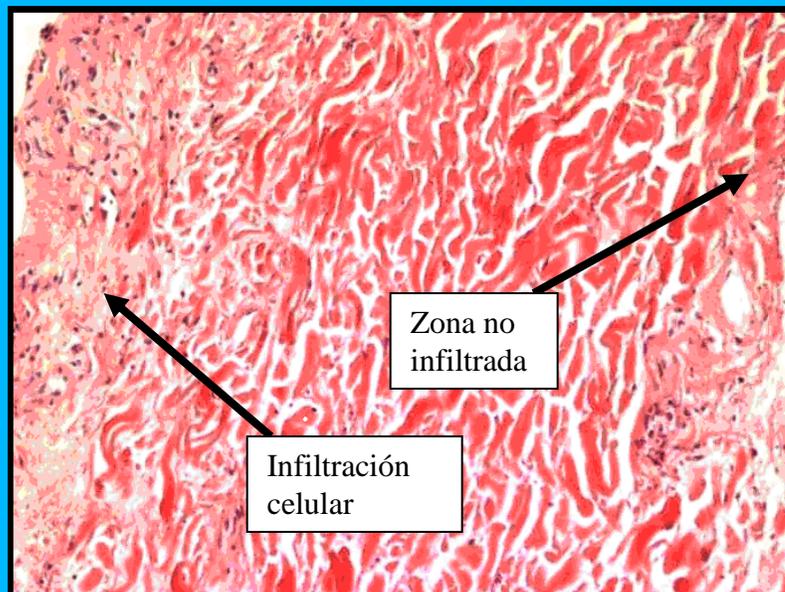
En los cortes histológicos teñidos con la tinción van Gieson, para la primera semana el promedio de área infiltrada, correspondió a  $5257 \mu\text{m}^2$ .

Además se pudo observar, que en la zona correspondiente al borde libre, el colágeno fue teñido de color rojo intenso, de forma fibrilar, regular y con disposición de haces entrecruzados que formaron una red de fibras gruesas, en cambio en la zona opuesta, la zona infiltrada, se encontraba teñido de color rosado suave, de forma fibrilar, irregular y manteniendo la disposición de haces entrecruzados, pero en este caso se formaba una red fibras delgadas, lo cual es posible de entender porque a este borde libre aún no llegaban células de tipo inflamatorio como son los PMN, por lo tanto, la estructura del implante se encuentra sin variaciones, en cambio en la zona opuesta ya se encontraba infiltrada por PMN y mononucleares, sufriendo un proceso inflamatorio en esta zona, con destrucción tisular producida en una inflamación crónica, como se describe en la literatura por Gázquez (1991) y por Cotran *et al.* (2000).

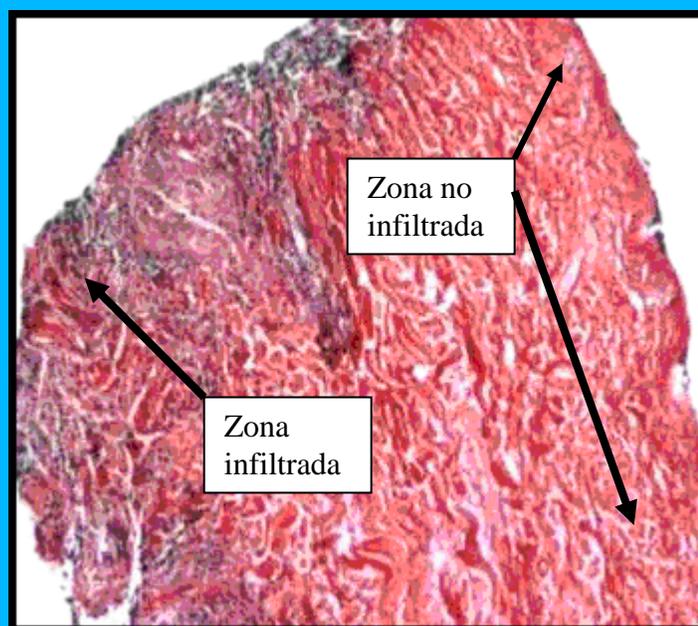
Por medio del método del ácido Peryódico Shiff, el área medida para la primera semana, correspondió a  $2854 \mu\text{m}^2$ . Además fue posible observar la membrana basal teñida de color rojo delimitando el perímetro de pequeños vasos sanguíneos en desarrollo, principalmente, en la zona periférica del implante. Los vasos sanguíneos de neoformación presentaron distintos calibres, se encontraron rodeados de colágeno con disposición circular y se orientaron desde la periferia hacia medial, por lo tanto, corrobora lo establecido por sus fabricantes respecto a que la matriz permite la angiogénesis, lo cual se encuentra descrito por LifeCell Corporation en el 2000 y por Heimbach *et al.* (1988).

Según la técnica de inmunohistoquímica PCNA, el área medida correspondió a  $111 \mu\text{m}^2$ . Fue posible describir la presencia de células en proliferación, con núcleo de color rojo, las cuales se encontraban, principalmente, en la periferia, alrededor de los vasos sanguíneos. Las células que fueron

observadas positivas, de color rojo, grandes, globosas y de núcleo esférico, corresponden según lo descrito en la literatura a mastocitos (Banks, 1981).



**Figura 1.** Tinción Hematoxilina- Eosina 100X. Día 7.



**Figura 2.** Tinción van Gieson. 40X. Día 7.

## Segunda semana.

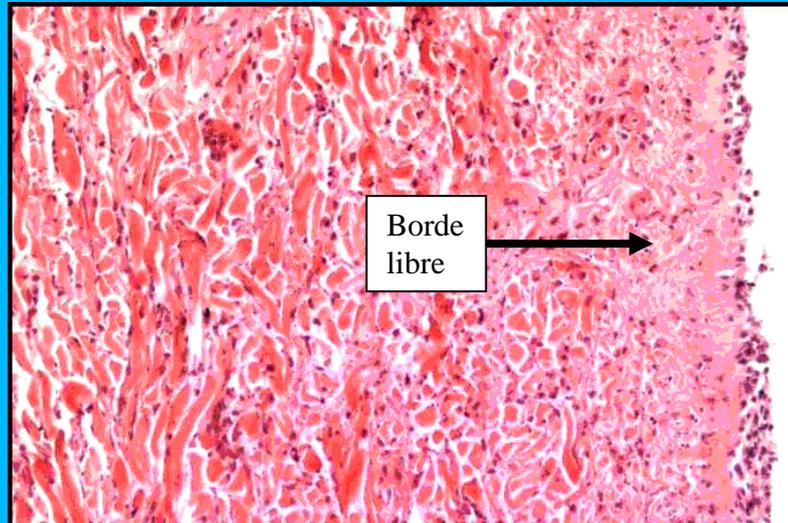
A través de la técnica H-E (figura 3), la infiltración celular se observó más homogénea y avanzada hacia la zona medial del implante, en comparación con la semana anterior, el área medida correspondió a  $3151 \mu\text{m}^2$ . Por otra parte, en el borde libre se observó una baja infiltración celular y con la misma disposición lineal antes descrita. Los bordes superior e inferior del implante, fueron infiltrados en forma más homogénea y más marcada. La zona opuesta al borde libre que se encontró infiltrada aproximadamente en un tercio del total de la superficie del implante, por lo tanto, el implante acelular se comportó como una matriz para las células provenientes del paciente, tal como fue descrito por sus fabricantes, permitiendo la repoblación celular (LifeCell Corporation, 2000a).

Los tipos celulares que infiltraron el implante, como ya se estableció, correspondieron predominantemente a las células del tipo mononucleares, sin mayores cambios de lo descrito para la primera semana, exceptuando en que existe una mayor cantidad de Fibroblastos, y que fue posible observar células de forma ovoide, citoplasma basófilo, núcleo esférico y excéntrico, que según lo descrito por Banks en 1981, corresponderían a plasmocitos, lo cual vuelve a confirmar una inflamación crónica, ya que al igual que los linfocitos y macrófagos, son células que representan este tipo de respuesta (Gázquez, 1991; Cotran *et al*, 2000).

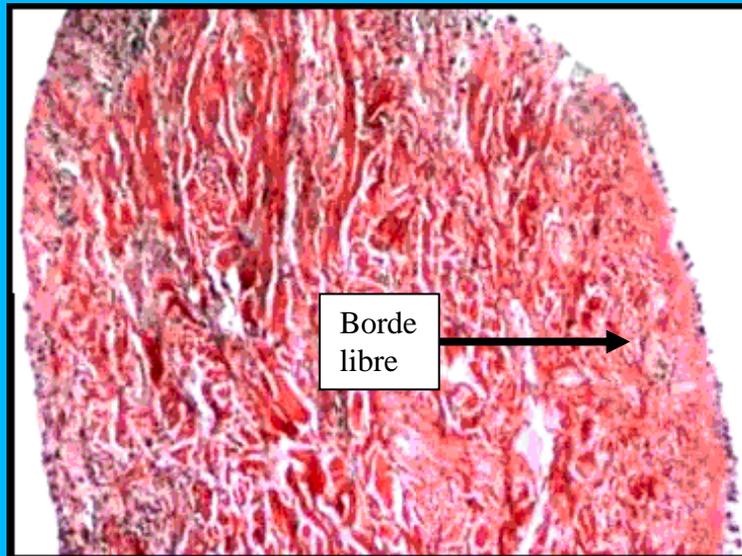
A través de la tinción van Gieson (figura 4), el área medida correspondió a  $4560 \mu\text{m}^2$ , fue posible apreciar que en la zona medial del implante, el colágeno se presentó como una red de fibras colágenas densa, de color rosa intenso, madura y de haces entrecruzados, en cambio en la zona más periférica correspondió a una red de fibras laxas, de color rosa pálido e inmaduras, confirmando el hecho de que las células inflamatorias tienen un efecto de destrucción celular (Gázquez, 1991; Cotran *et al*, 2000).

Al observar los cortes histológicos teñidas por el método P.A.S., el área medida correspondió a  $1463 \mu\text{m}^2$ , fue posible observar la membrana basal de vasos sanguíneos en desarrollo, teñidos de color rojo-púrpura, encontrándose principalmente en la zona periférica del implante, los vasos sanguíneos mantuvieron la orientación desde la periferia hacia medial, confirmando lo establecido anteriormente. Además fue posible describir la presencia de mastocitos, células que poseen gránulos que contienen heparina y serotonina, relacionados con la dilatación y contracción de vasos sanguíneos, por lo tanto, relacionados con el proceso de inflamación (Cotran *et al*, 2000).

Según la técnica de inmunohistoquímica PCNA, fueron evidenciadas una mayor cantidad de células positivas, correspondiendo a un área medida de  $163 \mu\text{m}^2$ , en comparación con la primera semana, de estas células una parte importante fueron encontradas alrededor de pequeños vasos sanguíneos en formación. También fue posible establecer, con PCNA, la presencia de células en proliferación del tipo fusiformes y otras células de tipo grandes y globosas que se encontraron a nivel más central del implante, correspondiendo a fibroblastos y mastocitos, además fue posible observar la presencia de endotelios en proliferación (Shivji *et al.*, 1992; LifeCell Corporation, 2000a).



**Figura 3.** Tinción Hematoxilina- Eosina  
100X. Día 14.



**Figura 4.** Tinción van Gieson 40X. Día 14.

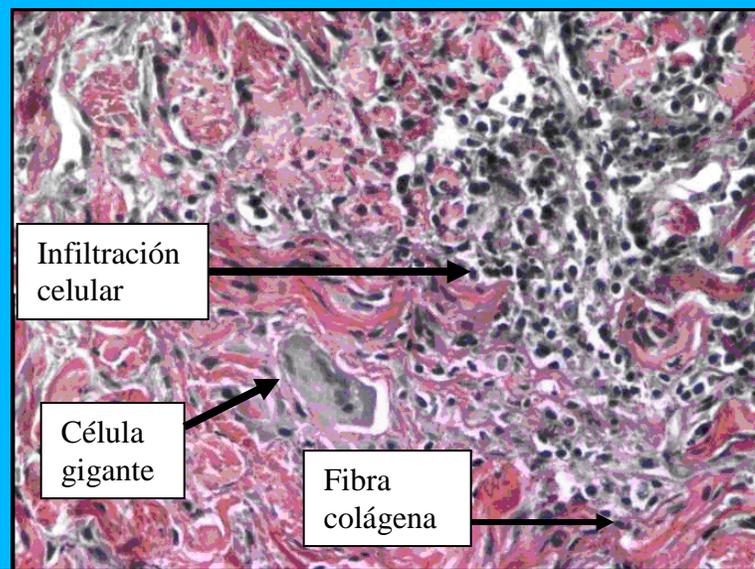
### **Tercera semana.**

Con H-E (figura 5 y 6), se pudo establecer que la zona infiltrada correspondía aproximadamente a 2/3 del área total del implante, por lo tanto, el proceso continuó avanzando en el tiempo, correspondiendo a un área de 3306  $\mu\text{m}^2$ . El borde libre pierde la estructura lineal y se observa una infiltración celular en forma homogénea todo el implante, coincidiendo con lo descrito por sus fabricantes. El patrón de células infiltradas sigue siendo el mismo que en las semanas anteriores y sólo se aprecia un aumento en la cantidad de plasmocitos y de células epitelioides (figura 6), llegando incluso a observarse varias células epitelioides una al lado de otra, lo cual vuelve a confirmar la presencia de un proceso inflamatorio crónico granulomatoso (Gázquez, 1991; Cotran *et al*, 2000; LifeCell Corporation, 2000a).

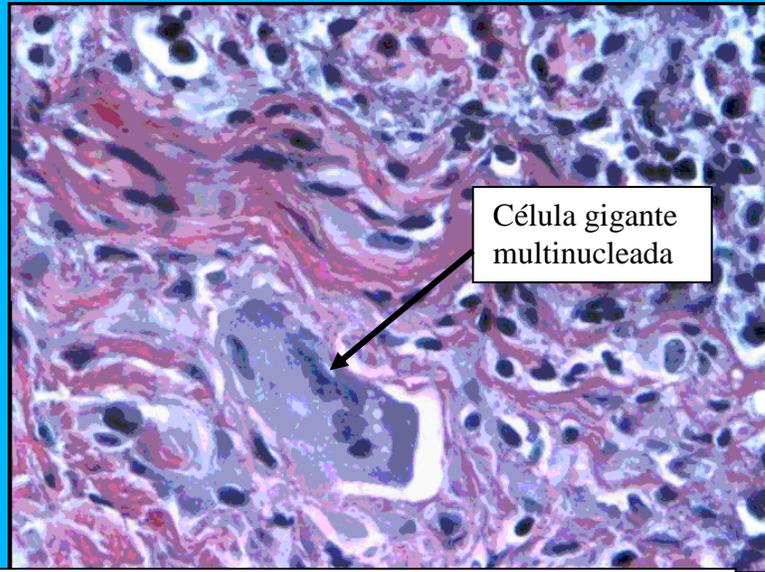
Además, es posible observar, por medio de la técnica van Gieson, que la área medida para esta semana y tinción correspondió a 3754  $\mu\text{m}^2$ . Además es posible evidenciar que la matriz extracelular observada en la zona infiltrada, correspondió a una estructura laxa y fragmentada, de color rosa pálido, granular y con detritus celular, en cambio en la zona con infiltración celular leve o nula, el colágeno se encontraba teñido de color rosa y con disposición fibrilar, sin detritus celular, lo cual vuelve a establecer la diferencia entre zona con infiltración celular y sin, como ya se estableció anteriormente (Gázquez, 1991; Cotran *et al*, 2000).

En los cortes histológicos teñidos con P.A.S., el área medida correspondió a 3666  $\mu\text{m}^2$ . Fue posible observar la membrana basal de vasos sanguíneos de neoformación maduros, que a diferencia de las semanas anteriores, se encontraron tanto en la zona medial como en la periferia, correspondiendo a lo establecido por sus fabricantes, demostrando que el implante permite el proceso de angiogénesis a través de la matriz (LifeCell Corporation, 2000a).

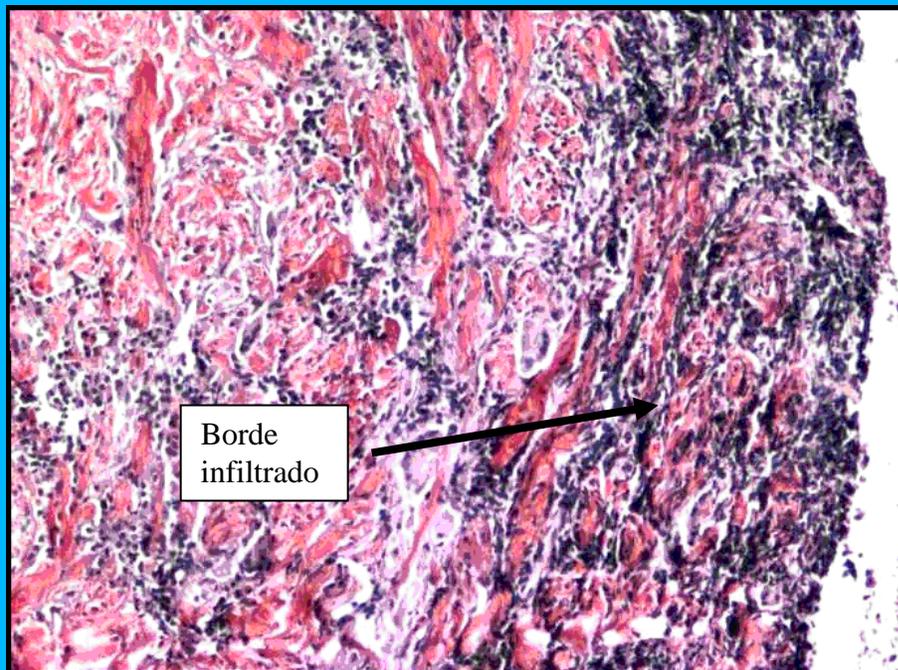
Con la técnica PCNA (figura 8), se observó un área correspondiente a 60  $\mu\text{m}^2$ . Además se puede inferir que las células inmunopositivas siguen proliferando, aunque en una menor cantidad que en etapas anteriores, estas células inmunopositivas correspondieron al tipo fusiformes, fibroblastos, y células alrededor de vasos sanguíneos periféricos y mediales, lo que indicaría una repoblación celular por parte del paciente, coincidiendo con lo descrito por sus fabricantes (Demling *et al.*, 2000b; LifeCell Corporation, 2000a).



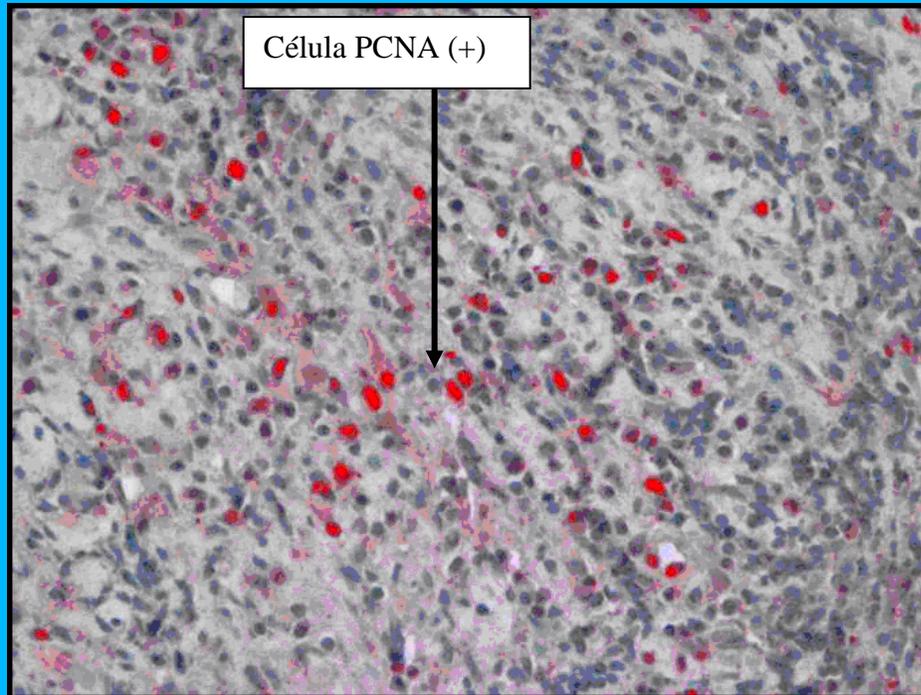
**Figura 5.** Tinción Hematoxilina- Eosina 200X.  
Día 21. Célula Epitelioide.



**Figura 6.** Tinción Hematoxilina- Eosina 400X. Día 21. Célula gigante multinucleada.



**Figura 7.** Tinción van Gieson. 40X. Día 21.



**Figura 8.** Tinción PCNA. Imagen procesada para análisis inmunohistoquímico. 100X. Día 21.

#### **Cuarta semana.**

A través de la técnica H-E (figura 9), se obtuvo como resultado un área de  $4429 \mu\text{m}^2$ . Además se pudo observar infiltración celular en toda el área implantada, pero siempre en el borde libre se mantuvo con una menor concentración celular, lo cual coincide con lo descrito por sus fabricantes (LifeCell Corporation, 2000a).

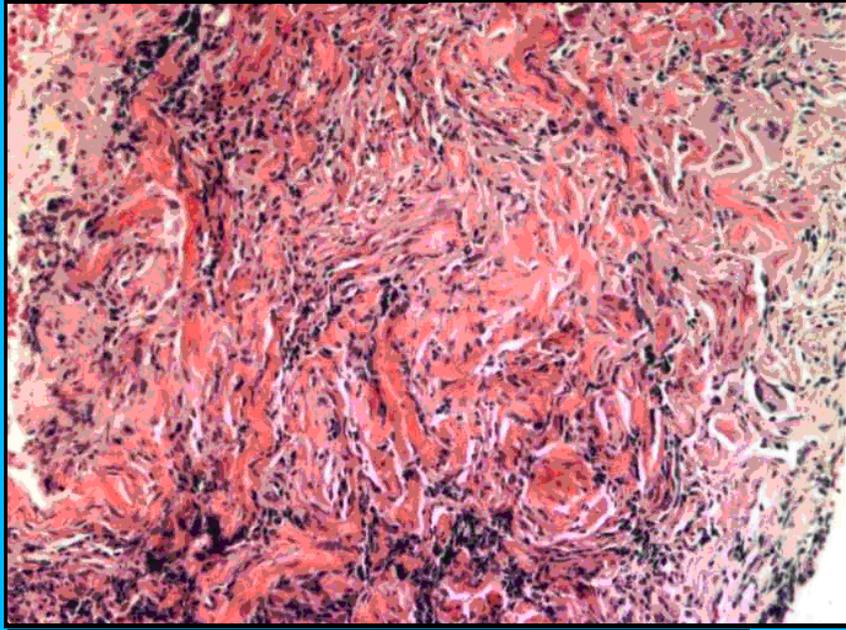
El patrón de infiltración siguió siendo el descrito en las semanas anteriores, con un aumento en las células gigantes multinucleadas, además fueron observados macrófagos con restos celulares en su interior, corroborando el proceso inflamatorio granulomatoso crónico y el proceso de fagocitosis, respectivamente (Gázquez, 1991; Cotran *et al*, 2000).

También fueron observadas células con núcleo en forma de herradura, de posición excéntrica y con citoplasma basófilo con restos celulares en su interior, correspondiendo a lo descrito en la literatura a macrófagos (Gázquez, 1991).

Según la técnica van Gieson, el área medida correspondió a  $3966 \mu\text{m}^2$ . La matriz extracelular correspondió en su gran mayoría a una matriz laxa y granular, teñida pálidamente y con detritus celular, en cambio, en la zona restante la matriz fue densa, fibrilar, teñida de color rosa intenso y sin detritus celular, por lo que, se puede inferir que la mayoría de la matriz se encontraría en digestión, por parte de macrófagos y por el proceso inflamatorio existente (Gázquez, 1991; Cotran *et al*, 2000).

En los cortes histológicos, en los cuales se utilizó la tinción P.A.S., el área medida correspondió a  $3101 \mu\text{m}^2$ . Se pudo apreciar la membrana basal de vasos sanguíneos de neoformación a través de todo el implante y en mayor concentración, demostrando que el implante permite la angiogénesis, confirmando lo establecido por los fabricantes (LifeCell Corporation, 2000a).

Gracias a la técnica PCNA se midió un área correspondiente a  $86 \mu\text{m}^2$ . Se pudo observar células en proliferación a través de toda la zona implantada, se evidenciaron células inmunopositivas indiferenciadas con prolongaciones citoplasmáticas, de tipo fusiforme y nuevamente alrededor de vasos sanguíneos de neoformación a lo largo de toda la extensión del implante, coincidiendo con lo descrito por los fabricantes (LifeCell Corporation, 2000a).



**Figura 9.** Tinción Hematoxilina- Eosina 100X.  
Día 28.

### **Infiltración celular.**

En los cortes histológicos, el proceso de infiltración celular fue en aumento a través del tiempo. Lo cual corresponde a lo descrito por distintos autores en la literatura con respecto a los implantes de piel (Demon internet UK, 1996; Demling *et al.*, 2000c; LifeCell Corporation, 2002a).

Además, se puede establecer que la matriz acelular, Alloderm®, fue capaz de dar un sostén adecuado a las células propias del paciente y lo que permitiría una repoblación celular, concordando con lo descrito por los fabricantes y otros autores (Demon internet UK, 1996; Demling *et al.*, 2000b; Demling *et al.*, 2000c; LifeCell Corporation, 2002a)

La infiltración celular descrita, corresponde principalmente a células del tipo mononucleares: monocitos y macrófagos, Además de fibroblastos, linfocitos, células de tipo epitelioides (gigante multinucleada), mastocitos, plasmocitos y polimorfonucleares: eosinófilos, basófilos y neutrófilos, células que se encuentran en procesos inflamatorios crónicos de tipo granulomatoso, como establece la literatura, sin embargo contradice lo descrito por los fabricantes del injerto, los cuales informan que no se produce una reacción inmunogénica por parte del paciente (Gázquez, 1991; Demon internet UK, 1996; Demling *et al.*, 2000c; Cotran *et al.*, 2000; LifeCell Corporation, 2002a).

### **Colágeno.**

La formación de colágeno depende de la presencia y proliferación de fibroblastos; durante el tiempo implantado los fibroblastos dejan de multiplicarse y el colágeno secretado comienza a polimerizar y es producido en menor cantidad. Además se debe tener en consideración, que en la zona implantada está ocurriendo un proceso de inflamación y reparación, con el cual se producirían

cambios celulares e incluso muerte de distintos tipos celulares. En el gráfico 1, se puede ver que el colágeno disminuye levemente semana a semana, esto es posible de explicar, ya que a medida que la piel va adquiriendo las propiedades de resistencia y elasticidad, el colágeno tiende a disminuir, ya que comienza a producirse el proceso de remodelación de la matriz, por medio de las metaloproteinasas, enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular y así permitir una adecuada formación del tejido conjuntivo, evitando la acumulación excesiva de colágeno I, evitando cicatrices y escaras (Heimbach *et al.*, 1988; Wainwright, 1995; Matsui *et al.*, 1996).

### **Glicosaminoglicanos.**

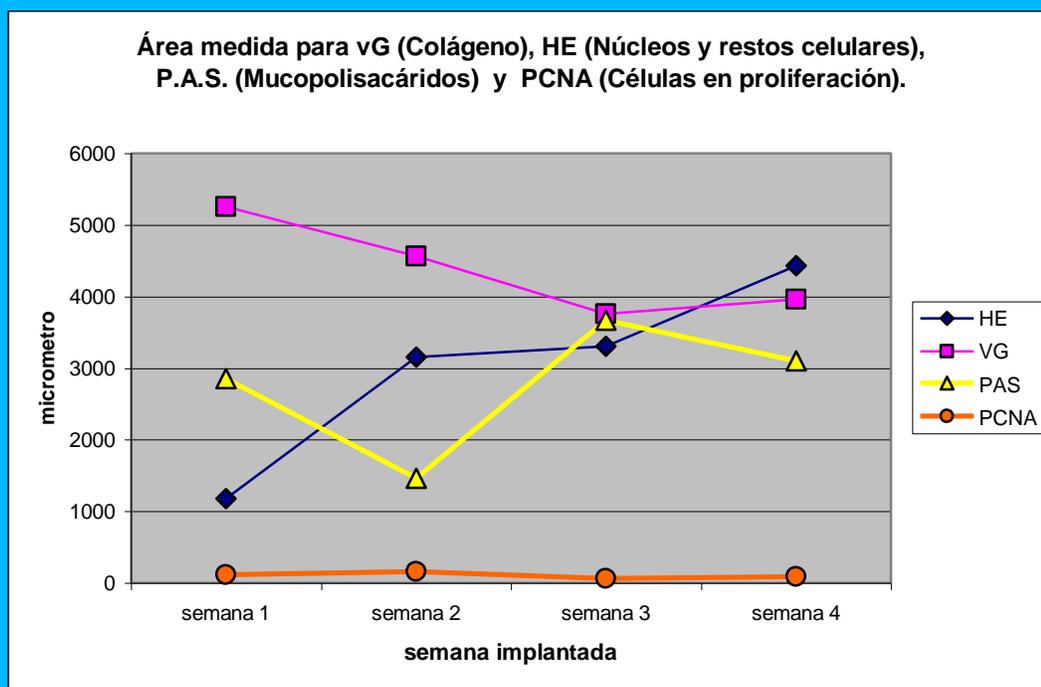
El cambio que se observa, a través del tiempo, en la concentración de glicosaminoglicanos (GAG's), moléculas presentes en la membrana basal de vasos sanguíneos, coincide con el proceso de remodelación que sufren los GAG's por medio de la acción de las metaloproteinasas, estromelinas, las cuales degradan y reestructuran el tejido en formación permitiendo adquirir las características de turgencia y capacidad de resistir fuerzas de compresión. Como ya se había establecido, el estroma intersticial corresponde en parte a glicosaminoglicanos y a proteínas no colagenosas. La función de los GAGs corresponde a lubricación y permite la unión entre las fibras de colágeno. (Cotran *et al.*, 2000). En el gráfico 1, es posible establecer que en la primera semana del implante se produce un aumento de GAGs, pero a partir de esta semana hasta la siguiente la concentración de estos elementos disminuyen, para volver a aumentar en las semanas posteriores.

## Proliferación celular.

Las células inmunopositivas en un inicio se encontraban principalmente en la periferia, alrededor de los vasos sanguíneos, y posteriormente se encontraron a través de toda la extensión del implante, lo cual nuevamente corresponde a lo establecido por distintos autores para los implantes de piel (Demling *et al.*, 2000c; LifeCell Corporation, 2002a).

En el gráfico 1, es posible observar que la mayor cantidad de células en proliferación se aprecian durante las primeras dos semanas que en las semanas restantes, pero siempre fue posible la observación de células positivas, lo cual nos indica que efectivamente en el área implantada se estaba produciendo proliferación celular, correspondiendo a lo descrito por los fabricantes (LifeCell Corporation, 2002).

Gráfico 1. (Anexo I).



## CONCLUSIONES

- ◆ En los implantes se observan 2 zonas, una que infiltra rápidamente y otra que infiltra lentamente, correspondiendo en este último caso a la membrana basal. El proceso de infiltración celular fue en aumento a través del tiempo.
- ◆ El colágeno tipo I permitió la infiltración celular, actuando como andamio, permitiendo la repoblación celular por parte del hospedero. Además el colágeno fue disminuyendo a través del tiempo, correspondiendo con el proceso de remodelación tisular.
- ◆ Según el patrón de infiltración celular; monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, plasmocitos, fibroblastos y células gigantes multinucleadas, fue posible establecer que se produjo una inflamación crónica de tipo granulomatoso, la cual se establece en procesos inflamatorios a cuerpos extraños.
- ◆ El implante facilita la formación de nuevos vasos sanguíneos.
- ◆ La inmunotinción con PCNA permitió observar la repoblación celular a través de todo el implante.
- ◆ El implante no es tan inofensivo, ya que induce una reacción inmune por parte del hospedero.

## ANEXOS

### Anexo I

Tabla de origen gráfico 1.

		semana			
Tinción	Datos	1	2	3	4
HE	Cuenta de área medida	15	15	15	15
	Promedio de área medida ( $\mu\text{m}^2$ )	1174	3151	3306	4429
	Desvest de área medida	1396,29	2050,88	3740,67	5439,35
P.A.S	Cuenta de área medida	15	15	15	15
	Promedio de área medida ( $\mu\text{m}^2$ )	2854	1463	3666	3101
	Desvest de área medida	1579,17	695,93	1909,58	2435,43
PCNA	Cuenta de área medida	10	10	10	10
	Promedio de área medida ( $\mu\text{m}^2$ )	111	163	60	86
	Desvest de área medida	69,54	81,97	49,18	91,13
vG.	Cuenta de área medida	15	15	15	15
	Promedio de área medida ( $\mu\text{m}^2$ )	5257	4560	3754	3966
	Desvest de área medida	1999,77	930,87	1558,64	2325,58
<b>Total Cuenta de área medida</b>		55	55	55	55
<b>Total Promedio de área medida</b>		2552,454545	2644,6	2936,381818	3065,8
<b>Total Desvest de área medida</b>		2424,245868	1985,724393	2666,073819	3817,11212

## Anexo II

Método de inclusión de tejidos en parafina o Paraplast (Autotécnico)

(López et al., 1982)

### Procedimiento:

- ◆ Fijar los tejidos en la solución adecuada, cuidando de identificar correctamente las muestras.
- ◆ Lavar si es necesario.
- ◆ Alcohol al 70% por una hora.
- ◆ Alcohol al 95% por una hora.
- ◆ Alcohol al 95% por una hora.
- ◆ Alcohol al 100% I por una hora.
- ◆ Alcohol al 100% II por una hora.
- ◆ Alcohol al 100% III por dos horas.
- ◆ Xilol I por una hora.
- ◆ Xilol II por una hora.
- ◆ Xilol III por una hora.
- ◆ Paraplast I por dos horas.
- ◆ Paraplast II por dos horas.
- ◆ Inclusión en Paraplast.

### Anexo III

#### Método de tinción Hematoxilina- Eosina (H-E)

(López et al., 1982)

##### Procedimiento:

- ◆ Desparafinar los cortes e hidratar hasta el agua destilada de acuerdo al siguiente esquema:

⇒ Xilol I por 10 minutos.

⇒ Xilol II por 10 minutos.

⇒ Xilol III por 5 minutos.

⇒ Alcohol 100% por 5 minutos.

⇒ Alcohol 100% por 5 minutos.

⇒ Alcohol 96% por 5 minutos.

⇒ Alcohol 70% por 5 minutos.

Nota: después de cada paso dejar escurrir el exceso de solvente.

- ◆ Lavar en agua destilada 5 minutos.
- ◆ Tinción nuclear con hematoxilina durante 2 a 3 minutos.
- ◆ Lavado abundante en agua corriente
- ◆ Carbonato de litio por 3 minutos.
- ◆ Lavado en agua corriente y corriendo por 5 minutos.
- ◆ Limpiar placa con gasa.
- ◆ Tinción citoplasmática con eosina al 1% durante 5 minutos.
- ◆ Lavado rápido en agua destilada.
- ◆ Deshidratar en:
  - ⇒ Alcohol de 95% rápido.
  - ⇒ Alcohol de 100% I rápido.

⇒ Alcohol de 100% II rápido.

⇒ Alcohol de 100% III por 5 minutos.

◆ Aclarar en:

⇒ Xilol I fenicado por 5 minutos.

⇒ Xilol II por 5 minutos.

⇒ Xilol III por 5 minutos.

◆ Montar en resina sintética.

## **Anexo IV**

Método para identificación de fibras colágenas.

Método de Van Gieson (vG)

(López et al., 1982)

### Procedimiento:

- ◆ Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- ◆ Tinción nuclear con Hematoxilina Férrica de Weigert, durante un minuto en placa
- ◆ Lavar abundantemente en agua corriente, mínimo 10 minutos o hasta que los núcleos se observen nítidamente
- ◆ Lavar en agua destilada por 3 minutos.
- ◆ Teñir en la solución de Van Gieson o de Picro-Ponceau durante 30 segundos.
- ◆ Colocar directamente en alcohol de 95%, primero un baño rápido y luego un baño de 5 minutos.
- ◆ Deshidratar en alcohol absoluto, aclarar en Xilol y montar en resina sintética.

## **Anexo V**

Método del Ácido Peryódico Schiff (P.A.S.).

(López et al., 1982)

### Procedimiento:

- ◆ Desparafinar e hidratar hasta el agua destilada.
- ◆ Ácido Peryódico al 1% por 10 minutos.
- ◆ Lavar en agua corriente 5 minutos y luego 3 lavados en agua destilada por 5 minutos cada uno.
- ◆ Reactivo de Schiff por 30 minutos a temperatura ambiente.
- ◆ Lavar en Agua Sulfurosa, recién preparada, tres baños de 5 minutos cada uno.
- ◆ Lavar en agua corriente por 10 minutos.
- ◆ Tinción nuclear con Hematoxilina por 2 minutos.
- ◆ Deshidratar, aclarar en Xilol y montar en resina sintética.

## Anexo VI

### Método Inmunohistoquímico para Proliferación Celular (PCNA)

(Boenisch, 2002)

- ◆ Los cortes serán desparafinados.
- ◆ Lavado dos veces en tampón Tris/Salino 0.1 M y pH 7.6 por 10 minutos cada uno.
- ◆ Procedimiento de recuperación de antígeno para lo cual, se colocan los cortes en un recipiente con una solución tampón, con agua destilada hasta completar el volumen inicial. Este recipiente deberá estar contenido en un segundo recipiente que contenga 300 ml de agua destilada durante la exposición al microondas y posteriormente se enfriarán a temperatura ambiente por 20 minutos.
- ◆ Lavado de los cortes en agua destilada y dos veces en tampón Tris/Salino por 10 minutos cada uno.
- ◆ Lavado en tampón bloqueador de fosfatasa alcalina endógena por 10 minutos, para luego incubar en 50  $\mu$ l de tampón Tris/Salino 1:100 con anticuerpo primario monoclonal PC10, para detección de PCNA durante toda la noche a temperatura ambiente.
- ◆ Lavado de los cortes en tampón Tris/Salino 3 veces por 10 minutos cada uno en agitación.
- ◆ Incubación por 30 minutos a temperatura ambiente en 50  $\mu$ l de una solución tampón Tris/Salino 1:500 de anticuerpo secundario policlonal conjugado con fosfatasa alcalina.
- ◆ Lavado de los cortes en tampón Tris/Salino 3 veces por 10 minutos cada uno en agitación.

- ◆ Aplicación de la solución reveladora, agregando 10  $\mu$ l de sustrato para fosfatasa alcalina y se dejan las muestras en la oscuridad por 5 minutos aproximadamente hasta que empiece a aparecer un color rojo.
- ◆ La reacción se detendrá con un lavado de Tris/Salino por 2 minutos y lavado en agua destilada por 2 minutos.
- ◆ Realizar una tinción nuclear rápida con Hematoxilina en 10 segundos y posterior montaje en gelatina de Káiser.

## Anexo VII

### Silinización de portaobjetos

(Boenisch, 2002)

#### Procedimiento:

- ◆ Limpiar los portaobjetos con solución de alcohol-clorhídrico (etanol de 95% con 0.5% de HCL). Secar con paño o papel absorbente sin pelusas.
- ◆ Enjuagar en acetona pura p.a. por 1 minuto.
- ◆ Sumergir los portaobjetos en solución de 3-Aminopropyltriethoxysilane al 2% en acetona pura p.a. durante 3 minutos.
- ◆ Enjuagar en acetona pura p.a. por 15 segundos.
- ◆ Secar rápidamente utilizando aire caliente (secador de pelo).
- ◆ Dejar secar durante 1 hora a 60°C. Ó toda la noche a temperatura ambiente en canastillo o caja. Durante el secado los portaobjetos deben permanecer separados entre sí.
- ◆ Mantener guardados en cajas cerradas libres de polvo.

### 3. BIBLIOGRAFÍA

**BANKS, W.J.** 1981 Applied Veterinary Histology. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, Estados Unidos. pp. 341-372.

**BOENISCH, T.** 2002. Manual de Métodos Inmunohistoquímicos de Coloración. 3ª ed. Dako Corporation. Carpinteria, California, Estados Unidos. pp. 5-38.

**CELANI DE BASSI, M; FERNÁNDEZ, J; VON LAWSEWITSH, I.** 1992. Lecciones de Histología Veterinaria. Volumen I, 3ª ed. Editorial hemisferio sur. Buenos Aires.

**COTRAN, R; KUMAR, V; COLLINS, T.** 2000. Patología estructural y funcional. Sexta edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México DF, México. 53-93 p.

**DEMLING, R; DE SANTI, R.N.; ORGILL, M.D.** 2000a. What are the properties of normal skin (biologic properties)? [en línea] <[http://burnsurgery.org/Betaweb/Modules/Skin\\_substitutes/sec1.htm](http://burnsurgery.org/Betaweb/Modules/Skin_substitutes/sec1.htm)> [consulta: 15-06-02]

**DEMLING, R; DE SANTI, R.N.; ORGILL, M.D.** 2000b. Biosynthetic skin substitutes: purpose, properties and clinical indications. [en línea] <[http://burnsurgery.org/Betaweb/Modules/Skin\\_substitutes/sec4.htm](http://burnsurgery.org/Betaweb/Modules/Skin_substitutes/sec4.htm)> [consulta: 15-06-02]

**DEMLING, R; DE SANTI, R.N.; ORGILL, M.D.** 2000c. Skin substitutes in burn management (historical perspectives). [en línea] <[http://burnsurgery.org/Betaweb/Modules/Skin\\_substitutes/sec3.htm](http://burnsurgery.org/Betaweb/Modules/Skin_substitutes/sec3.htm)> [consulta: 15-06-02]

**DEMON INTERNET UK.** 1996. Tissue engineered skin. [en línea] <<http://www.leachim.demon.co.uk/temp/skinrev.htm>> [consulta: 15-06-02]

**DRAGO, V.** 1999. La Cicatrización. [en línea] <<http://espanol.geocities.com/profedrago/pielycicat.htm>> [consulta: 17-02-2004]

**EURELL, J; VAN SICKLE, D.** 1998. Connective and Supportive Tissues. **In:** Dieter, H; Eurell, J. (eds.) Textbook of Veterinary Histology. 5a ed. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, Estados Unidos. pp. 32-61.

**FAIRMAN, M.** 1990. DNA polymerase  $\delta$ /PCNA: actions and interactions. Journal of Cell Science. (95): 1-4.

**GÁZQUEZ, A.** 1991. Patología veterinaria. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México DF, México. 273-300 p.

**HEIMBACH, D; LUTERMAN, A; BURKE, J; CRAM, A; HERNDON, D; HUNT, J; JORDAN, M; MCMANUS, W; SOLEM, L; WARDEN, G; ZAWACKI, B.** 1988. Artificial dermis for major burns. Ann. Surg. (208): 313-320 p.

**LIFECELL CORPORATION.** 2002a. Alloderm® works like an autograft. [en línea]

<<http://www.lifecell.com/healthcare/products/alloderm/howitworks.cfm>>

[consulta: 29-06-02]

**LIFECELL CORPORATION.** 2002b. LifeCell, what is Alloderm®? [en línea]

<<http://www.lifecell.com/healthcare/products/alloderm/whatitis.cfm>>

[consulta: 29-06-02]

**LÓPEZ, M; LEYTON, C; GRAF, M.** 1982. Técnicas de Histología y Citología. 2ª ed. Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile.

**MATSUI, R; OSAKI, K; KONISHI, J; IKEGAMI, K; KOIDE, M.** 1996. Evaluation of an artificial dermis full-thickness skin defect model in the rat. *Biomaterials* (17): 989-994 p.

**MONTEIRO-RIVIERE, N. A.** 1998. Integument. In: Dieter, H; Eurell, J. (eds.) *Textbook of Veterinary Histology*. 5a ed. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, Estados Unidos. pp. 303-332.

**SCOTT, D; MILLER, W; GRIFFIN, C.** 1995. *Muller & Kirk's, Small Animal Dermatology*. 5ª ed. Editorial W.B. Saunders Company. Estados Unidos.

**STEVENS, A; LOWE, J.** 1998. *Histología humana*. 2ª ed. Editorial Harcourt. Madrid. España. 355-369 p.

**SWANSON, J.** 1996. Anatomy and histology of normal skin. [en línea] <<http://www.meddean.Luc.edu/lumen/medEd/medicine/dermatology/skinlsn/skin.htm>> [consulta: 11-02-03]

**SHIVJI, M.J.H.; KENNY, M.K. & WOOD, R.D.** 1992. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell* (69): 367-374.

**THOMPSON, R. G.** 1984. Anatomía patológica general veterinaria. 2ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 175-299 p.

**TIZARD, I.** 1995. Inmunología Veterinaria. 4ª ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. Atlampa, México. 361-379 p.

**WAINWRIGHT, J.D.** 1995. Use of an acellular allograft dermal matrix (Alloderm) in the management of full-thickness burns. *Burns* (21): 243-248 p.

**WALTER, R. J.; MATSUDA, T.; REYES, H.; WALTER, J.; HANUMADASS, M.** 1998. Characterization of acellular dermal matrices (ADMs) prepared by two different methods. *Burns* (24): 104-113 p.