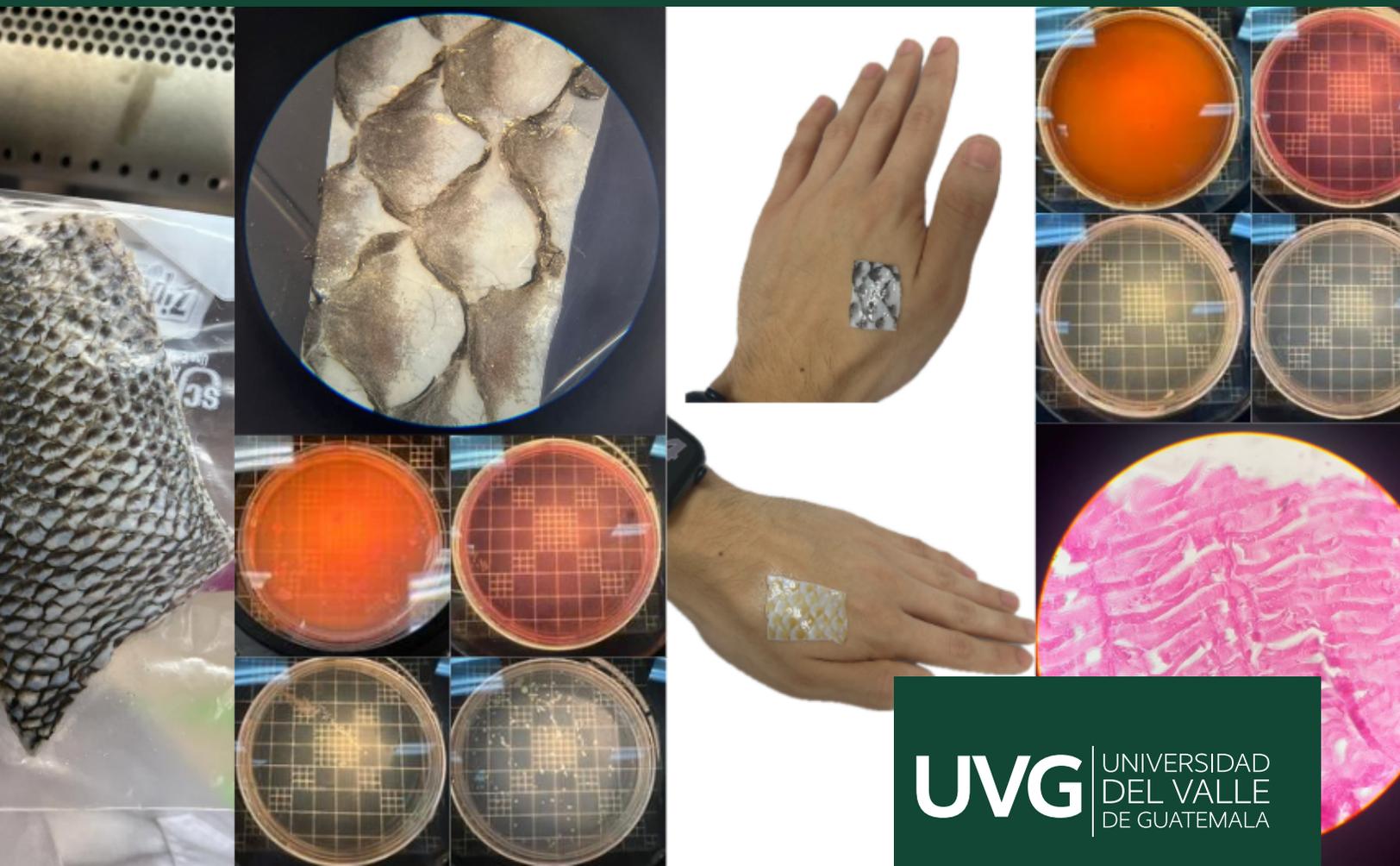


---

# Desarrollo y caracterización biológica de apósitos estériles a base de piel de tilapia

---

Alessandro Paiz Chávez



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



**Desarrollo y caracterización biológica de apósitos estériles a  
base de piel de tilapia**

Trabajo de graduación presentado por Alessandro Paiz Chávez para  
optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica

Guatemala,

2024



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



**Desarrollo y caracterización biológica de apósitos estériles a  
base de piel de tilapia**

Trabajo de graduación presentado por Alessandro Paiz Chávez para  
optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería Biomédica

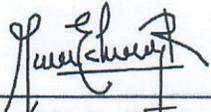
Guatemala,

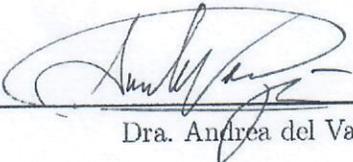
2024

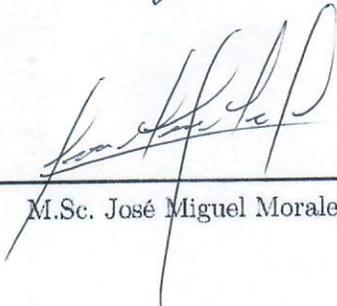
Vo.Bo.:

(f)   
M.Sc. José Andrés Leal

Tribunal Examinador:

(f)   
Dra. Mónica Escheverry

(f)   
Dra. Andrea del Valle

(f)   
M.Sc. José Miguel Morales

Fecha de aprobación: Guatemala, 6 de Enero de 2024.

La ingeniería de tejidos es una rama de la Ingeniería Biomédica que ha experimentado diversa evolución con el pasar de los años, brindando soluciones modernas y eficientes para el tratamiento de diferentes patologías. La elaboración de la presente tesis surge con el pensamiento de buscar una nueva solución en esta rama de la Ingeniería Biomédica, la cual pueda ser económica y viable para los tratamientos de personas con quemaduras en Guatemala que es un país en vías de desarrollo. Por esta razón elegí el proyecto de “Desarrollo y caracterización biológica de apósitos estériles a base de piel de tilapia”.

Con este trabajo se combinan diferentes conocimientos de microbiología, histología y biología celular, con el fin de ser aplicados de forma práctica para buscar una solución eficiente para el tratamiento de quemaduras, así como también la innovación del campo de la ingeniería de tejidos en el país.

Agradezco principalmente a Dios por permitirme llegar a cumplir una meta más en mi vida y darme mucha fortaleza para seguir siempre adelante. Especialmente quiero agradecer a mis padres por todo el amor, apoyo y esfuerzo, por darme la oportunidad de alcanzar un sueño más en mi vida y sobre todo por confiar siempre en mí. Agradezco a mis hermanos, Cristian y Daniel, por siempre brindarme el cariño y motivación para seguir adelante. También a mi abuela Mimi, por todo el cariño y apoyo brindado en estos años. También quiero agradecer de todo corazón a mis abuelos que no están presentes, pero desde el cielo han guiado mi camino y sus enseñanzas siguen inspirándome.

Quiero agradecer a mi novia, por todo su amor incondicional, apoyo constante y paciencia durante todos estos años. Por último, quiero agradecer a mis compañeros y amigos por todo el apoyo a lo largo de la carrera y sobre todo por las experiencias inolvidables que siempre llevaré conmigo.

Adicionalmente, me gustaría agradecer a la Universidad del Valle de Guatemala por abrirme las puertas de su casa de estudio y darme la oportunidad de formar mi camino como profesional; también a todos los catedráticos por brindarme los conocimientos necesarios en el ámbito profesional y por todo su apoyo. Agradezco también a mi asesor de tesis MSc. José Andrés Leal, por su paciencia, apoyo, compromiso y dedicación para llevar a cabo dicho proyecto. Además, agradezco al departamento de Ingeniería Electrónica, Mecatrónica

y Biomédica, por el apoyo brindado a lo largo de estos años y el apoyo financiero del proyecto.

También agradezco a la Dra. Patricia Lupo y Christa Contreras del departamento de Microbiología, así como también a Mariafernanda Alarcón y Leyda Hernández del departamento de Protección Vegetal de la Universidad por todas las enseñanzas para llevar a cabo este proyecto, por su tiempo y todo el apoyo con el equipo de laboratorio y material utilizado. Por último, me gustaría agradecer a Irma Orellana y al departamento de Química por su apoyo con los reactivos utilizados durante el proyecto.

Para finalizar, agradezco a German Orellana proveedor de las pieles de tilapia de “TILAPIAS PASABIEN”, por su apoyo con la extracción de las pieles de tilapia y la donación de las mismas para llevar a cabo el proyecto.

<b>Prefacio</b>	IV
<b>Lista de figuras</b>	X
<b>Lista de cuadros</b>	XI
<b>Resumen</b>	XII
<b>Abstract</b>	XIII
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Antecedentes</b>	3
<b>3. Justificación</b>	4
<b>4. Objetivos</b>	7
4.1. Objetivos generales . . . . .	7
4.2. Objetivos específicos . . . . .	7
<b>5. Alcance</b>	8
<b>6. Marco teórico</b>	9
6.1. Quemaduras . . . . .	9
6.1.1. Tipos de quemaduras . . . . .	9
6.1.2. Prevalencia . . . . .	10
6.1.3. Riesgos y complicaciones . . . . .	10
6.1.4. Tratamientos y terapias convencionales . . . . .	11
6.1.5. Apósitos . . . . .	12
6.2. Xenoinjertos . . . . .	15
6.2.1. Beneficios de piel de tilapia como Xenoinjerto . . . . .	15
6.2.2. ¿Cómo se obtienen? . . . . .	16
6.3. Procesos de esterilización . . . . .	16
6.3.1. Autoclaves . . . . .	16

6.3.2. Liofilización . . . . .	18
6.3.3. Métodos químicos . . . . .	19
6.3.4. Métodos radiológicos . . . . .	20
6.4. Pruebas biológicas . . . . .	20
6.4.1. Histología . . . . .	20
6.4.2. Cultivos bacterianos . . . . .	21
<b>7. Metodología</b>	<b>24</b>
7.1. Obtención y validación de tilapias antes de procesamiento . . . . .	24
7.2. Transporte y mantenimiento . . . . .	24
7.3. Preparación de control microbiológico . . . . .	25
7.4. Protocolos de esterilización . . . . .	26
7.4.1. Control . . . . .	26
7.4.2. Método 1 - Etanol 70% . . . . .	26
7.4.3. Método 2 - Autoclave . . . . .	26
7.4.4. Método 3 - Conversión a Matriz Acelular . . . . .	27
7.5. Control microbiológico . . . . .	27
7.6. Almacenamiento a largo plazo . . . . .	27
7.7. Histología . . . . .	28
<b>8. Resultados</b>	<b>31</b>
8.1. Piel de tilapia sin esterilización (control) . . . . .	31
8.1.1. Prueba microbiológica . . . . .	31
8.1.2. Evaluación estereoscópica . . . . .	33
8.1.3. Histología . . . . .	34
8.2. Piel de tilapia con Etanol 70% . . . . .	35
8.2.1. Prueba microbiológica . . . . .	36
8.2.2. Evaluación estereoscópica . . . . .	40
8.2.3. Histología . . . . .	41
8.3. Piel de tilapia esterilizada con Autoclave . . . . .	42
8.3.1. Prueba microbiológica . . . . .	43
8.3.2. Evaluación estereoscópica . . . . .	45
8.3.3. Histología . . . . .	46
8.4. Matriz acelular de piel de tilapia . . . . .	47
8.4.1. Prueba microbiológica . . . . .	48
8.4.2. Evaluación estereoscópica . . . . .	50
8.4.3. Histología . . . . .	51
<b>9. Discusión</b>	<b>53</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>11. Recomendaciones</b>	<b>58</b>
<b>12. Bibliografía</b>	<b>59</b>

---

## Lista de figuras

---

1.	Tipos de quemaduras según gravedad [32]. Quemaduras de primer grado: Sólo se ve afectada la superficie de la epidermis; Quemaduras de segundo grado: Lesiones más profundas y causan ampollas; Quemaduras de tercer grado: Quemaduras que afectan todas las capas de la piel; Quemaduras cuarto grado: Las quemaduras se extienden hasta el músculo y hueso. . . . .	10
2.	Tratamientos para quemaduras. A. Enfriado con agua fría [36]. B. Cubrimiento con vendajes limpios y secos [37]. C. Injerto de piel [38]. D. Apósito biosintético [39]. E. Xenoinjerto a base de piel de tilapia [40]. . . . .	11
3.	Usos potenciales de productos de Xenotransplantes de cerdos para humanos. Piel de cerdo para quemaduras, riñón de cerdo para insuficiencia renal e islotes pancreáticos de cerdo para diabetes [42]. . . . .	15
4.	A. Tilapia de Nilo [43]. B. Piel de tilapia de Nilo para utilizar como Xenoinjerto [44]. . . . .	16
5.	Autoclave RATPA de carga frontal de sobremesa sin secado [46]. . . . .	17
6.	Curva de ciclo de temperatura típica de un autoclave. Variación de temperatura con un ciclo de 134°C [48]. . . . .	18
7.	Liofilizador de sobremesa para investigación básica LyoQuest [51]. . . . .	19
8.	Evaluación histológica e histoquímica de piel de tilapia tratado con solución salina. A y B. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina. C. Secciones teñidas con rojo Sirius para colágeno. D. Imagen negativa para C utilizando segmentación de color CMEIAS. Escala en A = 100 µm y B-D = 50 µm [11].	21
9.	Descripciones bacteriológicas de la morfología colonial: tamaño, márgenes, elevaciones y formas [58]. . . . .	22
10.	Proceso para la fabricación de medios de cultivo en placas petri. . . . .	25
11.	Procedimiento de fijación, deshidratación y embebido en parafina. A. Cortes de muestras de matriz acelular antes de proceso de fijación. B. Proceso de deshidratación de las muestras sumergidas en alcohol etílico 100%. C. Muestras de cada método de esterilización después del embebido en parafina. . . . .	28
12.	Embebido en parafina de las muestras. A. Colocación de las muestras en casetes con parafina. B. Resultado final de embebido en parafina de las muestras antes de alcanzar temperatura ambiente. . . . .	29

13. Cortes de las muestras y colocación en portaobjetos. A. Corte de la muestra en parafina. B. Colocación de la muestra cortada en baño de agua. C. Portaobjetos en plancha a 60°C. . . . .	29
14. Procedimiento de tinción Hematoxilina & Eosina. A. Mesa de trabajo con todas las soluciones a utilizar. B. Muestras colocadas en recipiente para trasladados entre soluciones. C. Muestras finales después de colocar cubreobjetos. . . . .	30
15. Resultados placas petri control. A y B. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. C. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. D. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. E. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count. . . . .	32
16. Bacterias de placas petri control observadas en estereoscopio. A. Bacterias observadas en Agar sangre de carnero 5%. B. Bacterias observadas en Agar MacConkey. C y D. Bacterias observadas en Agar Chromocult. E. Bacterias observadas en Agar Plate Count. . . . .	33
17. Estereoscopía de muestra de control. A. Lado frontal de la muestra. B. Lado posterior de la muestra . . . . .	34
18. Histología de piel de tilapia sin esterilizar. A. Sección de muestra de control con corte de 10 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x100. B. Sección de muestra de control con corte de 10 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x40. C. Sección de muestra de control con corte de 5 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x100. D. Sección de muestra de control con corte de 5 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x100. . . . .	35
19. Resultados de procedimiento método 1 de esterilización. A. Pieles enteras antes de cortes. B. Piel cortada. C. Piel remojada con solución de etanol 70%. D. Piel cerrada el vacío. . . . .	36
20. Resultados placas petri método 1. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count. . . . .	37
21. Resultados placas petri de método 1 después de 1 semana. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count. . . . .	38
22. Bacteria de placa petri Agar sangre de carnero 5% observada en estereoscopio después de 1 semana de esterilización. . . . .	39
23. Resultados placas petri de método 1 después de 1 mes. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count. . . . .	40
24. Estereoscopía de muestras de método 1. A. Lado frontal de la muestra 1 método 1. B. Lado posterior de la muestra 1 método 1. C. Lado frontal de la muestra 2 método 1. D. Lado posterior de la muestra 2 método 1. . . . .	41

25.	Histología de piel de tilapia esterilizada con Etanol 70 %. A. Sección de muestra de método 1 con corte de 15 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x100. B. Sección de muestra de método 1 con corte de 10 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x40. C. Sección de muestra de método 1 con corte de 7 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x40. D. Sección de muestra de método 1 con corte de 7 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x40.	42
26.	Resultados de procedimiento método 1 de esterilización. A. Piel enteras antes de cortes. B. Piel cortada. C. Piel en placa petri de vidrio envuelta con papel craft antes de autoclave. D. Piel después de esterilización con autoclave. E. Piel sellada al vacío.	42
27.	Resultados placas petri de método 2. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5 %. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.	43
28.	Resultados placas petri de método 2 después de 1 semana. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5 %. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.	44
29.	Resultados placas petri de método 2 después de 1 mes. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5 %. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.	45
30.	Estereoscopía de muestras de método 2. A. Lado frontal de la muestra 1 método 2. B. Lado posterior de la muestra 1 método 2. C. Lado frontal de la muestra 2 método 2. D. Lado posterior de la muestra 2 método 2.	46
31.	Histología de piel de tilapia esterilizada con Autoclave. A. Sección de muestra de método 2 con corte de 15 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x100. B. Sección de muestra de método 2 con corte de 15 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x100.	47
32.	Resultados de procedimiento método 3 de esterilización. A. Piel enteras antes de cortes. B. Piel cortada remojada en solución de bicarbonato. C. Piel remojada en solución de NaOH. D. Piel remojada en solución Buffer. E. Piel remojada en solución NaCl. F Piel remojada por segunda vez en solución de NaOH. G. Piel remojada en último lavado de Buffer. H. Piel sellada al vacío después de remojar en agua oxigenada.	47
33.	Resultados placas petri de método 3. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5 %. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.	48
34.	Resultados placas petri de método 3 después de 1 semana. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5 %. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.	49
35.	Resultados placas petri de método 3 después de 1 mes. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5 %. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.	50

36.	Estereoscopía de muestras de método 3. A. Lado frontal de la muestra 1 método 3. B. Lado posterior de la muestra 1 método 3. C. Lado frontal de la muestra 2 método 3. D. Lado posterior de la muestra 2 método 3.	51
37.	Histología de piel de tilapia como matriz acelular. A. Sección de muestra de método 3 con corte de 5 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x100. B. Sección de muestra de método 3 con corte de 5 $\mu\text{m}$ observada con magnificación de x100.	52

---

Lista de cuadros

---

1. Tabla comparativa de los principales tipos de apósitos, indicando su uso, ventajas y desventajas 41.	14
2. Tabla de medios de cultivo para control microbiológico	25
3. Tabla de distribución de muestras	26

En los últimos años las quemaduras de segundo y tercer grado han sido una de las principales causas de muertes en países de ingresos bajos y medianos. Se necesitan injertos de piel para ser tratadas correctamente, donde las principales soluciones se basan en autoinjertos (piel del mismo paciente) y aloinjertos (piel de un donante). Sin embargo, en la actualidad existen alternativas a estas soluciones debido a la escasez de piel humana disponible en hospitales públicos o bien el alto costo de producción de piel artificial. Una de las alternativas a estos métodos convencionales son los xenoinjertos, provenientes de otra especie, como método adecuado para facilitar la curación de heridas. Los xenoinjertos no reemplazan la piel dañada, pero sí ayudan a mantener hidratada y libre de contaminantes al área afectada para facilitar el proceso de curación y prevenir infecciones. Varias investigaciones han evaluado los beneficios de utilizar pieles de tilapia como apósitos biológicos para este tratamiento debido a su alto contenido de colágeno y la biocompatibilidad.

Durante el proyecto se estableció y ejecutó un protocolo de obtención, preparación y esterilización de pieles de tilapia para el desarrollo de apósitos esterilizados. Estos apósitos fueron evaluados mediante pruebas microbiológicas para verificar la esterilidad y cumplir con estándares de biocompatibilidad para ser aplicados en el futuro en heridas y quemaduras. También se evaluó la estabilidad después de una semana de esterilizados, y la influencia negativa de los procesos de esterilización en los apósitos. Por último, se realizó una evaluación histológica de las muestras con el fin de identificar presencia de fibras de colágeno y alteraciones en la muestra. Estos procesos se valoraron por medio de comparación de las características entre grupos de control y pieles esterilizadas para verificar las diferencias biológicas.

In recent years, second and third degree burns have been one of the main causes of death in low- and middle-income countries. Skin grafts are needed to be treated correctly, where the main solutions are based on autografts (skin from the same patient) and allografts (skin from a donor). However, there are currently alternatives to these solutions due to the shortage of human skin available in public hospitals or the high cost of producing artificial skin. One of the alternatives to these conventional methods are xenografts, coming from another species, as an appropriate method to facilitate wound healing. Xenografts do not replace damaged skin, but they do help keep the affected area hydrated and free of contaminants to facilitate the healing process and prevent infections. Several investigations have evaluated the benefits of using tilapia skins as biological dressings for this treatment due to their high collagen content and biocompatibility.

During the project, a protocol for obtaining, preparing and sterilizing tilapia skins was established and executed for the development of sterile dressings. These dressings were evaluated through microbiological tests to verify sterility and meet biocompatibility standards to be applied in the future to wounds and burns. Stability after a week of sterilization, and the negative influence of sterilization processes on the dressings, were also evaluated. Finally, a histological evaluation of the samples was carried out in order to identify the presence of collagen fibers and alterations in the sample. These processes were assessed by comparing the characteristics between control groups and sterilized skins to verify biological differences.

Los apósitos son un producto sanitario utilizado para cubrir y proteger una herida. Su principal función es proporcionar alivio del dolor, actuar como barrera de una infección, absorber el exudado que se produce y permitir una adecuada circulación sanguínea para optimizar el proceso de cicatrización [1]. Uno de los avances de los apósitos es el uso de pieles de animales como xenoinjertos para satisfacer la escasez de trasplantes de pieles, además de ser una alternativa económica y eficiente. Las pieles de tilapia han sido objeto de estudio en los últimos años gracias a sus propiedades beneficiosas como el colágeno y su biocompatibilidad en el tratamiento de diferentes tipos de quemaduras.

El presente trabajo plantea desarrollar apósitos estériles a base de piel de tilapia utilizando diferentes métodos para comparar sus propiedades, ventajas y desventajas de cada uno. Para la realización de este proyecto se utilizaron pieles de tilapia cortadas en forma de apósitos para realizar diferentes métodos de esterilización e identificar las propiedades que presenta cada uno en pruebas microbiológicas, donde se busca minimizar la cantidad posibles bacterias presentes después de cada método de esterilización. También se lleva a cabo un método control para comparar los resultados microbiológicos de muestras estériles y sus propiedades utilizando un estereoscopio.

Con la obtención de los apósitos estériles a base de piel de tilapia, se busca generar un aporte en la comunidad científica de Guatemala para el desarrollo de nuevos métodos de tratamientos de quemaduras, así como también un aporte a la ingeniería de tejidos en el país. Se busca identificar cuáles de los métodos utilizados es el más eficiente y con mejores propiedades para validar su esterilización y asegurar una biocompatibilidad de los mismos, así como también validar la degradación estructural mediante un análisis histológico de cada método después de ser sometido cada proceso de esterilización, a corto y largo plazo.

En los primeros 5 capítulos de este trabajo se presenta la motivación, necesidad e importancia de la realización de este trabajo, así como también una explicación de los objetivos planteados. En el capítulo 6 se detallan las bases teóricas y conceptuales que se tuvieron en cuenta para llevar a cabo la metodología del trabajo. En el capítulo 7 y 8 se presenta la metodología empleada, así como también los resultados finales obtenidos. Por último, se

presentan las conclusiones del trabajo y se indican algunas recomendaciones para trabajos futuros de esta línea de investigación.

Un xenoinjerto o xenotrasplante es un trasplante de tejido u órgano de una especie animal a otra [2][3]. Los xenoinjertos han encontrado utilidad en trasplantes de órganos como corazones, hígado, riñones; trasplante de células dañadas o destruidas y trasplantes de tejidos como injertos de piel, trasplantes de córnea o trasplantes óseos [4]. Los xenoinjertos/trasplantes es una solución práctica y se utiliza cuando no hay tejidos autólogos o heterólogos disponibles para realizar un trasplante, aumentando así la disponibilidad de injertos para trasplantes y disminuyendo los tiempos de espera [5]. Además de esto, los xenoinjertos han demostrado ser muy útiles como herramienta terapéutica para el tratamiento de quemaduras de segundo y tercer grado donde son aplicados como apósitos externos [6]. Entre ellos se destacan xenoinjertos obtenidos de pieles de peces, particularmente la Tilapia por su alto contenido de colágeno tipo I y xenoinjertos de piel porcina por su buena adherencia a heridas y granulación rápida [7].

Usualmente este tipo de quemaduras requieren un injerto de piel los cuales pueden tomar varios días. Durante la espera se debe recubrir la herida con un vendaje que proteja de microbios, reduzca el riesgo de infección y absorba cualquier líquido que se filtre de la herida [8]. Típicamente se utilizan apósitos modernos a base de películas semipermeables o hidrogeles, también apósitos bioactivos, medicados, compuestos y de plata. Todas estas terapias son costosas o requieren drogas con posibles efectos adversos [9]. Los xenoinjertos por otro lado son una solución más accesible y viable para este tratamiento debido a que se pueden obtener componentes como colágeno tipo I favoreciendo una buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja inmunogenicidad [10].

Los apósitos al igual que los xenoinjertos son diseñados con diferentes propósitos según la gravedad de la herida, cantidad de exudado y su localización [1]. El procesamiento de esterilización de los xenoinjertos antes de su utilización en un paciente puede realizarse de distintas formas, las más comunes son por irradiación, esterilización química o con gas de óxido de etileno. Sin embargo, el óxido de etileno puede generar reacciones nocivas para la salud del paciente, mientras que la irradiación puede generar desperfectos en la estructura de matrices de piel [11].

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y actúa como la primera línea de la defensa, protegiendo el cuerpo del medio ambiente y de factores externos como bacterias y virus o sustancias químicas [12] [13]. La piel se conforma por 3 capas: la epidermis, como barrera impermeable expuesta directamente al ambiente; la dermis, donde se encuentra tejido conectivo, folículos pilosos, vasos sanguíneos y linfáticos; y la hipodermis o tejido subcutáneo, donde se almacena grasa y se separa de los órganos internos [14]. Existen diversas lesiones que pueden dañar esta capa protectora como cortaduras, raspones, abrasiones y quemaduras, cuando esto sucede, se crean heridas donde la sangre y los fluidos intersticiales del cuerpo quedan expuestos ocasionando que la herida sea propensa a infecciones y provocando una respuesta inmune para contrarrestar esto. Dentro de estas heridas, las quemaduras se encuentran entre las más frecuentes y pueden clasificarse según su gravedad como quemaduras de primer, segundo, tercer y cuarto grado. Por un lado, las quemaduras de segundo grado (espesor parcial) dañan la epidermis y dermis de la piel, mientras que las quemaduras de tercer grado (espesor total) destruyen completamente ambas capas y además puede dañar el tejido subcutáneo [15].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2018 las quemaduras provocaron alrededor de 180,000 muertes anuales donde la mayoría de las muertes se produce en países de ingreso bajo y mediano [16]. Además de esto, diferentes estudios epidemiológicos demuestran que generalmente en los accidentes prevalecen más las quemaduras de segundo grado y tercer grado, donde las causas más frecuentes son quemaduras con agua e incendios de gas y eléctricos [17] [18]. Este tipo de quemaduras, al ser más profundas, conllevan a tiempos de curación prolongados y son más propensas a infecciones si no son tratadas adecuadamente. En Guatemala la mayoría de los casos de traumas por quemaduras se deben a quemaduras de segundo grado con más de un 97 %, seguido de un 2 % de quemaduras de tercer grado [19]. Durante el año 2021 se aumentaron en un 20 % las quemaduras pediátricas en el Hospital Roosevelt. Y cada año en el país se registran más de 50 mil niños que resultan con quemaduras, donde un 10 % requiere de atención médica [20] [21]

Actualmente existen diversos métodos para tratar las heridas y quemaduras, los cuales

consisten en el hisopado en busca de infección, limpieza, vendaje y en ciertos casos desbridamiento de la herida. El uso de vendajes o apósitos busca aislar las heridas del medio ambiente, con el fin de prevenir la contaminación y posible infección. Además de esto, al vendar las heridas, dependiendo del material del vendaje, se puede aumentar la humedad en el área afectada, e incluso proveer con nutrientes, antibióticos, antiinflamatorios o factores de crecimiento. Algunos de los vendajes típicos son los injertos de espesor parcial lo cual implica extraer fascia de espesor completo de un sitio donante e injertarla; queratinocitos donantes, apósitos de diferentes composiciones como ácido hialurónico, materiales biosintéticos o a base de quitosano [22]. Si bien el uso temprano de muchos procedimientos quirúrgicos y tratamientos de quemaduras han mejorado la tasa de supervivencia, también resulta en un alto gasto sobre todo en países en vías de desarrollo. Se estima que los costos totales de atención hospitalaria por quemaduras oscilan entre US\$24.23 y US\$4.125,50 por día, indicando costos altos y discrepancias entre países [23].

Una de las terapias convencionales que se utiliza en los casos más graves como las quemaduras de segundo y tercer grado son los injertos de piel, principalmente por tratarse de heridas grandes y profundas que no pueden sanar por sí mismas. Para llevar a cabo este tipo de terapia es necesario extraer quirúrgicamente un parche cutáneo de un área del cuerpo y trasplantar si se trata de un autoinjerto, o bien conseguir un donante para el trasplante (aloinjerto). El uso de injertos, de ser exitoso, puede acelerar el proceso de curación y reducir la cicatrización, pero presenta varios riesgos como la pigmentación de la piel y contracción del injerto de piel, principalmente en injertos delgados, también posibles riesgos de pérdida por infección [24].

En la actualidad existen alternativas a los autoinjertos y aloinjertos de piel debido principalmente a la escasez de piel humana disponible en hospitales públicos o su alto costo de producción [7]. Los xenoinjertos son un tipo de injerto de una especie animal a otra y se realiza utilizando animales cercanos genéticamente a los seres humanos donde su principal beneficio es la facilidad de obtención de recursos para sus aplicaciones. Dependiendo del área a tratar se han encontrado distintas especies adecuadas para la realización de xenoinjertos, como las válvulas cardíacas [25], o hígados provenientes de cerdos [26]. En el caso de las quemaduras artificiales, se ha evaluado la posibilidad de utilizar piel animal como reemplazo a la piel dañada, o como apósito para la facilitación de la curación endógena de la herida. Dentro de las especies animales más compatibles para el desarrollo de apósitos biológicos se ha identificado a la tilapia por su alto contenido de colágeno, microbióticos no infecciosos y similitud con el tejido humano [27].

La tilapia es uno de los peces más cultivados en el mundo y también de más fácil reproducción, representando una cosecha mundial de 4.3 millones de toneladas en 2010 y un incremento pronosticado de 7.3 millones de toneladas para 2030 [28]. Varios estudios sobre las propiedades de la piel de tilapia indican que el colágeno que contiene puede promover rápida y eficazmente la cicatrización de heridas de espesor total [29], así como también se ha comprobado que péptidos de colágeno marino extraídos de este pez promueven cicatrización de quemaduras de segundo grado [30]. Por último, una variedad de estudios evidencia que los materiales a base de pieles de pescado con altas cantidades de colágeno tienen una alta biodegradabilidad [10].

El uso de xenoinjertos a base de piel de tilapia presenta una alternativa económica en comparación con algunos métodos estándar para el cuidado de heridas, ya que en muchos

países la piel de este animal es un desecho biológico. Reutilizar las pieles de tilapia como xenoinjertos representa también una alternativa positiva para el medio ambiente.

### 4.1. Objetivos generales

Desarrollar apósitos a base de piel de tilapia mediante la implementación de métodos de matriz acelular, desinfección con etanol y esterilización con autoclave, y caracterizar sus propiedades biológicas.

### 4.2. Objetivos específicos

- Establecer el protocolo de obtención, preparación, desinfección y esterilización de las pieles de tilapia para desarrollar apósitos.
- Identificar y validar diversos métodos de esterilización y desinfección de las pieles de tilapia para asegurar la biocompatibilidad.
- Realizar pruebas de biocompatibilidad, esterilidad e histología para verificar las características biológicas de los apósitos.
- Validar la degradación de las pieles de tilapia antes del proceso de esterilización o desinfección y posteriormente como apósitos esterilizados o desinfectados.

Este proyecto consiste en el desarrollo de diferentes apósitos estériles a base de piel de tilapia, de lo que se espera profundizar mucho más con diferentes métodos y comparar los cambios de las pieles cuando son sometidos a cada uno, así como también verificar la viabilidad de cada proceso a través del tiempo después de su esterilización.

Las pruebas que se realizan constan de análisis microbiológico, análisis de biocompatibilidad y análisis histológico, sin embargo, es importante mencionar que no son los únicos procesos en los cuales se puede valorar la viabilidad de apósitos para quemaduras.

Los métodos sirven para verificar características generales de cada piel y servir como base para un análisis más profundo sobre el tema, en el que se pueden incluir más estudios con células y biocompatibilidad. Posteriormente pueden incluirse estudios en los que se prueben los apósitos más sobresalientes en un estudio in vivo, para identificar los pros y contras de utilizar los apósitos.

## 6.1. Quemaduras

Las quemaduras son daños en los tejidos ocasionados por calor, electricidad, químicos, luz solar o radiación nuclear. Estas pueden clasificarse como de primer, segundo, tercer o cuarto grado, dependiendo de la gravedad que penetre la superficie de la piel [31] [1]

### 6.1.1. Tipos de quemaduras

#### Quemaduras de primer grado (superficiales)

Afectan únicamente la epidermis. El sitio de la quemadura es rojo, seco, sin ampollas y doloroso. Estas quemaduras suelen sanar por sí solas y son frecuentemente ocasionadas por el sol.

#### Quemaduras de segundo grado (espesor parcial)

Involucra la epidermis y dermis de la piel. El sitio de la quemadura es rojo, con ampollas, puede estar inflamado y ser doloroso. Es posible que estas quemaduras necesiten injertos de piel y pueden dejar cicatrices.

#### Quemaduras de tercer grado (espesor total)

Destruyen completamente la epidermis y la dermis de la piel, también pueden dañar tejido subcutáneo. El sitio de la quemadura puede verse blanca o carbonizada y la zona afectada pierde la sensibilidad. Estas quemaduras necesitan injertos de piel.

## Quemaduras de cuarto grado

Estas quemaduras dañan huesos, músculos y tendones subyacentes. No hay sensación en la zona ya que se destruyen las terminales nerviosas [15].

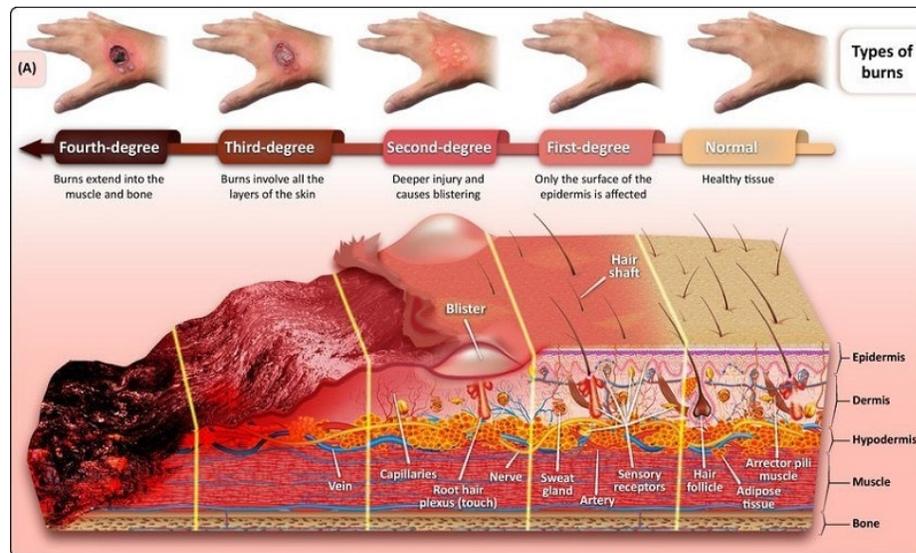


Figura 1: Tipos de quemaduras según gravedad [32]. Quemaduras de primer grado: Sólo se ve afectada la superficie de la epidermis; Quemaduras de segundo grado: Lesiones más profundas y causan ampollas; Quemaduras de tercer grado: Quemaduras que afectan todas las capas de la piel; Quemaduras cuarto grado: Las quemaduras se extienden hasta el músculo y hueso.

### 6.1.2. Prevalencia

Las quemaduras constituyen un problema de salud pública a nivel mundial y provocan alrededor de 180,000 muertes al año, donde la mayoría se produce en países con ingreso bajo y mediano, y casi dos tercios en regiones de África y Asia Sudoriental de la OMS. En muchos países con ingreso alto, las tasas de muertes por quemaduras han disminuido y las tasas de mortalidad infantil es actualmente 7 veces más elevada en los países de ingreso bajo y mediano debido a la escasez de recursos sanitarios y faltas de higiene en el tratamiento. Las quemaduras no fatales son algunas de las principales causas de morbilidad, que incluyen la hospitalización prolongada, desfiguración y discapacidad, lo que suele generar estigmatización y rechazo [16].

### 6.1.3. Riesgos y complicaciones

Los procesos de cicatrización por heridas ocasionadas por quemaduras pueden presentar diferentes complicaciones. Los pacientes quemados, principalmente con lesiones extensas y profundas están predispuestos a complicaciones sépticas las cuales pueden aumentar el costo, duración del tratamiento y la mortalidad. Además, una infección bacteriana no solo ocasiona

cambios directamente en la herida, también suceden infecciones sistémicas como neumonía, infecciones del tracto urinario y/o torrente sanguíneo, bacteriemia y sepsis. Por otro lado, las alteraciones musculoesqueléticas son otra de las complicaciones que se presenta en pacientes con quemaduras. Entre estos problemas se encuentran contracturas, pérdida ósea, osificación heterótrofa, escoliosis, cifosis y artritis séptica [33].

También pueden presentarse complicaciones como la hipovolemia debido a la consecuencia de pérdida de líquidos en quemaduras profundas o afectación de grandes zonas de la superficie corporal. Otra complicación son las alteraciones metabólicas y pueden incluir hipalbuminemia por la hemodilución (secundaria a la reposición de líquidos) y pérdida de proteínas hacia el espacio extravascular a través de los capilares dañados [34].

#### 6.1.4. Tratamientos y terapias convencionales

El cuidado de pacientes quemados requiere de experiencia y su tratamiento se basa principalmente en la profundidad de la lesión. Para quemaduras graves, después de primeros auxilios apropiados y una evaluación de la herida, el tratamiento puede implicar medicamentos, vendajes de heridas, terapia y cirugía. Esto con el fin de controlar el dolor, extraer el tejido muerto, prevenir la infección, reducir la posibilidad de formar cicatrices y recuperar el funcionamiento. Después de que hayas recibido primeros auxilios por una quemadura importante, es posible que tu atención médica incluya medicamentos y productos destinados a promover la cicatrización. Algunos de los tratamientos habituales son los tratamientos mínimamente invasivos a base de agua, líquidos por vía intravenosa para prevenir la deshidratación, medicamentos para dolor y ansiedad, apósitos o medicamentos para evitar una posible infección. También es posible que se necesiten otros tratamientos tópicos más invasivos como pomadas antimicrobianas, vendajes que incorporan plata, vendajes biosintéticos, injertos y xenoinjertos [35].

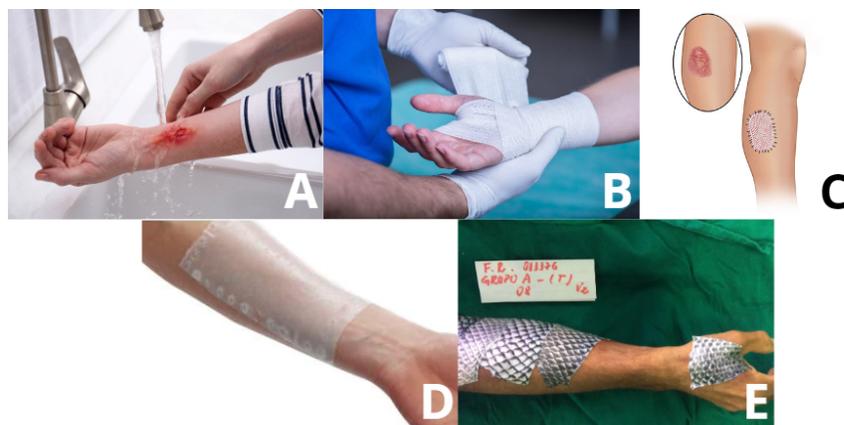


Figura 2: Tratamientos para quemaduras. A. Enfriado con agua fría [36]. B. Cubrimiento con vendajes limpios y secos [37]. C. Injerto de piel [38]. D. Apósito biosintético [39]. E. Xenoinjerto a base de piel de tilapia [40].

### **6.1.5. Apósitos**

#### **Vendaje tradicional para heridas**

Entre ellos se encuentran gasas, pelusas, vendajes (naturales o sintéticos) y algodón, se secan y se utilizan como apósitos primarios o secundarios para proteger la herida de contaminaciones.

#### **Vendaje moderno para heridas**

Estos apósitos facilitan la función de la herida hidratandola y promoviendo la cicatrización. Generalmente están basados en sintéticos y pueden clasificarse como productos pasivos, interactivos y bioactivos.

Apósitos de película semipermeable: Están compuestos de poliuretano transparente y adherente permitiendo la transmisión de vapor de agua,  $O_2$  y  $CO_2$  de la herida, también proporciona un desbridamiento autolítico de úlceras y es impermeable a las bacterias.

Apósitos de espuma semipermeable: Están hechos a base de espuma hidrofóbica e hidrofílica con bordes adhesivos. Las propiedades hidrófobas de la capa exterior protege del líquido, permiten el intercambio gaseoso y el vapor de agua. La espuma tiene capacidad de absorber cantidades variables de drenaje de heridas dependiendo del grosor de esta.

Apósitos de hidrogeles: Materiales hidrofílicos insolubles hechos de polímeros sintéticos. El alto contenido de agua de los hidrogeles (70-90%) beneficia a los tejidos de granulación y al epitelio en un ambiente húmedo.

Apósitos de hidrocoloide: Es un apósito interactivo y consta de dos capas, una coloidal interna y una capa externa impermeable al agua. Son permeables al vapor de agua, pero impermeables a las bacterias y tienen propiedades de desbridamiento y absorción de exudados de heridas.

Apósitos de alginato: Están hechos de sales de sodio y calcio que comprenden unidades de ácido manurónico y gularónico. La capacidad de absorción se logra con la formación de un gel hidrofílico que limita los exudados de la herida y minimiza la contaminación bacteriana.

#### **Apósitos bioactivos para heridas**

Son producidos a partir de biomateriales y tienen características como biocompatibilidad, biodegradabilidad, naturaleza no tóxica. Se derivan generalmente de tejidos naturales o fuentes artificiales como colágeno, ácido hialurónico, quitosano, alginato y elastina.

#### **Sustitutos de piel diseñados por tejido**

Existen dos sustitutos de piel humana o equivalente dérmico, uno imita la capa de la piel compuesta de queratinocitos y fibroblastos en matriz de colágeno (contiene células). El

segundo contiene sólo elementos dérmicos con fibroblastos en matriz de colágeno (matriz acelular). El principal mecanismo de estos apósitos es secretar y estimular el factor de crecimiento de la herida mediante el cual se logra la epitelización.

### **Apósitos medicados**

Incorporan fármacos que ejecutan un papel importante en el proceso de curación directa o indirecta mediante la eliminación de tejidos necróticos. Algunos compuestos incorporados en estos apósitos incluyen antimicrobianos, factores de crecimiento y enzimas.

### **Apósitos compuestos**

Poseen múltiples capas y cada capa es fisiológicamente distinta. Una capa externa que protege la herida de la infección, una capa intermedia compuesta por un material absorbente que mantiene la humedad ambiental y apoya en el desbridamiento autolítico y una capa inferior compuesta por material no adherente que evita que se adhiera a tejidos de granulación 41.

Tipo	Uso	Ventajas	Desventajas
Vendaje tradicional para heridas	Heridas limpias y secas con niveles de exudado leve.	Protección contra posibles contaminaciones; prácticos y económicos.	Requieren cambios frecuentes; posible dolor al retirarlos; no proporciona ambiente húmedo.
Vendaje moderno para heridas	Evitar que la herida se deshidrate y promover cicatrización.	Pueden ser pasivos, interactivos o bioactivos; prácticos y económicos; pueden ser elásticos y flexibles.	Vendajes de espuma no es adecuado para heridas con poco exudado o secas; vendajes con hidrogeles posible acumulación de exudado.
Apósitos bioactivos para heridas	Heridas crónicas, quemaduras o heridas infectadas.	Buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y naturaleza no tóxica; pueden incorporarse con factores de crecimiento y antimicrobianos.	Su costo es mayor comparado a los vendajes tradicionales; posibles reacciones alérgicas; cambio frecuente.
Sustitutos de piel diseñados por tejido	Úlcera de pie diabético y úlcera venosa de pierna, quemaduras o pérdida de piel por enfermedades dermatológicas.	Secretan y estimulan el factor de crecimiento de la herida; pueden incluir factores de crecimiento y citocinas.	Altos costos; disponibilidad limitada si es aloinjerto; posibles reacciones adversas.
Apósitos medicados	Heridas crónicas, úlceras de piel o heridas infectadas.	Eliminación de tejidos necróticos; previenen infecciones y favorecen la regeneración tisular.	El uso prolongado puede provocar irritaciones o manchas en la piel; posibles reacciones alérgicas; mayores costos que apósitos convencionales.
Apósitos compuestos	Heridas de espesor parcial y total.	Protege de infecciones.	Son más costosos; poseen menos flexibilidad.

Cuadro 1: Tabla comparativa de los principales tipos de apósitos, indicando su uso, ventajas y desventajas [41].

## 6.2. Xenoinjertos

Un xenoinjerto es un trasplante de tejido u órgano de una especie animal a otra. En la medicina se utiliza este tipo de injerto para sustituir tejidos u órganos dañados o enfermos en humanos, y se realiza utilizando tejidos u órganos de animales cercanos genéticamente a los seres humanos. Los xenoinjertos se utilizan en ocasiones cuando no hay tejidos u órganos humanos disponibles para un trasplante o cuando los pacientes tienen una mayor posibilidad de supervivencia con un xenoinjerto en lugar de esperar un trasplante de tejido humano [2].

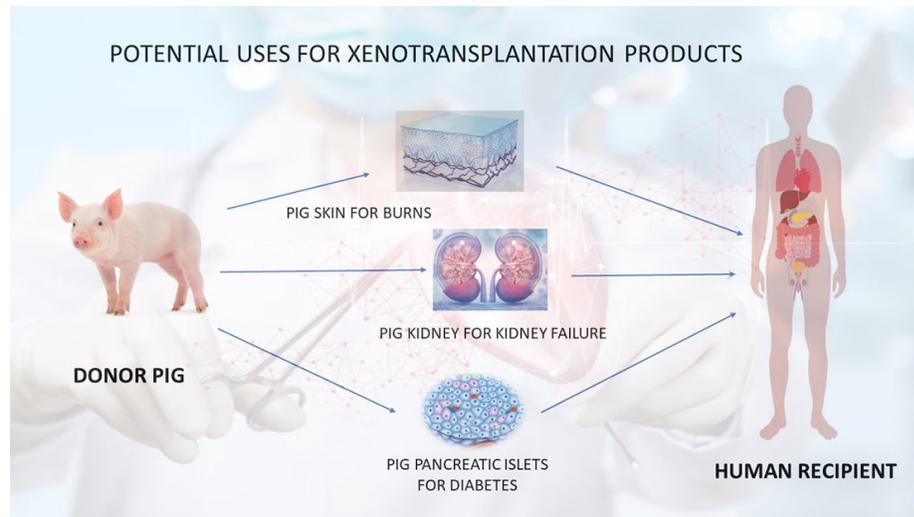


Figura 3: Usos potenciales de productos de Xenotransplantes de cerdos para humanos. Piel de cerdo para quemaduras, riñón de cerdo para insuficiencia renal e islotes pancreáticos de cerdo para diabetes [42].

### 6.2.1. Beneficios de piel de tilapia como Xenoinjerto

Además de la piel porcina, en la actualidad se han descubierto nuevas posibilidades de xenoinjertos tomando en cuenta la efectividad de estos. Entre ellos puede mencionarse la piel de tilapia, la piel de este animal tiene una estructura celular que presenta células de Malpighi, células caliciformes y otros tipos de células que pueden variar dependiendo de la especie. Además, cuentan con una membrana basal que separa la epidermis (contiene vasos sanguíneos, nervios, escamas, células pigmentarias) y tejido adiposo formado por una subcapa compacta o esponjosa y una subcapa gruesa compuesta por una matriz de colágeno. Esta matriz de colágeno contiene aminoácidos entre los que se encuentra la lisina, triptófano, histidina, fenilalanina, leucina, isoleucina, treonina, metionina, cisteína y valina. Otro de los aspectos importantes cuando se habla de morfología de la piel de tilapia es su similitud con la piel humana ya que tiene una dermis profunda con fibras de colágeno bien organizadas en disposición paralela/horizontal y transversal [7].

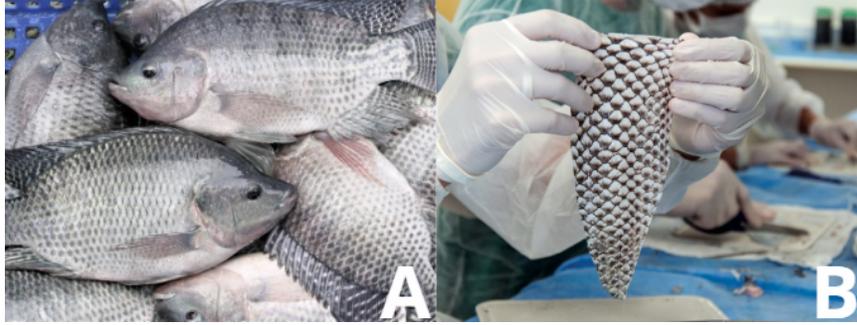


Figura 4: A. Tilapia de Nilo [43]. B. Piel de tilapia de Nilo para utilizar como Xenoinjerto [44].

### 6.2.2. ¿Cómo se obtienen?

Para el uso de pieles de tilapia como apósitos es necesario retirar únicamente las pieles y lavarlas únicamente y posibles residuos. Para una última limpieza se cortan las pieles en tamaños apropiados para el proceso de esterilización y se colocan en un baño de solución salina a bajas temperaturas ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente pueden realizarse diferentes procedimientos de esterilización entre los que se pueden mencionar métodos químicos y métodos radiológicos.

## 6.3. Procesos de esterilización

El proceso de esterilización se define como la eliminación o destrucción completa de todas las formas de vida microbiana que se lleva a cabo mediante diversos métodos físicos y químicos. Técnicamente se logra una reducción mayor o igual a  $10^6$  log unidades formadoras de colonias de las esporas más resistentes a la mitad de un ciclo regular [45].

### 6.3.1. Autoclaves

Un autoclave es un dispositivo de esterilización principalmente para instrumentación quirúrgica. El autoclave utiliza un principio básico de esterilización por vapor, en el que se expone el elemento a esterilizar al contacto directo con el vapor a la temperatura y presión requeridas durante el tiempo especificado. Existen cuatro parámetros fundamentales cuando se habla de esterilización por vapor: vapor, presión, temperatura y tiempo.



Figura 5: Autoclave RATPA de carga frontal de sobremesa sin secado [46].

El vapor ideal para una esterilización es vapor saturado seco y agua arrastrada, mientras que la presión en una autoclave es el medio con el que se obtienen altas temperaturas necesarias para eliminar rápidamente los microorganismos. También se deben obtener temperaturas específicas para una actividad microbicida, las temperaturas más utilizadas son  $121^{\circ}\text{C}$  ( $250^{\circ}\text{F}$ ) y  $132^{\circ}\text{C}$  ( $270^{\circ}\text{F}$ ), y deben mantenerse durante un tiempo mínimo para matar los microorganismos [47].

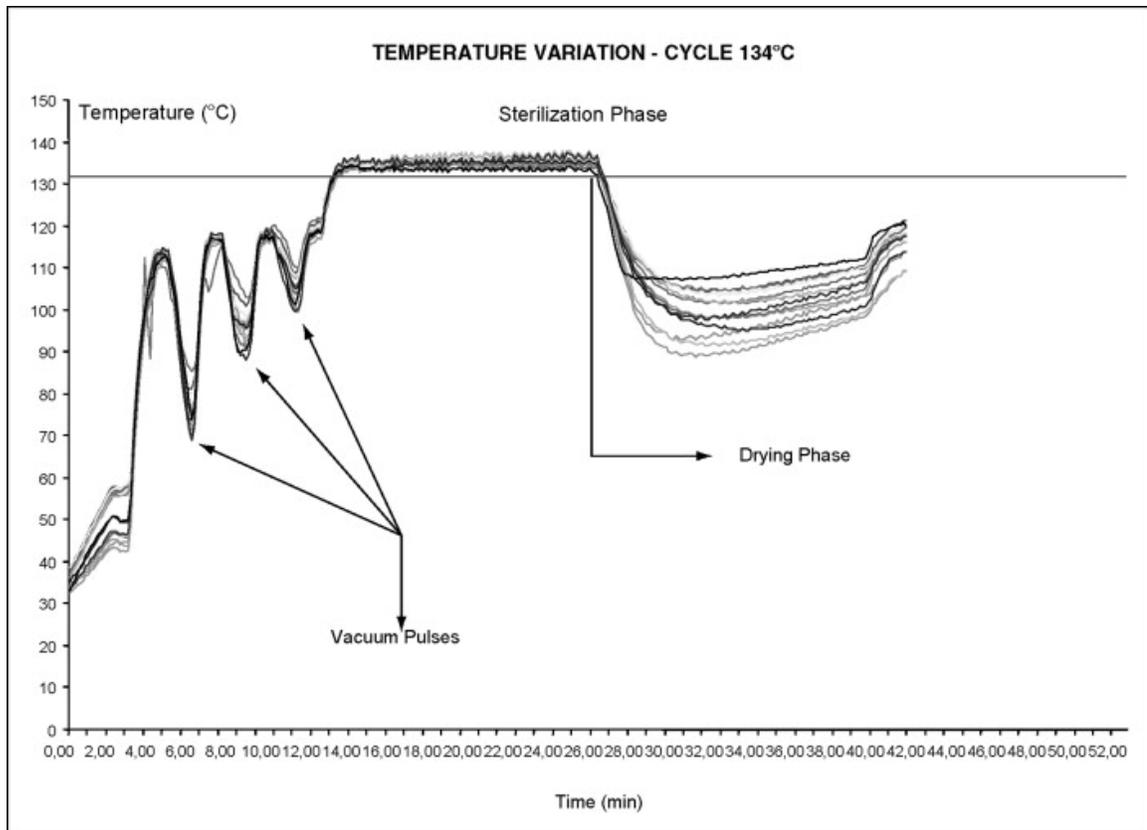


Figura 6: Curva de ciclo de temperatura típica de un autoclave. Variación de temperatura con un ciclo de 134°C [48].

La esterilización por vapor no es tóxica, es económica, rápidamente microbicida y esporicida. Pero al igual que algunos procesos de esterilización puede presentar efectos nocivos en ciertos materiales como corrosión y combustión, además, se considera un método de esterilización no viable para injertos de piel debido a que puede dañar la estructura del tejido y desnaturalizar posibles propiedades como el colágeno por alcanzar altas temperaturas [49].

### 6.3.2. Liofilización

La liofilización es un método de desecación y es especialmente adecuado para conservación de sustancias sensibles al calor, ya que se elimina el agua del producto después de congelarlo y colocarlo en vacío. El proceso de liofilización se divide en congelación (solidificación de la muestra), secado primario (eliminación de agua congelada) y secado secundario (extracción de agua descongelada).

Durante la congelación la temperatura de la muestra se reduce por debajo de su punto de congelación para solidificarla. La congelación de una solución de agua o cristalización en general consta de la nucleación y el crecimiento de núcleos a cristales macroscópicos. El segundo paso de la liofilización es el secado primario, en este proceso el agua congelada se sublima al vacío. La sublimación requiere de calor el cuál es proporcionado por radiación, conducción y convección, debe ser lo suficientemente alto para facilitar la sublimación. El

secado y almacenamiento secundario tiene como objetivo eliminar cualquier resto de agua no congelada que se encuentre en la muestra. Este proceso se puede realizar a temperaturas elevadas ya que el hielo se ha eliminado durante el secado primario y el riesgo de fusión es mínimo, sin embargo, en materiales amorfos es preferible elevar la temperatura con una rampa lenta para evitar un colapso [50].



Figura 7: Liofilizador de sobremesa para investigación básica LyoQuest [51].

El método de liofilización es una técnica que se ha utilizado para la conservación de injertos de tejido acelular para una mejor conservación y duración de almacenamiento. Esta técnica ofrece como resultados materiales estables que pueden esterilizarse aún más con irradiación física o ETO (Esterilización por Óxido de Etileno). Es importante mencionar que durante el proceso de liofilización puede producirse nucleación de cristales que pueden llegar a dañar la estructura de la muestra, por lo que los parámetros de temperatura y velocidad de enfriamiento deben ser monitoreados y optimizados adecuadamente [52].

### 6.3.3. Métodos químicos

Los métodos de esterilización química se basan principalmente en dos tipos, antisépticos y desinfectantes, ambos actúan destruyendo microorganismos o inhibiendo su crecimiento de forma no selectiva en una muestra. Un antiséptico es una sustancia química que se aplica tópicamente sobre un tejido para ejercer la acción, pueden utilizarse en profilaxis (control de propagación de bacterias), tratamiento de heridas y quemaduras para impedir la sepsis de tejidos lesionados, infecciones o cualquier exploración o manipulación que pueda alterar la barrera protectora de la piel.

Un desinfectante es una sustancia química que ejerce su acción de esterilización sobre las superficies y objetos inanimados alternándolos lo menos posible. Este proceso se lleva a cabo por medio de biocidas o germicidas, sustancias químicas cuyos mecanismos de acción y resistencia son similares a los antibióticos. Algunos de los biocidas utilizados frecuentemen-

te son el alcohol, clorhexidina, compuestos iodados, peróxido de hidrógeno y compuestos clorados [53].

También pueden utilizarse antisépticos como productos para desinfectar, pero con una menor concentración para no alterar células de los tejidos vivos. Para que un desinfectante pueda ser utilizado como antiséptico debe presentar características como no ser irradiante para el tejido, no presentar toxicidad de absorción sistémica y no debe inactivarse al estar en contacto con tejido orgánico [54].

#### 6.3.4. Métodos radiológicos

La esterilización por radiación ionizante se realiza utilizando rayos gamma de cobalto 60 o aceleradores de electrones, es un método de esterilización eficaz para eliminar microorganismos a baja temperatura, y ha sido utilizado en tejidos para trasplante, productos farmacéuticos y dispositivos médicos. Debido a los altos costos de esterilización no es una alternativa tan favorable en centros de atención médica, pero sí es adecuado para gran escala (Rutala, Weber, y HICPAC, 2008).

Anteriormente no existían procesos de esterilización por radiación ionizante aprobados por la FDA para su uso en centros de atención médica y únicamente se conocía por investigaciones. En el año 2023 la FDA anunció un programa piloto de archivo maestro de esterilización por radiación para empresas que esterilizan dispositivos aprobados por PMA de un solo uso mediante radiación. El piloto está enfocado en ayudar esterilizadores contratados y fabricantes de dispositivos médicos a avanzar en sus formas de esterilizar dispositivos aprobados, incluyendo cambios de fuentes de radiación en un enfoque menos oneroso [55].

### 6.4. Pruebas biológicas

#### 6.4.1. Histología

La histología es un estudio microscópico de tejidos y órganos mediante el corte, tinción y examen de las secciones bajo un microscopio. Con la histología se pueden visualizar estructuras de tejidos y cambios característicos que el tejido puede haber sufrido. Para poder realizar una tinción específica las muestras de tejido a estudiar deben someterse a las siguientes etapas: fijación, procesamiento, inclusión, corte y en algunos casos recuperación de antígenos. La fijación se realiza utilizando productos químicos que permiten preservar la estructura del tejido en su forma natural y protegerlo de la degradación mediante el entrecruzamiento irreversible de las proteínas, durante este proceso la muestra se endurece y facilita la fase de corte. Algunos de los fijadores comúnmente utilizados son la formalina tamponada y la parafina-formalina, sin embargo, esto puede variar según el tipo de tejido que se desee examinar.

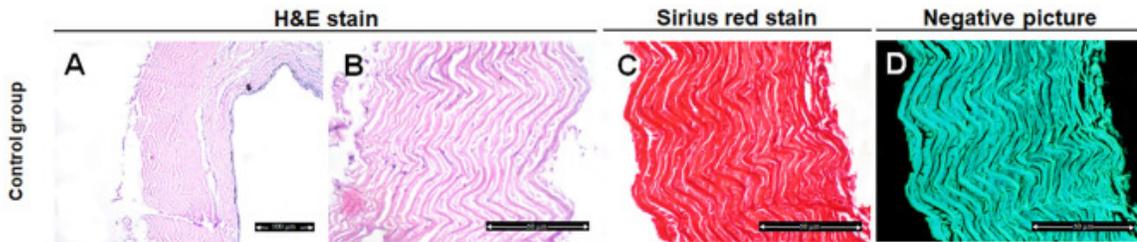


Figura 8: Evaluación histológica e histoquímica de piel de tilapia tratado con solución salina. A y B. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina. C. Secciones teñidas con rojo Sirius para colágeno. D. Imagen negativa para C utilizando segmentación de color CMEIAS. Escala en A = 100  $\mu\text{m}$  y B-D = 50  $\mu\text{m}$  [11].

En la etapa de procesamiento se realiza una deshidratación de la muestra mediante la adición de etanol, con esto se elimina el agua de la muestra y se endurece aún más el tejido para la evaluación. Luego de aplicar el etanol y completar el procesamiento de deshidratación se utiliza xileno para eliminar el etanol presente en la muestra. Posteriormente se realiza la etapa de inclusión en la que se coloca la muestra en una cera de parafina o resina plástica para mejorar el proceso de extracción de estructuras celulares. Para la etapa de seccionamiento se coloca la muestra en un micrótopo y se corta en secciones, el grosor más utilizado es de 4-5 micrómetros para poder realizar la tinción y colocar en un portaobjetos para su estudio microscópico. La recuperación de antígenos se utiliza en ocasiones para recuperar los antígenos que pueden haberse cubierto en las etapas de fijación e inclusión. Este proceso se logra mediante el calentamiento y métodos proteolíticos para descomponer los enlaces cruzados y revelar los epítomos y antígenos cubiertos previamente [56].

#### 6.4.2. Cultivos bacterianos

Un cultivo bacteriano es un método que permite la multiplicación de células bacterianas en o sobre un medio de cultivo en condiciones controladas de laboratorio, también puede depender de la especie bacteriana objetivo. La mayoría de las bacterias pueden crecer hasta cierto punto en presencia de oxígeno (cultivo aeróbico), sin embargo, especies que se encuentran naturalmente en ambientes con poco oxígeno crecerán mejor en ausencia de oxígeno (cultivo anaeróbico) [57].

Muchas de las necesidades nutricionales de las bacterias pueden satisfacerse a través de medios de cultivo microbiológicos especializados que normalmente contienen extractos de proteínas, sales inorgánicas o carbohidratos. Algunos también requieren componentes nutricionales añadidos como vitaminas, o un entorno especializado de condiciones de temperatura y pH [58].

#### Morfología colonial de las bacterias

Cuando se observa un crecimiento colonial en la superficie de un medio sólido, pueden describirse características como textura de la superficie, transparencia y color o matiz del crecimiento.

Textura: describe cómo aparece la superficie de la colonia. Algunos términos comunes pueden ser suave, brillante, mucoide, viscosa, seca, polvorienta y demás.

Transparencia: las colonias pueden ser transparentes (se puede ver a través de ellas), translúcidas (la luz las atraviesa) u opacas (de apariencia sólida).

Color o pigmentación: muchas bacterias producen pigmentos intracelulares que hacen que sus colonias tengan un color distinto, como amarillo, rosa, morado o rojo. Muchas bacterias no producen ningún pigmento y aparecen de color blanco o gris.

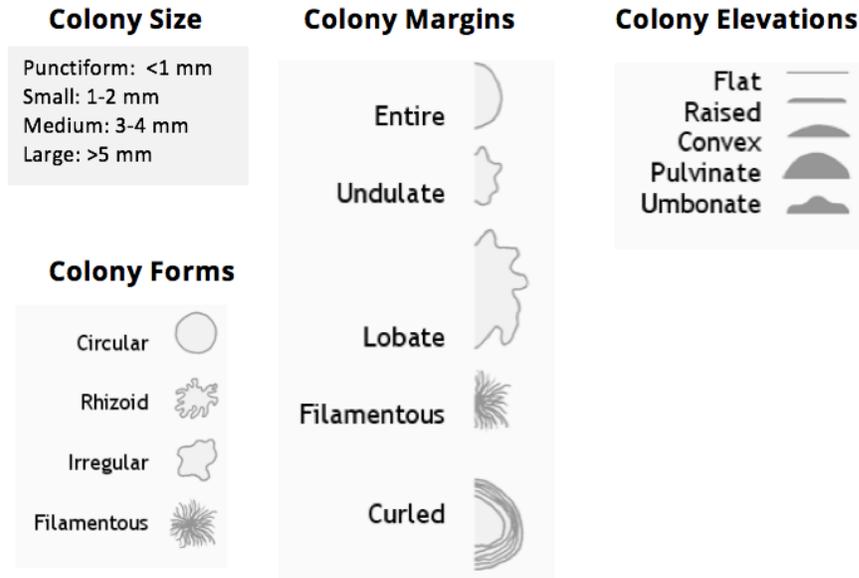


Figura 9: Descripciones bacteriológicas de la morfología colonial: tamaño, márgenes, elevaciones y formas [58].

## Aplicaciones

Una de las aplicaciones más importantes de los cultivos bacterianos es el diagnóstico de infección. Existen pruebas como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) capaz de identificar rápidamente presencia de patógeno específico, pero aislar a las bacterias puede confirmar que está vivo y alerta a los analistas sobre posibles riesgos de transmisión e informará el tratamiento. También puede obtenerse información como sensibilidad a los antibióticos para opciones de tratamientos, almacenarse para referencia futura con fines de seguimiento de enfermedades.

Existen muchas aplicaciones más en los cultivos bacterianos como estudios epidemiológicos, permitiendo a científicos estudiar cómo cambian las poblaciones bacterianas con el tiempo y estudiar eventos de transmisión para informar consejos de salud pública. También puede utilizarse para el desarrollo de vacunas, terapias y para la producción de alimentos y bebidas.

## **Problemas comunes**

Un problema común en las pruebas de cultivo bacteriano es la posible contaminación durante el procedimiento. La contaminación puede provenir de muchas, desde la propia muestra original hasta el proceso de cultivo o también el almacenamiento. Otro problema es el crecimiento excesivo de algunas especies que crecen con facilidad, el uso de medios selectivos y condiciones de crecimiento óptimas para la especie objetivo pueden ayudar a mitigar el problema.

### 7.1. Obtención y validación de tilapias antes de procesamiento

Para llevar a cabo el proyecto se utilizan un total de 4 pieles completas de 2 tilapias, las pieles se obtienen de la granja de producción de tilapias de engorde “TILAPIAS PASABIEN” ubicada en Santa Cruz, Río Hondo, Guatemala.

Como primer paso se hace una evaluación utilizando una báscula de precisión para verificar que cada una de las tilapias tuviera un peso promedio de 400 +- 50g y verificar que se encuentren en un mismo rango de edad (juveniles subadultos, entre 6-9 meses de vida). Se realiza una inspección visual de todas las tilapias seleccionadas para confirmar que todas se encuentran en las mismas condiciones antes de la obtención de las pieles.

Para la obtención de las pieles se coloca cada una de las tilapias en una superficie de trabajo limpia. Se utiliza un raspador de escamas para desecamar cada pescado y se utiliza un cuchillo de corte adecuado para retirar las pieles de manera uniforme de ambos lados de la tilapia. Por último, se realiza una limpieza superficial de las pieles obtenidas utilizando solución isotónica 0.9% de cloruro de sodio (Bonin, Villa Nueva, Guatemala) para retirar cualquier suciedad o sangre presente.

### 7.2. Transporte y mantenimiento

Una vez retiradas y limpiadas las pieles de tilapia estas se almacenan en bolsas de plástico tipo ziploc de manera individual. Todas las bolsas se mantienen dentro de una hielera limpia y libre de contaminantes que puedan afectar la calidad de las pieles, a una temperatura aproximadamente a 4°C durante un período de 3 horas. Posteriormente se almacenan en una nevera a una temperatura de -18°C. Se debe asegurar que las pieles se mantengan a temperaturas menores a 4°C durante todo el transporte hasta la nevera.

### 7.3. Preparación de control microbiológico

Para la evaluación de control microbiológico se utilizan 4 diferentes medios de cultivo: Agar sangre de carnero 5 %, Agar Plate Count, Agar Chromocult y Agar Mac Conkey.

Se prepara una solución de 200 mL de cada medio de cultivo y se utilizan las cantidades indicadas en el Cuadro 2 para la preparación de los mismos.

Medio de cultivo	Cantidad (g)
Agar sangre	8.08
Agar Plate Count	4.50
Agar Chromocult	5.30
Agar Mac Conkey	10.70

Cuadro 2: Tabla de cantidades de medio en gramos para control microbiológico. Cantidad correspondiente de cada medio de cultivo para preparar 200 mL de medio.

Se utiliza una balanza analítica de precisión para el pesaje de cada medio de cultivo y posteriormente se agrega cada uno en un frasco de vidrio borosilicato de 300 mL identificados con el nombre de cada medio. Posteriormente se utiliza una probeta de vidrio de 500 mL para medir 200 mL de agua destilada, se agrega la misma cantidad a cada uno de los frascos y se colocan en una parrilla de calentamiento y agitación a una temperatura de 50-60°C y utilizando un rotador magnético hasta obtener una solución clarificada. Una vez que cada uno de los medios tenía una apariencia más aclarada se retiran de la parrilla, se extrae el rotador magnético y se cierra cada frasco.

Después de la preparación de los medios de cultivo se procede a su esterilización mediante un autoclave para eliminar cualquier contaminante biológico presente en los medios. Se esterilizan durante 25 minutos a una temperatura de 120°C y una presión de 15 atmósferas de presión. Se esperan 20 minutos después que termine la esterilización, se retiran los medios con precaución. Luego son trasladados a la campana de extracción para proporcionar un ambiente controlado y estéril durante la preparación de las placas petri.

Se utilizan un total de 40 placas petri de plástico esterilizadas, 10 placas para cada medio de cultivo y son ingresadas a la campana de extracción. Antes de comenzar con la preparación de las placas se agregaron 10 mL de sangre de carnero al frasco que contenía el medio de cultivo de agar sangre utilizando una jeringa desechable de 10 mL y se agitó cuidadosamente el medio hasta lograr de nuevo una homogeneización completa de la solución.

Posteriormente, se agregan 10 mL de cada medio de cultivo a cada una de las placas petri y se espera a que se produzca la solidificación de la capa gelatinosa para ser almacenadas a bajas temperaturas hasta su uso.

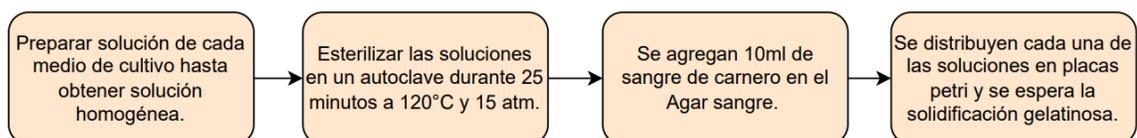


Figura 10: Proceso para la fabricación de medios de cultivo en placas petri.

## 7.4. Protocolos de esterilización

Para comparar todos los protocolos de esterilización en este trabajo se establece un corte de las pieles de tilapia en cuadrados de 1.5 cm x 1.5 cm. Para realizar los cortes se utiliza un bisturí previamente esterilizado. Todo este proceso se realiza dentro de una campana de extracción estéril, por lo que todos los utensilios a utilizar son esterilizados utilizando un autoclave (15-25 minutos a 15 atmósferas de presión y 120°C), también las bolsas que contienen las pieles de tilapia se limpiaron con etanol al 70 % para que se encuentren libres de contaminantes.

Para realizar el corte de las pieles primero se les realiza un cambio de temperatura pasando de los -18°C a 4°C y por último, a temperatura ambiente (25°C). Antes de comenzar se hace un lavado de cada piel utilizando solución isotónica 0.9 % de cloruro de sodio (Bonin, Villa Nueva, Guatemala). Posteriormente se realizan los cortes uniformes utilizando un bisturí y de una misma piel de tilapia se obtienen 7 muestras, las cuales se separan en 4 placas petri distintas como se observa en el Cuadro 3.

Placa petri	Método	Cantida de muestras
1	Control	1
2	Método 1	2
3	Método 2	2
4	Método 3	2

Cuadro 3: Tabla de distribución de muestras. Cantidad de muestras según el método de esterilización organizados por placas petri

Luego se realizan los diferentes métodos de esterilización para cada muestra como se describen a continuación.

### 7.4.1. Control

La placa petri 1, en esta muestra no se agrega ninguna solución y se mantiene durante la campana mientras se realizan los métodos de esterilización de las demás muestras.

### 7.4.2. Método 1 - Etanol 70 %

Para el método de esterilización 1 se realizan 3 baños consecutivos de 5 minutos cada uno en una solución de etanol al 70 %. Después de cada uno de los baños se retira la solución de las muestras y se deposita en un beaker de 50 mL de desechos hasta obtener las muestras con la menor cantidad de etanol presente en la placa petri.

### 7.4.3. Método 2 - Autoclave

En el método de esterilización 2 las muestras son colocadas en el autoclave dentro de las cajas petri y se coloca papel craft en el exterior de la caja. Se programa el autoclave durante

15 minutos a 15 atmósferas de presión y 120°C. Luego se retiran las muestras del autoclave y se colocan nuevamente en la campana de extracción hasta que alcanzan una temperatura ambiente para su siguiente evaluación.

#### **7.4.4. Método 3 - Conversión a Matriz Acelular**

Para la cuarta muestra se siguió el proceso de esterilización descrito en [10]. Como primer paso se remoja la piel de tilapia en una solución de bicarbonato de sodio al 3% ( $\text{NaHCO}_3$ ) durante 12 horas con una relación material/líquido de 1:10 (p/v), luego se remoja la piel en una solución de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 0.1M durante 8 horas con una relación material-líquido 1:10 (p/v). Posteriormente se realizan 3 lavados de las muestras con buffer de fosfato (PBS) 0.01M para eliminar impurezas. Luego, las pieles se remojan en una solución de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) 1M con una relación material-líquido 1:5 (p/v) durante 12 horas. Seguidamente se remojan nuevamente las pieles en una solución de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) 0.1M durante 6 horas con una relación material-líquido 1:10 (p/v). Luego, se realizan nuevamente 3 lavados de las muestras con buffer de fosfato (PBS) 0.01M. Una vez terminado el tiempo se sumergen las pieles en una solución de peróxido de hidrógeno con concentración 2.5 - 3.5% (Superior, Ciudad de México, México) durante 6 horas con una proporción material-líquido 1:5 (p/v). Por último, se realizan 3 lavados de las muestras con buffer de fosfato (PBS) 0.01M.

### **7.5. Control microbiológico**

Una vez que se realizan los procesos de esterilización se prepara la evaluación de control microbiológico. Para la preparación de cada cada prueba se agrega 1 mL de solución isotónica 0.9% de cloruro de sodio (Bonin, Villa Nueva, Guatemala) en cada una de las placas petri donde se tienen las muestras de pieles de tilapia. Luego se mezcla con la solución salina hasta obtener una solución turbia. Posteriormente, utilizando pipetas de precisión se siembra 0.1 mL de la solución agregada en cada uno de los diferentes medios y se esparce por la placa utilizando asa de inoculación. Por último, se trasladan las placas a una incubadora a 35°C durante 24 horas. Una vez concluido el tiempo se analizan cuantitativamente y cualitativamente para obtener los resultados de identificación microbiológica en cada una de las muestras.

### **7.6. Almacenamiento a largo plazo**

Para verificar la viabilidad de control microbiológico a largo plazo se almacenan sometidas a cada proceso de esterilización utilizando bolsas de sellado al vacío. Para mantener un ambiente estéril durante este proceso se desinfectan las bolsas de almacenaje utilizando una solución de etanol al 70% y se ingresan a la campana de extracción. Posteriormente se divide cada una de las 6 muestras en cada una de las bolsas por separado y son selladas al vacío. Luego, las bolsas son identificadas con cada uno de los métodos utilizados en cada muestra y son almacenadas en una nevera a una temperatura de -18°C. Una de las muestras

correspondiente a cada método de esterilización es almacenada durante 1 semana, mientras que el otro grupo de muestras es almacenada durante 1 mes. Posteriormente a cada tiempo se realiza el control microbiológico como en un inicio en cada una de las muestras para verificar su viabilidad a largo plazo.

## 7.7. Histología

Para llevar a cabo el protocolo de histología primero se comienza con los cortes de las pieles de tilapia procesadas almacenadas durante un mes después de su procedimiento. Se realizan 3-4 cortes pequeños de forma rectangular de cada una de las muestras de piel de tilapia correspondiente a cada método (control, etanol, autoclave y matriz), posteriormente se agregan los cortes de las muestras a los casetes de histología (2 casetes por método) y se identifican cada uno con el método empleado. Seguidamente se inicia el proceso de fijación de las muestras donde se sumergen en un frasco utilizando una solución de Formol 10 % durante 24 horas. Luego se lleva a cabo el proceso de deshidratación en el que se sumergen las muestras en alcohol etílico 70 % durante 2 ciclos de 12 horas cada uno, luego se sumergen en alcohol etílico 95 % durante 2 ciclos de 1 hora cada uno, posteriormente se sumergen en alcohol etílico 100 % durante 2 ciclos de 1 hora cada uno y por último se sumerge en Tolueno durante 2 ciclos de 40 minutos cada uno. Después de deshidratar las muestras se lleva a cabo el embebido en parafina donde se sumergen las muestras en parafina líquida durante 2 ciclos de 1 hora cada uno.

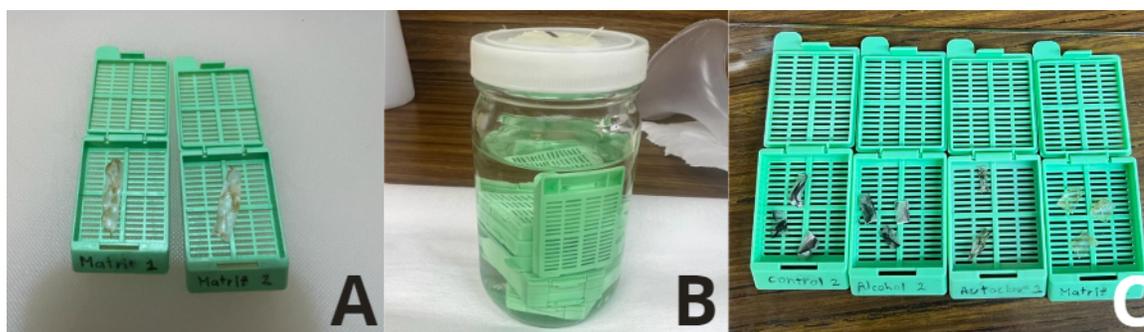


Figura 11: Procedimiento de fijación, deshidratación y embebido en parafina. A. Cortes de muestras de matriz acelular antes de proceso de fijación. B. Proceso de deshidratación de las muestras sumergidas en alcohol etílico 100%. C. Muestras de cada método de esterilización después del embebido en parafina.

Una vez que las muestras terminan ese proceso se utiliza un molde de inclusión en el que se añade parafina líquida y luego se coloca el casete encima de modo que la parafina alcanzara la parte inferior del casete. Luego se colocaron las muestras de piel de tilapia perpendicularmente con el casete para conseguir un corte transversal de la piel, luego se llena el espacio restante con parafina líquida y se retiró de la estufa para que la parafina se solidifique al alcanzar una temperatura ambiente.

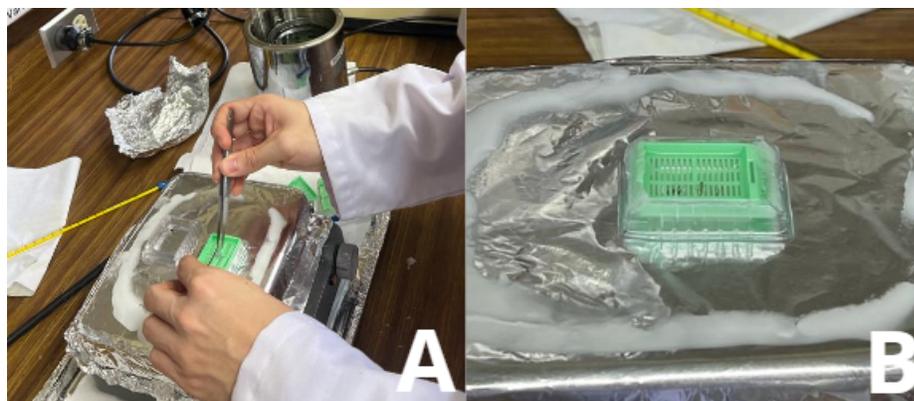


Figura 12: Embebido en parafina de las muestras. A. Colocación de las muestras en casetes con parafina. B. Resultado final de embebido en parafina de las muestras antes de alcanzar temperatura ambiente.

Posteriormente se llevan a cabo los cortes de las muestras, se inicia con cortes grandes ( $20\ \mu\text{m}$ ) hasta conseguir llegar a la muestra objetivo y se realizan cortes desde  $5\ \mu\text{m}$  hasta  $15\ \mu\text{m}$  en casos donde no sea posible obtener un corte óptimo para el análisis. Una vez se obtienen los cortes son trasladados a un baño de agua para estirar la capa de parafina que contiene la muestra, luego se añaden a un portaobjetos para ser trasladarlos a una plancha con una temperatura de  $60^\circ\text{C}$  en la cual se derrite la parafina y se obtiene de forma más aislada la muestra objetivo para llevar a cabo la tinción necesaria para el estudio.



Figura 13: Cortes de las muestras y colocación en portaobjetos. A. Corte de la muestra en parafina. B. Colocación de la muestra cortada en baño de agua. C. Portaobjetos en plancha a  $60^\circ\text{C}$ .

Para llevar a cabo la tinción de Hematoxilina & Eosina primero se agregan todas las muestras (2 portaobjetos por método) a un recipiente en el que se trasladan durante el procedimiento. Luego se realiza un desparafinado de las muestras sumergiéndolas 4 veces en distintos baños de Tolueno. Luego se lleva a cabo una serie de baños de Etanol, 12 sumergidas en etanol 100% (2 ciclos), luego 12 sumergidas en etanol 95% y de igual forma utilizando etanol 80%, 70% y 50%. Posteriormente se realizan 12 sumergidas de las muestras en agua desmineralizada cambiando el agua utilizada 6 veces. Seguidamente se sumergen las muestras en la solución de Hematoxilina durante 1-2 minutos y se realizan 12 sumergidas de las muestras en agua de chorro cambiando el agua utilizada 6 veces, se deja 3 minutos en

reposo después de la última sumergida. Luego se sumergen las muestras en la solución de Eosina durante 2 minutos y se comienza un proceso de deshidratación en el que se sumergen las muestras en etanol 95 % durante 4 ciclos de 12 sumergidas cada uno, después se sumergen en etanol 100 % durante 3 ciclos de 12 sumergidas cada uno.

Para terminar el procedimiento de tinción se sumergen las muestras en Tolueno durante 3 ciclos de 3 minutos cada uno. Se agregan varias gotas de Merckoglas sobre el tejido de la muestra a modo de cubrirlo completamente y se coloca un cobre-objetos sobre el tejido evitando la formación de burbujas. Una vez se tienen las muestras, se esperan 24 horas para que las muestras estén secas y puedan observarse bajo un microscopio.



Figura 14: Procedimiento de tinción Hematoxilina & Eosina. A. Mesa de trabajo con todas las soluciones a utilizar. B. Muestras colocadas en recipiente para traslados entre soluciones. C. Muestras finales después de colocar cubreobjetos.

## 8.1. Piel de tilapia sin esterilización (control)

### 8.1.1. Prueba microbiológica

En esta sección se presentan los resultados de las cuatro pruebas microbiológicas (Agar sangre de carnero 5 %, Agar MacConkey, Agar Chromocult y Agar Plate Count (PCA)) , donde cada prueba se realiza para la piel de tilapia sin proceso de esterilización.

En la placa petri correspondiente a la prueba de control se puede observar la presencia de colonias bacterianas en la muestra. Esto demuestra que las pruebas de control no están esterilizadas y presentan una carga bacteriana en cada método (Figura 15).

La primera evidencia de bacterias en la muestra se puede observar en la Figura 15 (A y B) correspondiente al Agar sangre de carnero 5 %. Se identifica una gran cantidad de colonias de diferentes tamaños y distribuidas en toda la placa a diferencia de los demás medios de cultivos. El recuento de colonias reveló una concentración de aproximadamente 1200 UFC/mL, indicando una presencia significativa de bacterias en el análisis. En la prueba de medio de cultivo Agar MacConkey se puede evidenciar la presencia de colonias bacterianas en la muestra. Se pueden observar principalmente unidas en la orilla izquierda de la placa petri (Figura 15 C). El recuento de colonias reveló una concentración de aproximadamente 110 UFC/mL, indicando una presencia considerable pero significativamente menor en comparación con los demás análisis.

Utilizando el medio de cultivo Agar Chromocult se puede identificar una presencia grande de bacterias, principalmente se observan en la parte superior de la placa petri, en este caso están distribuidas como una línea de colonias (Figura 15 D). El recuento de colonias reveló una concentración de aproximadamente 860 UFC/mL, indicando una presencia de bacterias considerable en el análisis. Mediante la prueba de Agar Plate Count también es posible evidenciar la presencia de bacterias en la prueba de control no esterilizada como se observa en la Figura 15 (E). Se identificaron aproximadamente 141 colonias de bacterias en esta

placa Petri, lo que indica una concentración de aproximadamente 1410 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Además, se observaron bacterias de diferentes tamaños y están distribuidas en toda la placa. Este recuento se realizó utilizando un volumen de muestra de 0.1 mL y sin aplicar diluciones adicionales durante el análisis.

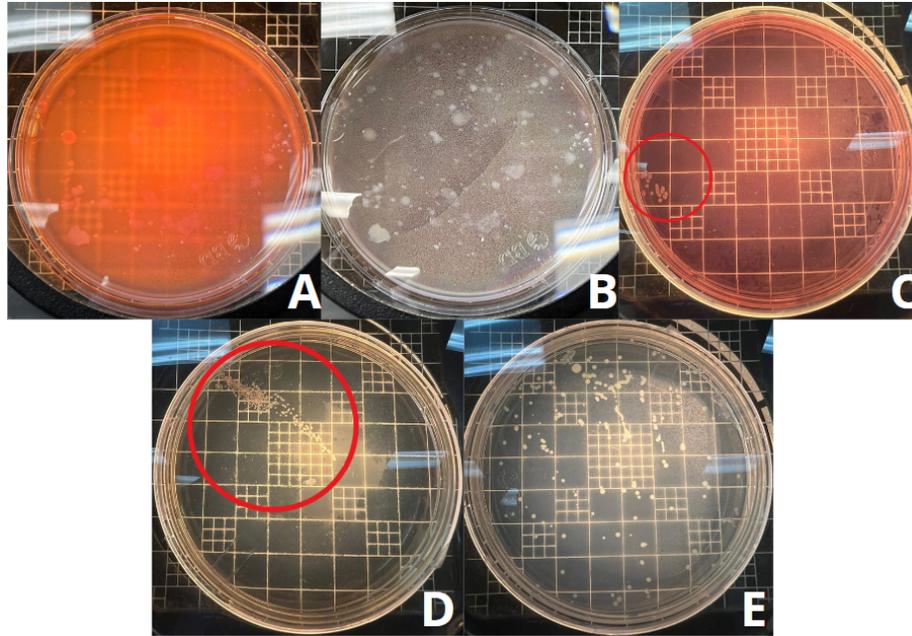


Figura 15: Resultados placas petri control. A y B. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. C. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. D. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. E. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

Utilizando el estereoscopio se observaron con más detalle las bacterias que se encuentran presentes en las muestras de control (Figura 16). En la Figura 16 (A) se puede observar una de las colonias más grandes que se encuentra presente en la placa de control Agar sangre de carnero 5%, además, es posible observar la diferencia de tamaño con otras colonias más pequeñas. Se identifica una gran cantidad de colonias de color blanco a crema opacas distribuidas en toda la placa, los margenes que presentan las colonias son enteros con formas circulares e irregulares con una elevación convexa y una composición mucoide y viscosa.

En la Figura 16 (B) se puede observar con más detalle las colonias bacterianas de la placa de Agar MacConkey, se pueden identificar únicamente 3 colonias de bacterias que a diferencia del resto fue la que tuvo menor crecimiento. Las bacterias de este medio de cultivo son de color rosa, tienen una forma semicircular con los margenes enteros y una composición mucoide y viscosa.

En la Figura 16 (C y D) se puede identificar una gran presencia de colonias bacterianas la placa de medio de cultivo Agar Chromocult. Las bacterias presentes en el medio exhiben formas circulares e irregular con márgenes enteros en su mayoría, su coloración es blanca y opaca. En la Figura 16 (D) se observó que algunas colonias presentaron un cambio en su coloración tornandose color violeta después de pasada una semana en temperaturas bajas. De igual forma, una de las colonias que creció de mayor tamaño durante esta prueba micro-biológica fue la bacteria presente en el medio de cultivo Agar Plate Count, las colonias se

unieron durante una semana en temperaturas bajas perdiendo su forma circular, manteniendo los márgenes enteros y un color blanco a amarillo opaco (Figura 16 E).

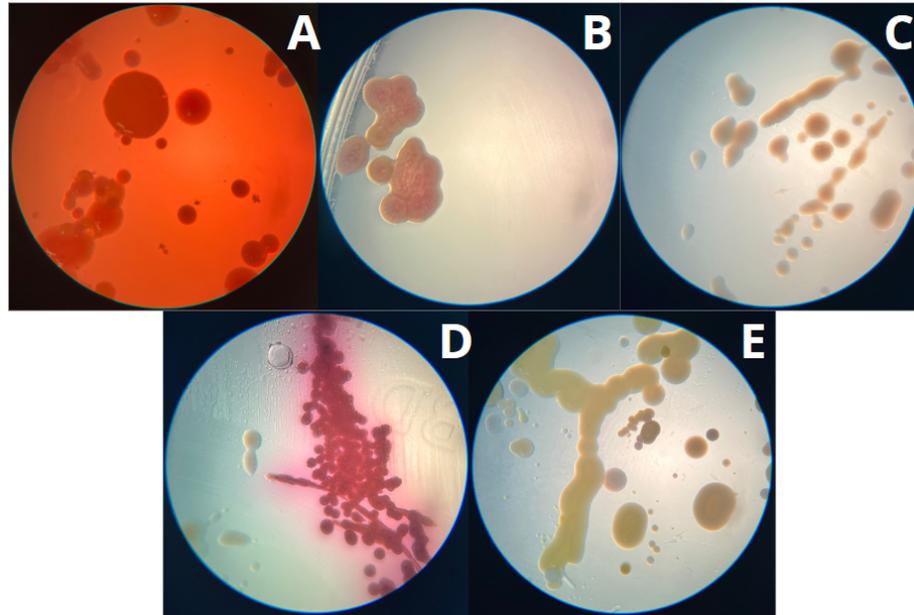


Figura 16: Bacterias de placas petri control observadas en estereoscopio. A. Bacterias observadas en Agar sangre de carnero 5%. B. Bacterias observadas en Agar MacConkey. C y D. Bacterias observadas en Agar Chromocult. E. Bacterias observadas en Agar Plate Count.

### 8.1.2. Evaluación estereoscópica

La muestra de piel de tilapia (Figura 17) exhibe una combinación de colores gris y blanco en la parte frontal, en la parte trasera predomina el color blanco con algunas marcas grises que resultan de los cortes entre músculo y piel. El tamaño de las pieles fue ligeramente más grande del esperado midiendo aproximadamente 1.5 cm de ancho y 2.6 cm de largo. Pueden observarse los patrones de las escamas en forma rombo como su morfología característica. Se observa presencia de mucosidad y secreción por la humedad de la piel y no se presentan lesiones.

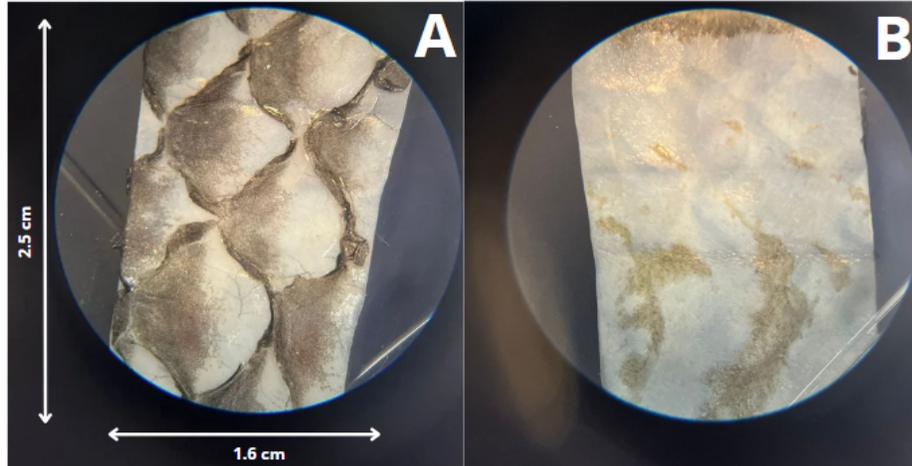


Figura 17: Estereoscopia de muestra de control. A. Lado frontal de la muestra. B. Lado posterior de la muestra

### 8.1.3. Histología

En la muestra de piel de tilapia correspondiente a el control (18) es posible observar principalmente la dermis de la piel (capa debajo de la epidermis), la cual se presenta de color rosado y con un patrón específico correspondiente a la morfología del tejido conectivo de la dermis, incluyendo fibras de colágeno que forman parte del tejido conectivo. En la Figura 18(A) se puede observar que en la parte inferior de el corte hay muchas fibras largas y completas, además, en las demás muestras obtenidas correspondiente a la piel de tilapia sin esterilizar no se observa un tejido dañado ya que las fibras de colágeno están dispuestas en una orientación específica y no presentan rupturas entre sí, más que en algunos márgenes donde se realizó el corte. Además, se pueden observar células presentes en el tejido teñidas de color violeta por la tinción H&E.

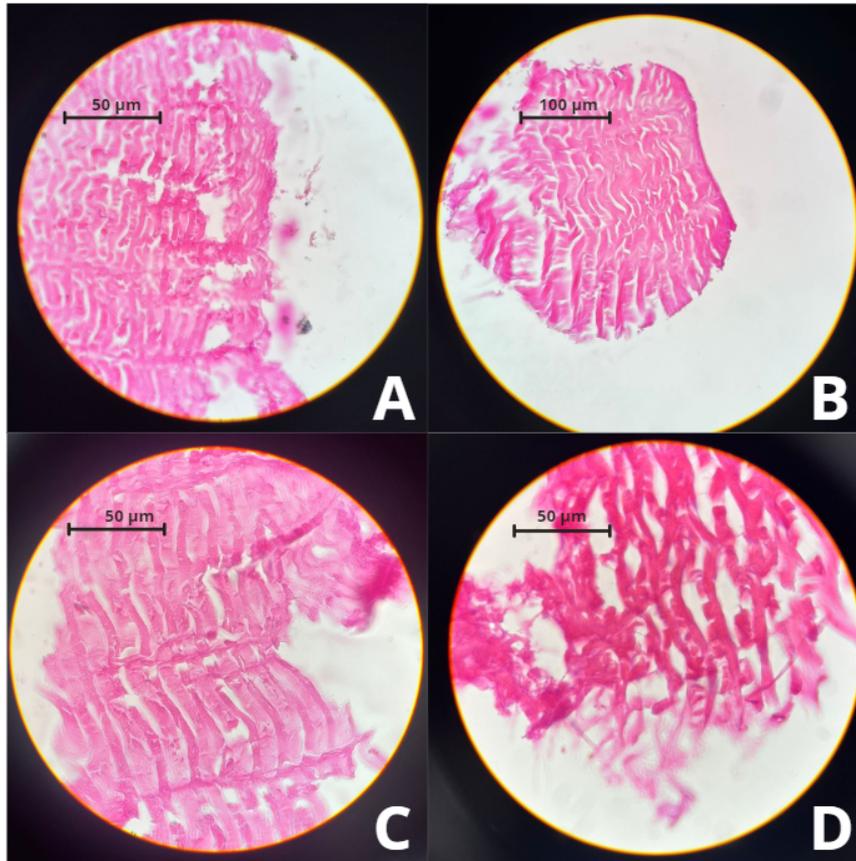


Figura 18: Histología de piel de tilapia sin esterilizar. A. Sección de muestra de control con corte de  $10\ \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 100$ . B. Sección de muestra de control con corte de  $10\ \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 40$ . C. Sección de muestra de control con corte de  $5\ \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 100$ . D. Sección de muestra de control con corte de  $5\ \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 100$ .

## 8.2. Piel de tilapia con Etanol 70 %

El procedimiento para realizar el método 1 de esterilización se puede observar en la Figura 19. En ninguno de los pasos observados en la figura se pudieron observar cambios en la estructura de la piel, por lo que se mantuvo el mismo tamaño de la muestra y la misma coloración gris y negro de la piel de tilapia.

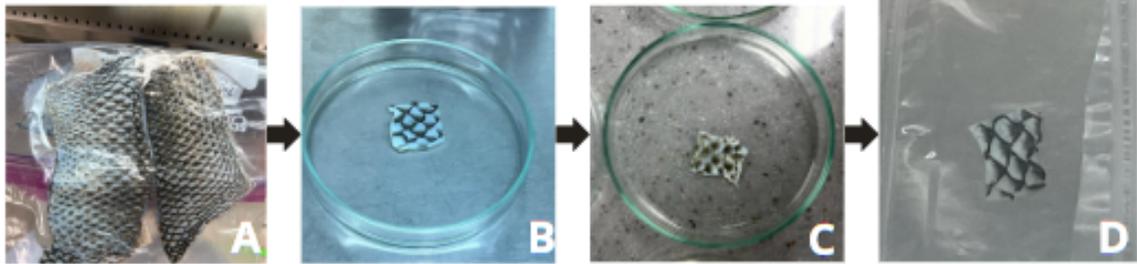


Figura 19: Resultados de procedimiento método 1 de esterilización. A. Pieles enteras antes de cortes. B. Piel cortada. C. Piel remojada con solución de etanol 70 %. D. Piel cerrada el vacío.

### 8.2.1. Prueba microbiológica

Después de realizar la esterilización con etanol al 70 % no se observa ninguna colonia de bacterias que evidencie la contaminación después de realizar el método 1 utilizando el medio de cultivo de Agar sangre de carnero 5 % (Figura 20 A). En el medio de cultivo de Agar MacConkey tampoco se observa presencia de colonias bacterianas en la placa petri después del proceso de esterilización del método 1 (Figura 20 B). En la placa petri con medio de cultivo Agar Chromocult (Figura 20 C), no se observa ninguna presencia de colonias bacterianas al igual que en cada placa petri correspondiente al método 1 de esterilización. En la placa petri no se observan con el medio de cultivo Agar Plate Count (PCA) no se observa ninguna colonia bacteriana para realizar el recuento (Figura 21 D). Después de 1 semana se observó el crecimiento de una bacteria específicamente en la placa petri de el Agar sangre de carnero 5 % de la Figura 21 (A). No se observó ningún otro crecimiento bacteriano en los demás meidios de cultivo en el que podrían crecer el mismo tipo de bacteria. Además, en la Figura 22 se observó con mejor detalle la bacteria del Agar sangre de carnero 5 % indicando la fomración única de una colonia de bacterias, esta bacteria exhibe un color blanco a crema opaco, con forma circular y márgenes enteros al igual que las bacterias presentes en la Figura 16 (A). Además, no se obtuvo crecimiento alguno en ninguno de los medios de cultivo después de realizar cultivos bacterianos pasado 1 mes del proceso de esterilización.

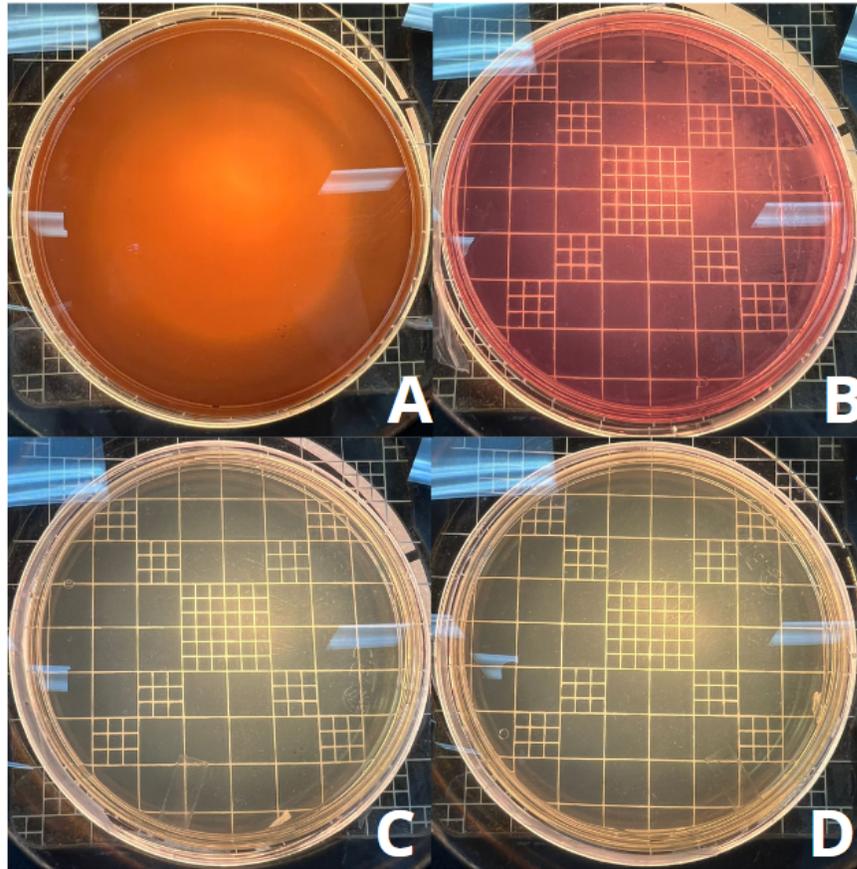


Figura 20: Resultados placas petri método 1. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

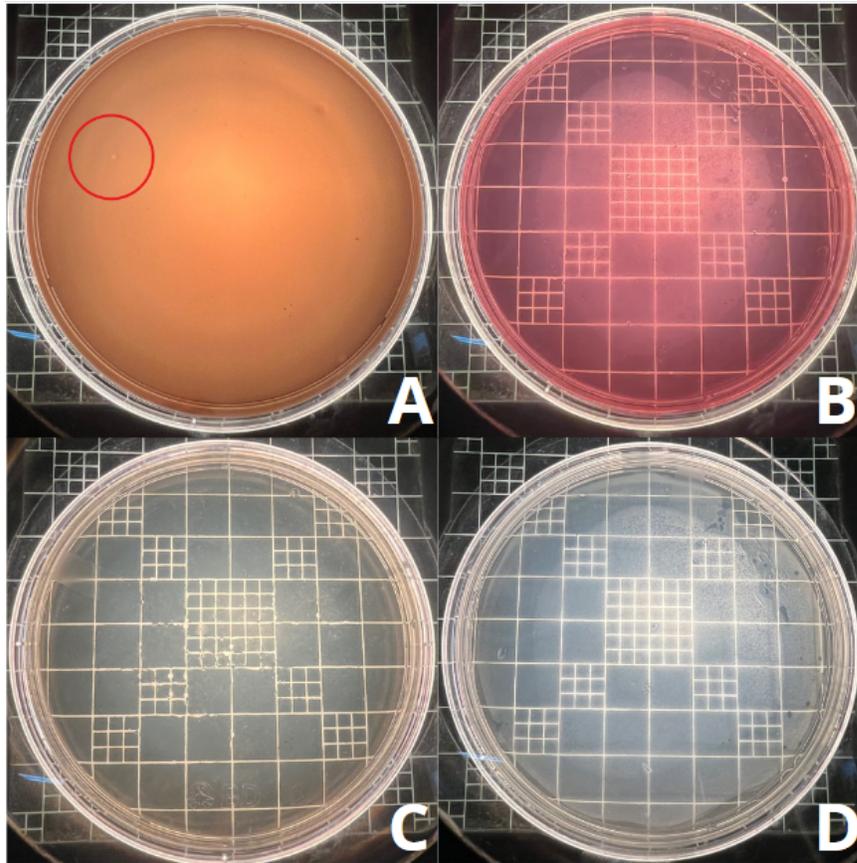


Figura 21: Resultados placas petri de método 1 después de 1 semana. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

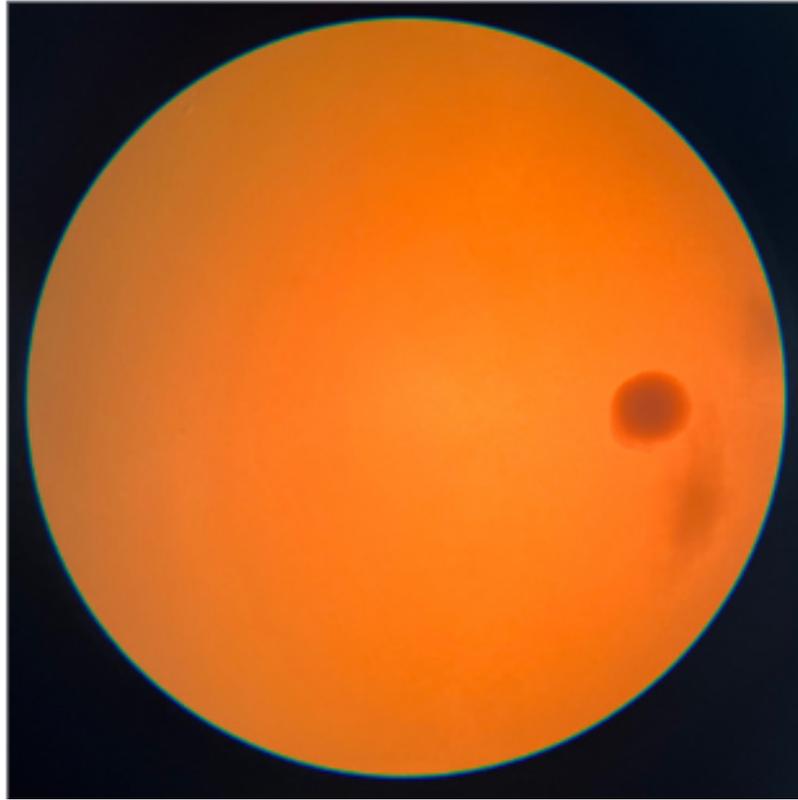


Figura 22: Bacteria de placa petri Agar sangre de carnero 5% observada en estereoscopio después de 1 semana de esterilización.

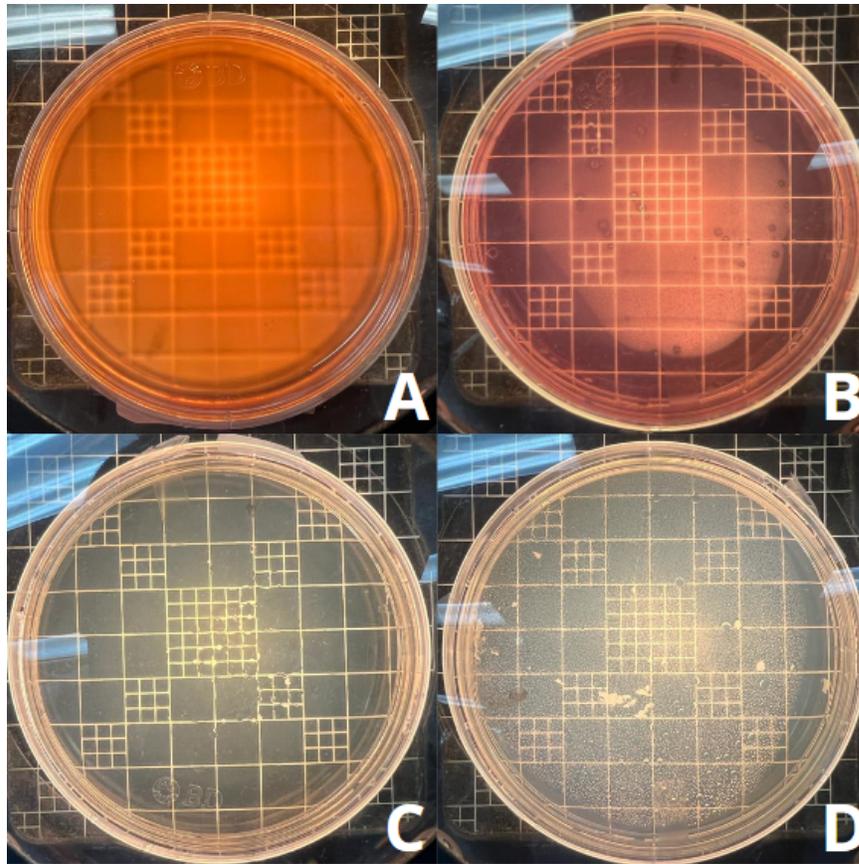


Figura 23: Resultados placas petri de método 1 después de 1 mes. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5 %. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

### 8.2.2. Evaluación estereoscópica

En la Figura 24 se puede observar una similitud con la piel de control. La muestra procesada mantiene una combinación de colores gris y blanco en la parte frontal, mientras que en la parte trasera de la muestra 1 (Figura 24 B) mantiene una coloración predominante de blanco con marcas grises en la parte trasera de muestra 2 (Figura 24 D) presenta marcas más grandes y de color beige entre el corte piel y músculo. En ambas muestras se observan patrones de rombo por su morfología de las escamas, también se identifica presencia de mucosidad y secreción debido a la humedad de la piel. No se identifica ningún defecto físico visible provocado por el método de esterilización.

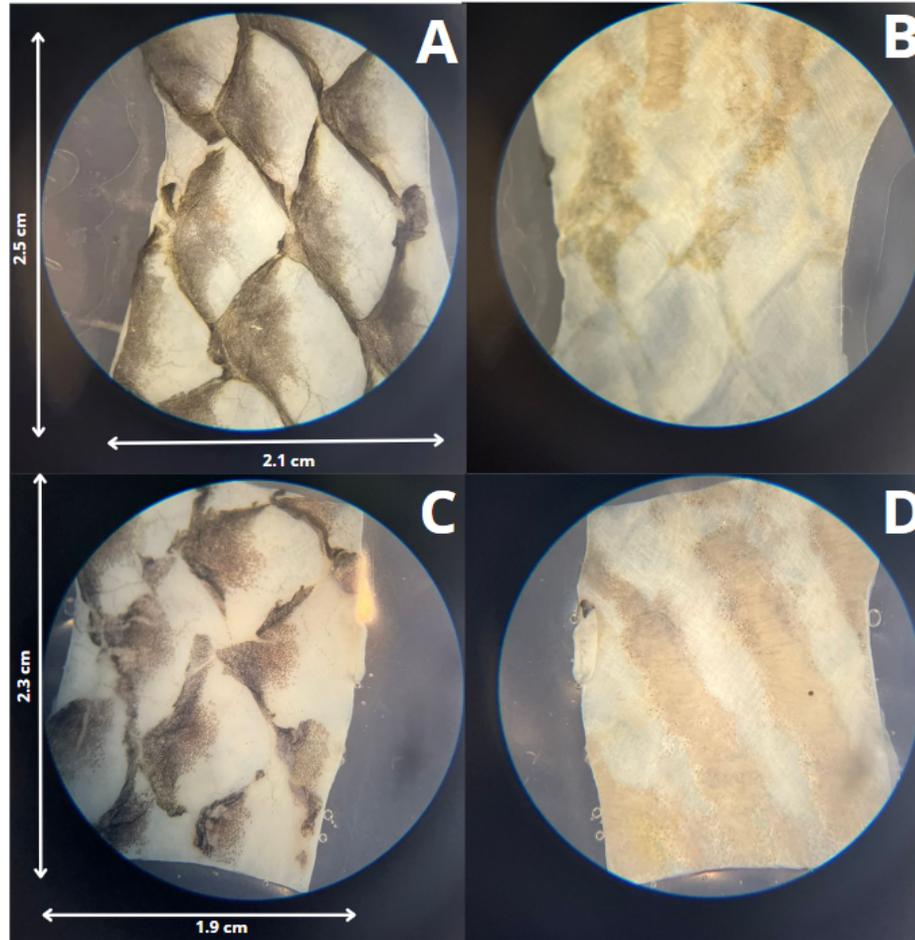


Figura 24: Estereoscopia de muestras de método 1. A. Lado frontal de la muestra 1 método 1. B. Lado posterior de la muestra 1 método 1. C. Lado frontal de la muestra 2 método 1. D. Lado posterior de la muestra 2 método 1.

### 8.2.3. Histología

En las muestras de los cortes histológicos de la Figura 25 es posible observar principalmente la dermis de la piel en la que se encuentra el tejido conectivo y principalmente pueden observarse fibras de colágeno de la piel. Al igual que en la Figura 18 pueden observarse muchas de las fibras completas en su totalidad como en la Figura 25 (A y D), sin embargo, en la Figura 25 (C) puede observarse que algunas de las fibras fueron afectadas por el procedimiento de etanol, pero todavía pueden mantener la orientación que tenían en un principio. En la Figura 25 (B) se puede comparar que el corte realizado no fue tan fino dando como resultado una muestra más gruesa en la que no se puede observar con detalle las fibras de colágeno y demás detalles de la muestra, es posible observar a gran escala que la muestra mantiene su integridad después del procedimiento. También es importante mencionar que fue posible observar presencia de células bajo el microscopio especialmente en la Figura 25 (B), al igual que en los cortes de control se observan los núcleos de las células teñidos de color violeta.

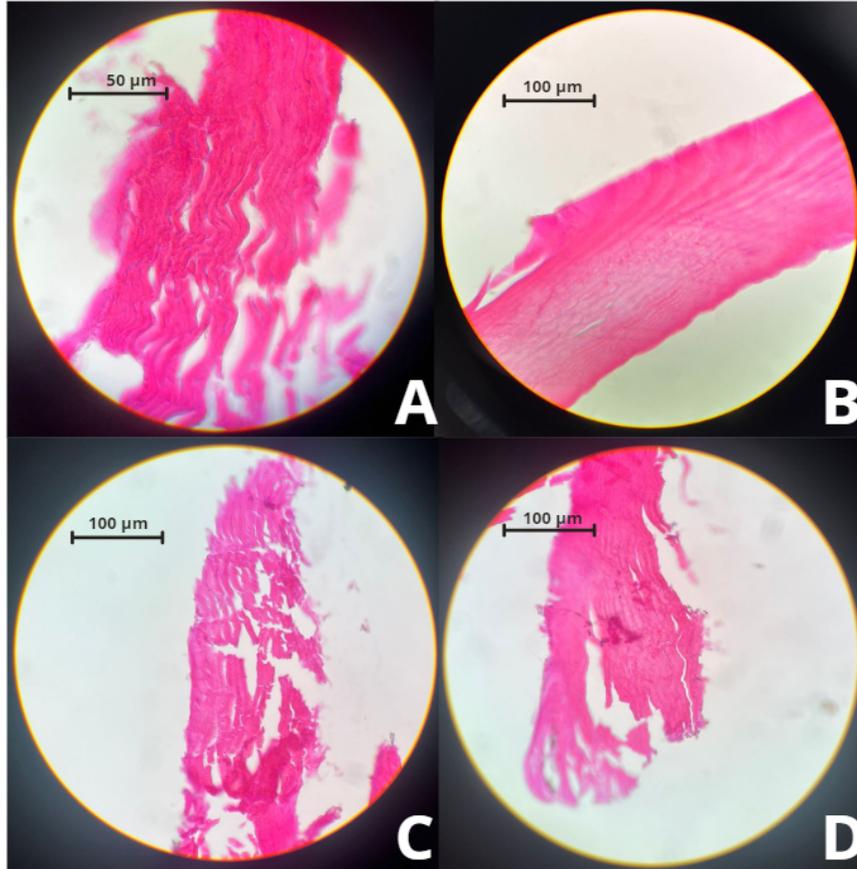


Figura 25: Histología de piel de tilapia esterilizada con Etanol 70 %. A. Sección de muestra de método 1 con corte de  $15 \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 100$ . B. Sección de muestra de método 1 con corte de  $10 \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 40$ . C. Sección de muestra de método 1 con corte de  $7 \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 40$ . D. Sección de muestra de método 1 con corte de  $7 \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 40$ .

### 8.3. Piel de tilapia esterilizada con Autoclave

El procedimiento para realizar el método 2 de esterilización por autoclave se puede observar en la Figura 26. En la Figura 26 (D) ya se puede observar el cambio en la estructura de la piel.

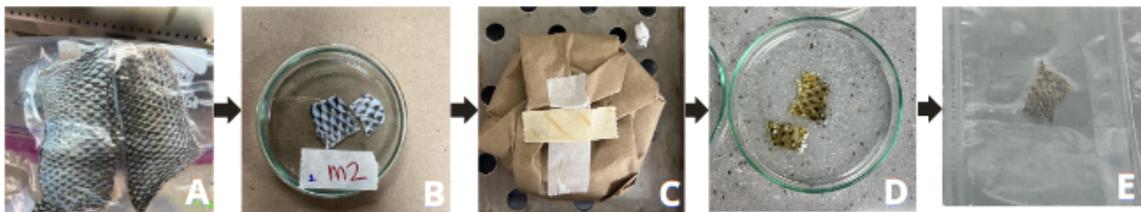


Figura 26: Resultados de procedimiento método 1 de esterilización. A. Piel enteras antes de cortes. B. Piel cortada. C. Piel en placa petri de vidrio envuelta con papel craft antes de autoclave. D. Piel después de esterilización con autoclave. E. Piel sellada al vacío.

### 8.3.1. Prueba microbiológica

En las placas petri correspondientes a el método 2 de esterilización no se evidenció presencia de colonias bacterianas en ninguno de los cuatro medios de cultivo, al igual que en el método 1 (Figura 27).

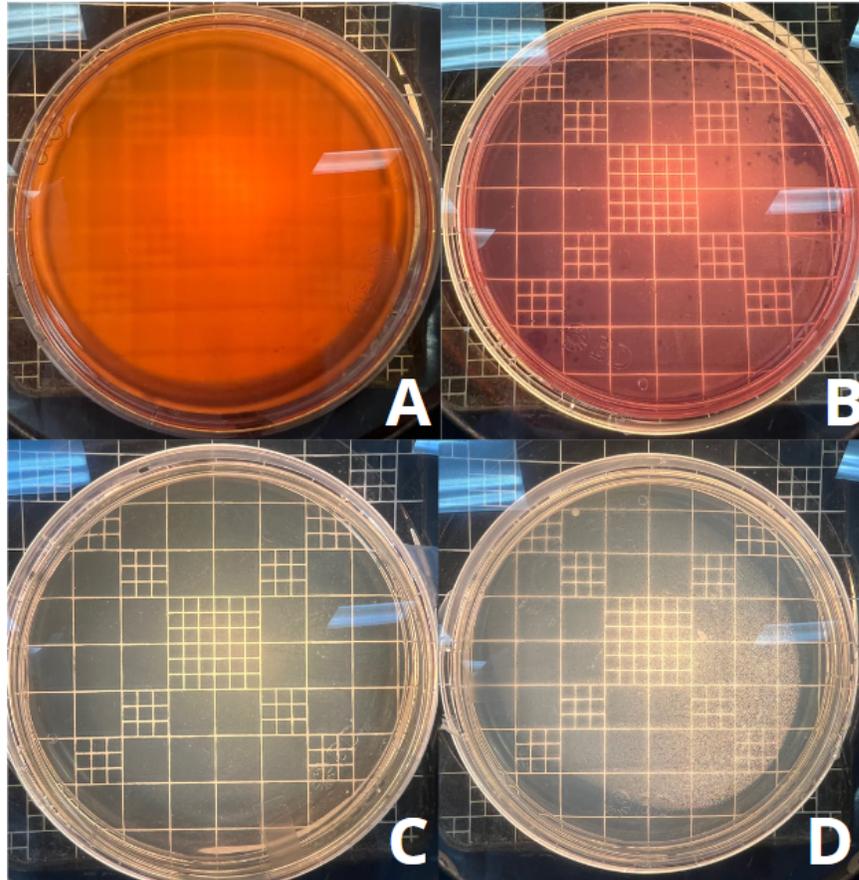


Figura 27: Resultados placas petri de método 2. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

Después de realizar las pruebas microbiológicas una semana después del método de esterilización 2, no se identificó ningún crecimiento bacteriano en ninguna de las placas petri de los cuatro medios de cultivo (Figura 28). De igual forma, después de realizar las pruebas de cultivo bacteriano un mes después del proceso de esterilización con autoclave no se obtuvo ningún crecimiento de colonia de bacteria en ninguno de los medios de cultivo evaluados (Figura 29).

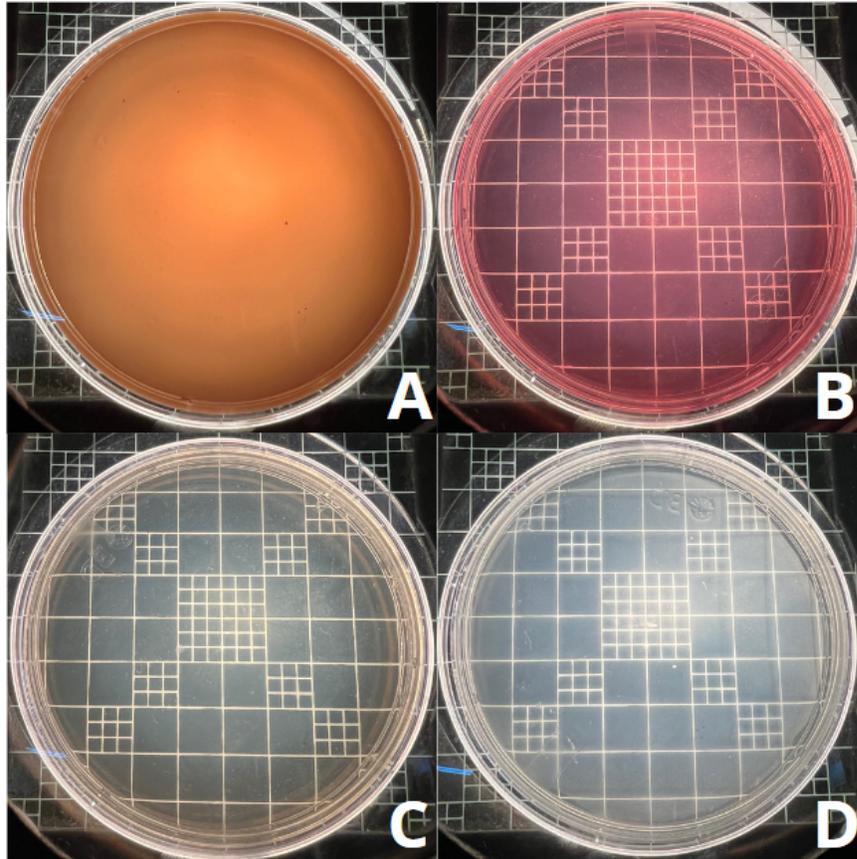


Figura 28: Resultados placas petri de método 2 después de 1 semana. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

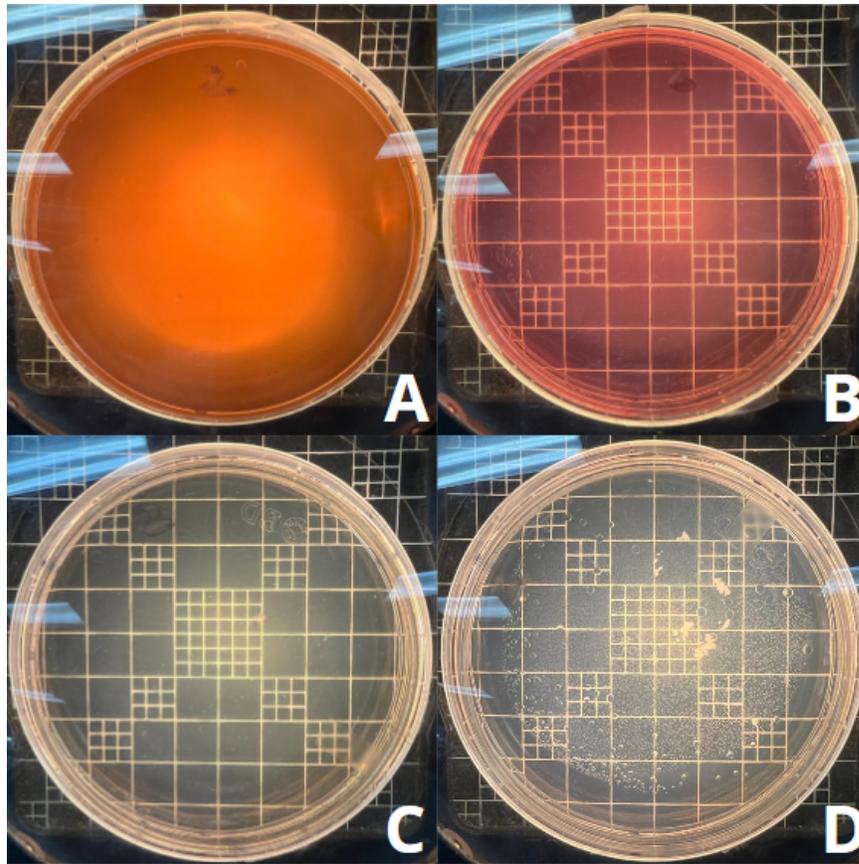


Figura 29: Resultados placas petri de método 2 después de 1 mes. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

### 8.3.2. Evaluación estereoscópica

En la Figura 30 sí es posible observar notables cambios en la estructura de la piel. Uno de los cambios más visibles es la apariencia más transparente de la piel, indicativa cambios de retención de humedad de la piel. Se puede observar que en la muestra se perdió la pigmentación de colores gris y blanco que predominaba en las pieles de control 17 y se tornó de color beige/marrón después del procedimiento. Se identifica que las pieles mantuvieron el tamaño con el que fueron cortadas y también se observan algunos de los patrones de las escamas en forma de rombo, sin embargo, los márgenes de la piel perdieron la forma original. En la parte trasera de la muestra (Figura 30 B) se puede identificar el contraste de colores de las áreas donde hay presencia de músculo y donde hay únicamente piel.

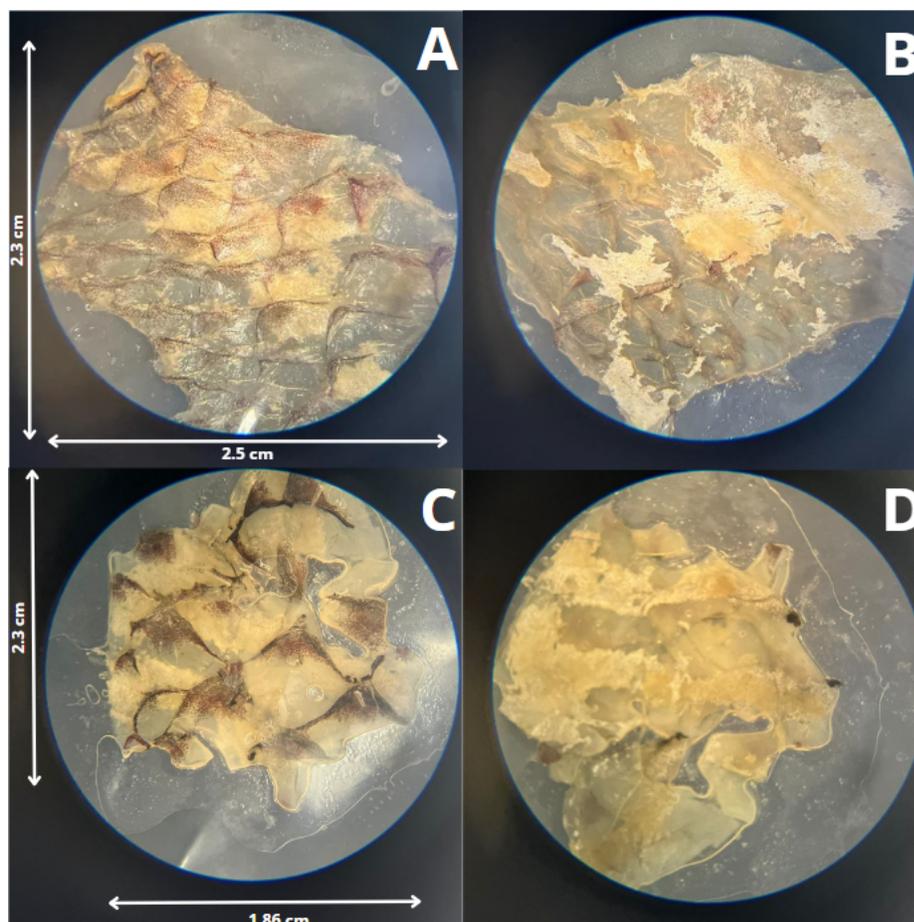


Figura 30: Estereoscopia de muestras de método 2. A. Lado frontal de la muestra 1 método 2. B. Lado posterior de la muestra 1 método 2. C. Lado frontal de la muestra 2 método 2. D. Lado posterior de la muestra 2 método 2.

### 8.3.3. Histología

Al examinar histológicamente la muestra de piel de tilapia que fue sometida al proceso de autoclave se evidencian daños y cambios en la estructura de los bordes de la piel los cuales incluyen la epidermis (Figura 31). La estructura de la dermis se aprecia con mejor detalle en la Figura 31 (B) donde se identifica el mismo patrón de fibras de colágeno que se observaron en la Figura 18. En ambas muestras sometidas al procedimiento de autoclave pueden observarse burbujas y perforaciones, en la muestra de la Figura 31 (A) no es posible observar el patrón de las fibras de colágeno en su totalidad, se observa una superficie lisa en su mayoría. Por otro lado, en la Figura 31 como se menciona, es más identificable la presencia de fibras de colágeno en la dermis, mostrándose más cohesionadas y con mínimos espacios vacíos entre cada patrón, a diferencia de las muestras anteriores.

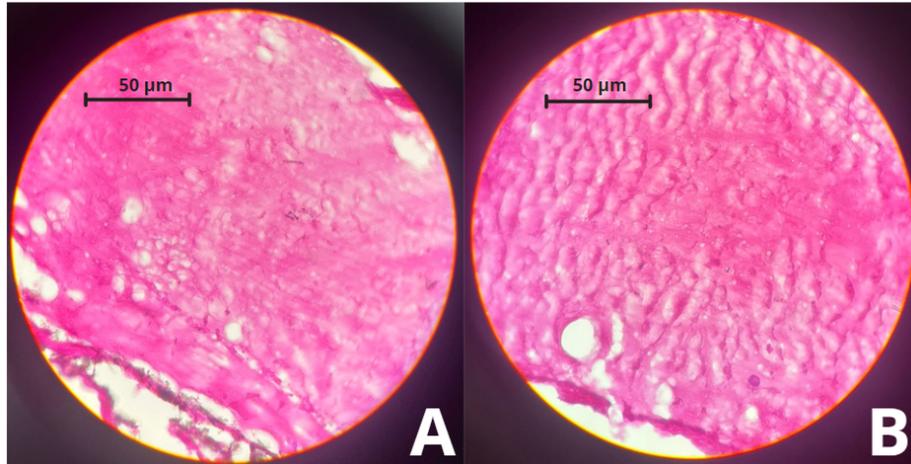


Figura 31: Histología de piel de tilapia esterilizada con Autoclave. A. Sección de muestra de método 2 con corte de  $15\ \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 100$ . B. Sección de muestra de método 2 con corte de  $15\ \mu\text{m}$  observada con magnificación de  $\times 100$ .

#### 8.4. Matriz acelular de piel de tilapia

El procedimiento para realizar el método 3 de esterilización por autoclave se puede observar en la Figura 32. En la Figura 32 (E) ya se puede observar el cambio en la estructura de la piel tornandose de un color más oscuro. Por último, el mayor cambio se observa cuando se agrega el agua oxigenada (Figura 32 H) ya que la piel se torna de un color amarillo.

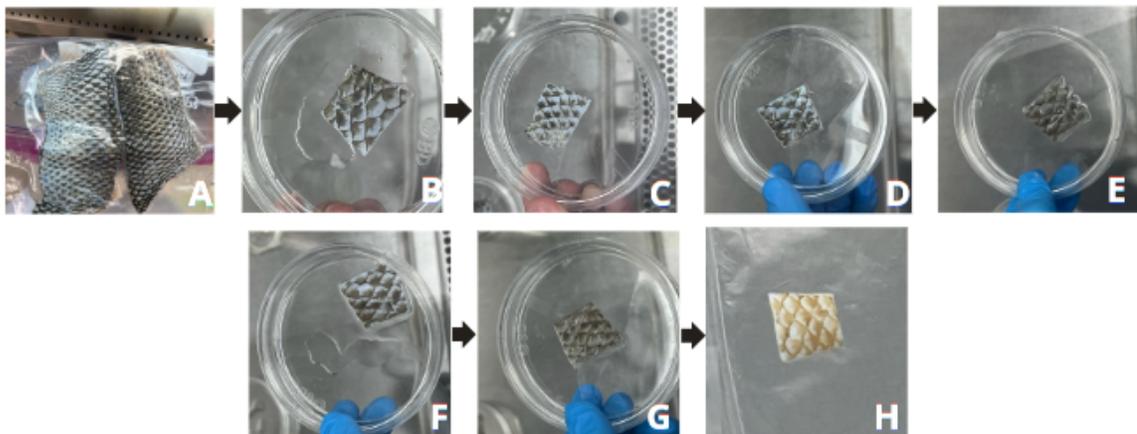


Figura 32: Resultados de procedimiento método 3 de esterilización. A. Piel enteras antes de cortes. B. Piel cortada remojada en solución de bicarbonato. C. Piel remojada en solución de NaOH. D. Piel remojada en solución Buffer. E. Piel remojada en solución NaCl. F Piel remojada por segunda vez en solución de NaOH. G. Piel remojada en último lavado de Buffer. H. Piel sellada al vacío después de remojar en agua oxigenada.

#### 8.4.1. Prueba microbiológica

No se observó ninguna colonia de bacterias después de realizar el método 3 y verificar las placas petri correspondientes a cada medio de cultivo. Se obtuvieron los mismos resultados que en los métodos 1 y 2, comprobando la esterilización de los tres métodos utilizados (Figura 33).

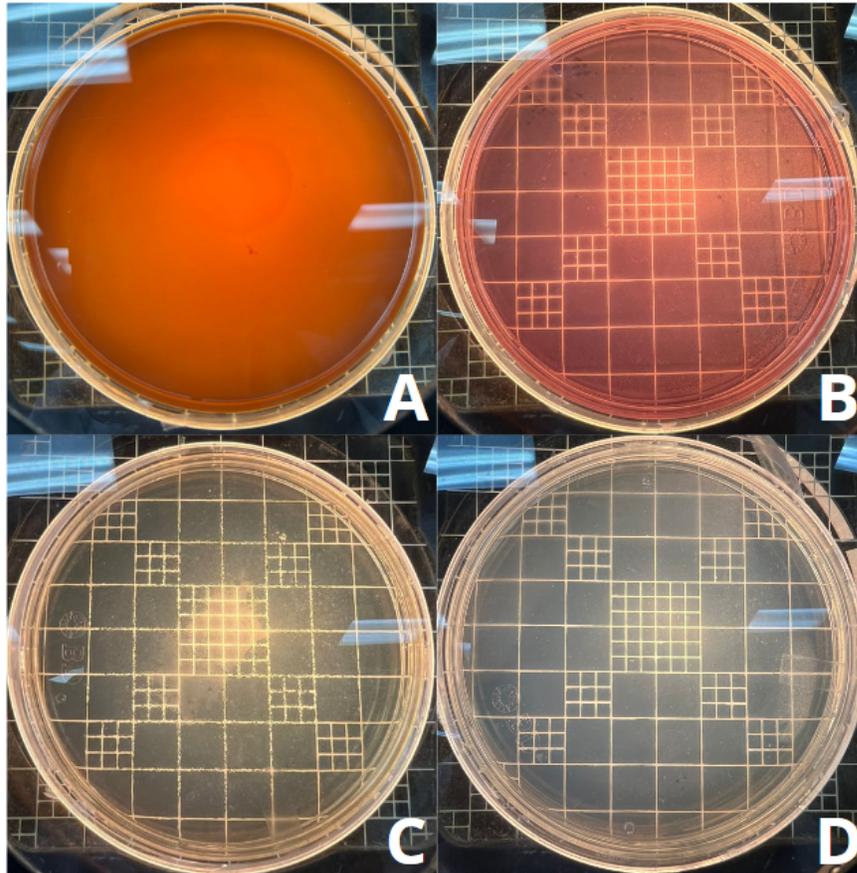


Figura 33: Resultados placas petri de método 3. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

Al igual que en el método de esterilización 2 con autoclave, no se obtuvo ningún crecimiento bacteriano en las pruebas microbiológicas después de 1 semana de utilizado el método de esterilización 3 (Figura 34). Por último, después de realizar una última prueba de cultivo bacteriano después de 1 mes de almacenada la muestra, no se obtuvo crecimiento alguno en ninguno de los medios de cultivo (Figura 35).

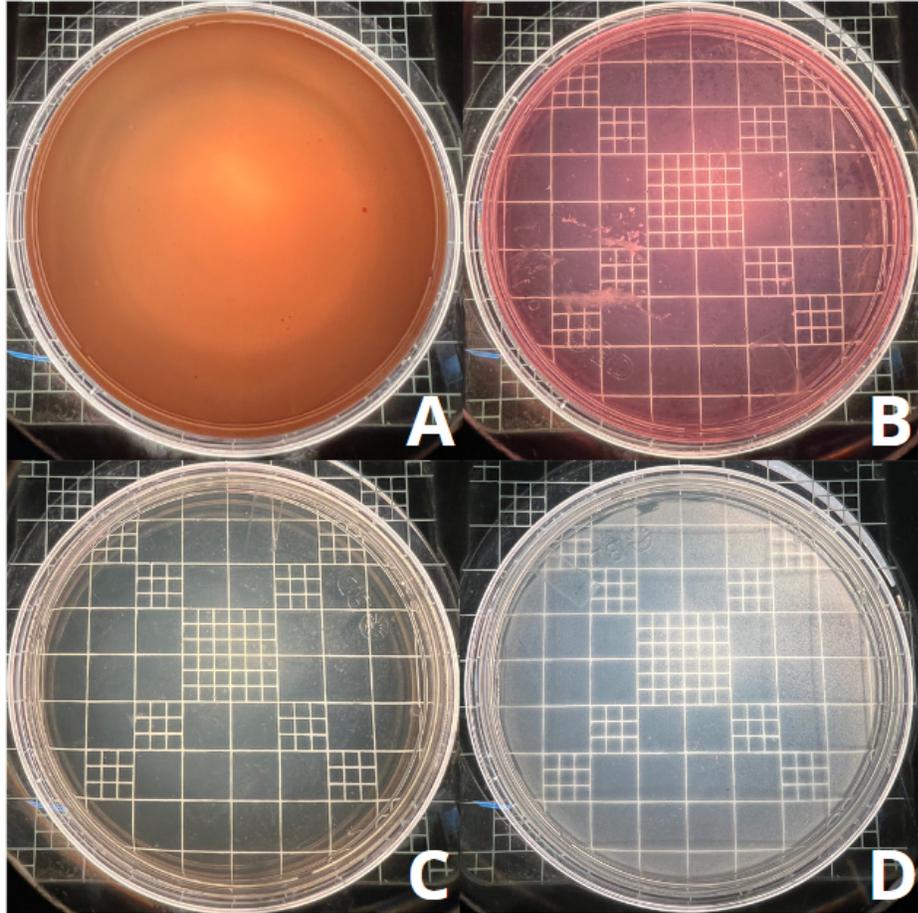


Figura 34: Resultados placas petri de método 3 después de 1 semana. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5%. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

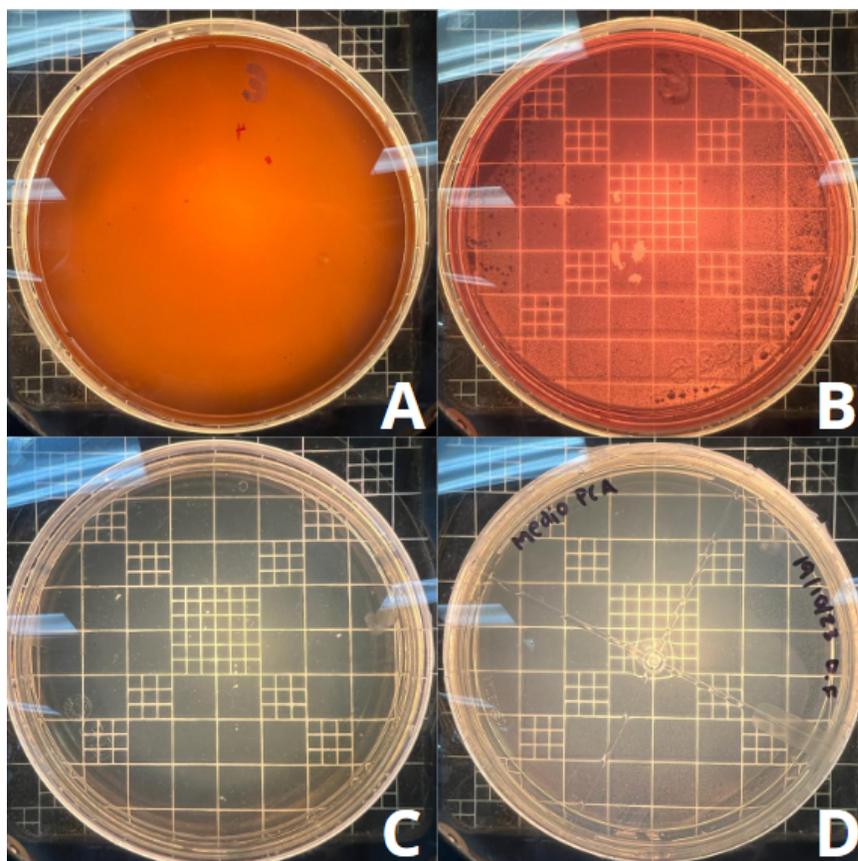


Figura 35: Resultados placas petri de método 3 después de 1 mes. A. Resultado medio de cultivo Agar sangre de carnero 5 %. B. Resultado medio de cultivo Agar MacConkey. C. Resultado medio de cultivo Agar Chromocult. D. Resultado medio de cultivo Agar Plate Count.

#### 8.4.2. Evaluación estereoscópica

En la Figura 36 se pueden observar cambios notables en el color de la muestra en comparación con la muestra de control (Figura 17). La tonalidad de la piel procesada es de color amarillo y blanco en la parte frontal, resultado directo del método de esterilización empleado. En el caso de la parte trasera de la muestra 1 (Figura 36 B) se puede observar que el color predominante sigue siendo blanco y la presencia de músculo es de color amarillo, mientras que la parte trasera de la muestra 2 (Figura 36 D) no tiene presencia de músculo y es totalmente blanca. Por otro lado, se puede observar que la estructura está completa, manteniendo su tamaño original de corte. Se observa que los patrones de escamas en forma de rombo se mantienen al igual que en la muestra de control, no se observa una presencia de mugosidad y la superficie se ve completamente lisa e hidratada.

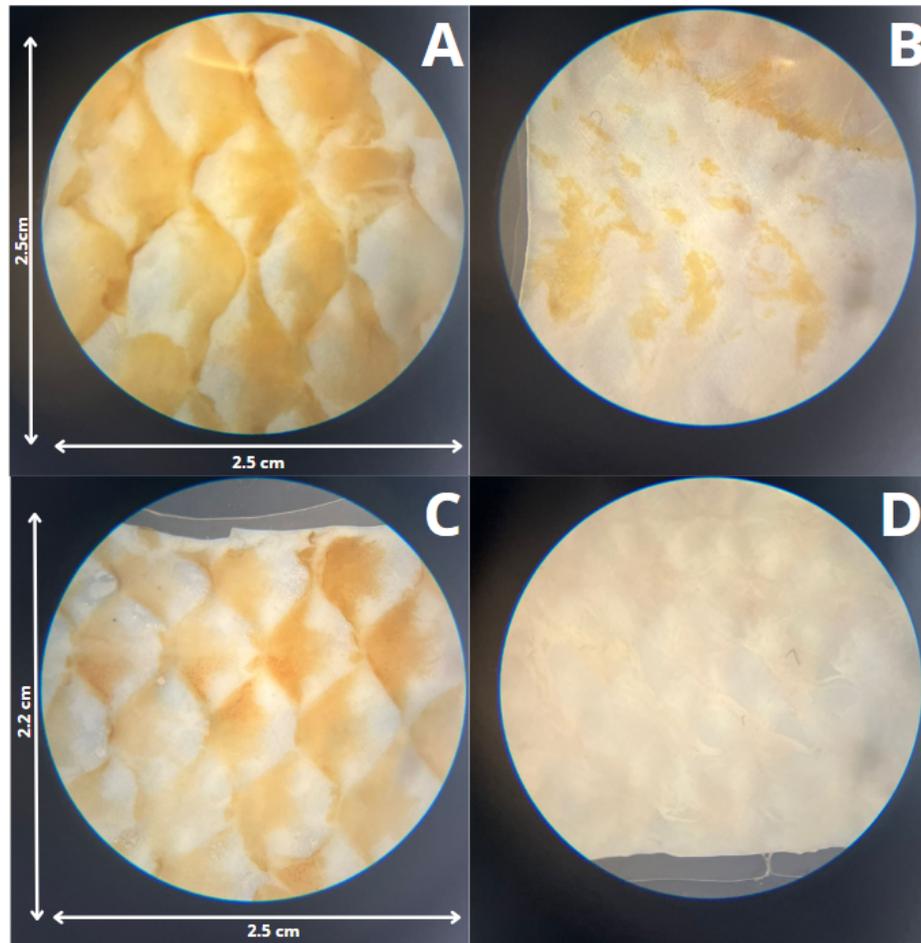


Figura 36: Estereoscopia de muestras de método 3. A. Lado frontal de la muestra 1 método 3. B. Lado posterior de la muestra 1 método 3. C. Lado frontal de la muestra 2 método 3. D. Lado posterior de la muestra 2 método 3.

### 8.4.3. Histología

Las muestras de los cortes histológicos correspondientes a la matriz acelular a base de piel de tilapia presentaron un cambio en la estructura de las fibras de colágeno. En la Figura 37, se observa que no hay un patrón completamente definido en la estructura de la dermis de la piel, pero sí hay presencia de tejido conectivo que incluye fibras de colágeno. Se aprecia que las fibras, que estaban conectadas en la Figura 18, ahora se encuentran mayormente desvinculadas, y no se observan muchas fibras completas. Además, se identifica la ausencia de células en la muestra, lo que evidencia que es una matriz acelular, ocasionando un cambio evidente en la estructura de la dermis debido a la falta de células en la matriz.

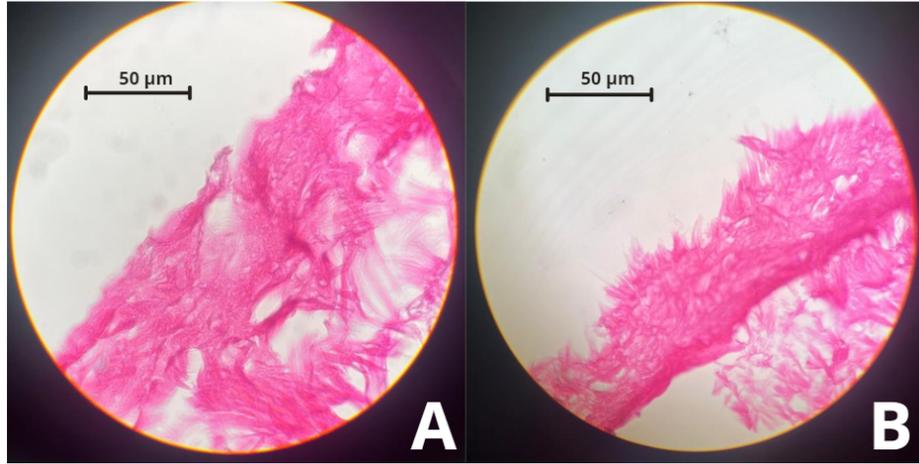


Figura 37: Histología de piel de tilapia como matriz acelular. A. Sección de muestra de método 3 con corte de 5  $\mu\text{m}$  observada con magnificación de x100. B. Sección de muestra de método 3 con corte de 5  $\mu\text{m}$  observada con magnificación de x100.

Durante la ejecución de este proyecto se logró establecer el flujo de trabajo necesario para obtener pieles de tilapia y esterilizarlas con el fin de preservar las propiedades biológicas de las pieles y prevenir el crecimiento de bacterias y patógenos. Se probaron 3 métodos distintos de esterilización y aunque todos cumplieron el propósito fundamental de esterilizar las pieles y remover patógenos, cada uno causó cambios distintivos en las pieles a nivel celular como se pudo observar por medio de análisis histológico.

La tilapia es un pez abundante en Guatemala y adquirirlo es extremadamente fácil, sobre todo las pieles que son típicamente desechadas luego de que la carne del pez es obtenida. Estas pieles, tienden a estar altamente contaminadas debido a que las bacterias y hongos crecen rápidamente en ellas luego de que el pez muere. Esto está claramente evidenciado en las pruebas de cultivos bacterianos en pieles sin esterilizar (Figura 15) donde se puede observar un crecimiento bacteriano en los cuatro medios de cultivo evaluados. En la Figura 15 (A y B) se puede confirmar un gran crecimiento bacteriano en el Agar Sangre de carnero 5%, en el caso de este cultivo, se encuentran bacterias Gram positivas, especialmente *Staphylococcus* y *Streptococcus* [59]. El *Staphylococcus* es una bacteria que puede causar infecciones casi en cualquier parte de cuerpo y puede propagarse por el contacto directo con algún objeto o piel que lo contenga. Esta bacteria puede ingresar al cuerpo a través de una herida en la piel y generalmente permanece en la piel como una infección menor, pero puede propagarse a mayor profundidad afectando la sangre, huesos o articulaciones [60]. Además, el *Streptococcus* es una de las bacterias que se pueden confirmar comúnmente en cultivos de tilapia a nivel mundial, causando mortalidad y pérdidas económicas [61].

Por otro lado, también se pudo confirmar el crecimiento de colonias bacterianas en el cultivo de Agar MacConkey como se observa en la Figura 15 (C). En la placa petri contaminada se puede observar poco crecimiento de las colonias, sin embargo, estas representan presencia de bacterias Gram negativas y son perjudiciales para la salud, entre ellas que se puede mencionar *Escherichia coli* y *Salmonella* [62].

En el caso del Agar Chromocult se identificó una presencia mayor de colonia de bacterias (Figura 15 D). En este medio de cultivo se pueden observar bacterias como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y otros uropatógenos, también es posible observar enterobacterias presentes en la muestra [63]. Debido a que tanto este medio de cultivo como el Agar Mac-Conkey pueden identificar algunas de las bacterias en común como lo es el *Escherichia coli*, se puede confirmar que sí hay una presencia significativa de colonias de bacterias en las muestras de control no esterilizadas.

En la Figura 15 (E) se puede observar la placa petri del medio de cultivo Agar Plate Count, mediante esta placa fue posible llevar a cabo un recuento total de 141 colonias de bacterias, es importante resaltar que en este medio de cultivo no se aíslan bacterias Gram negativo o positivo ya que se tienen bacterias de cualquier tipo mientras sean aeróbicas mesófilas [64].

Después de llevar a cabo el proceso de esterilización correspondientes a baños en Etanol al 70 %, no se observó crecimiento bacteriano en ninguna de las muestras de medio de cultivo. Esto se debe a que los alcoholes actúan reduciendo la tensión superficial de la membrana celular de las bacterias, desnaturalizando proteínas y consecuentemente destruyendo las células bacterianas que pueden estar presentes en la muestra [65]. Posteriormente, después de una semana de realizado el método 1 de esterilización, sí se observó el crecimiento de una colonia de bacteria en la muestra de ASC sangre de carnero 5 % (Figura 22), sin embargo, las bacterias Gram negativas a diferencia de las bacterias Gram positivas no tienen la tendencia a formar esporas, por lo que el crecimiento de esta bacteria después de una semana de esterilización no es tan significativo si no se obtuvieron más colonias en los demás medios de cultivo que también pudieran tener crecimiento del mismo tipo de bacterias.

En el caso del método 2 de esterilización mediante el uso de autoclave tampoco se obtuvo ningún crecimiento de colonias de bacterias como se observa en la Figura 27, tampoco tuvieron ningún crecimiento bacteriano después de 1 semana de esterilización (Figura 28). Se obtuvo un resultado positivo ya que el autoclave debido a sus altas temperaturas y cambios de presiones es capaz de llevar a cabo un proceso donde se destruyen los microorganismos presentes en la muestra mediante la coagulación irreversible y la desnaturalización de enzimas y proteínas estructurales, además, la presencia de humedad afecta significativamente la temperatura de coagulación de las proteínas y la temperatura a la que se destruyen los microorganismos presentes [66].

Por último, el método correspondiente a la matriz acelular de esterilización química no mostró ningún crecimiento bacteriano en las muestras de los cuatro medios de cultivo evaluados, tanto inicialmente como después de 1 semana (Figura 33 y 34). Este método es un poco más complejo ya que se utilizaron diferentes soluciones capaces de alterar la estructura y función de las células bacterianas como el bicarbonato de sodio, hidróxido de sodio, cloruro de sodio y peróxido de hidrógeno. El bicarbonato de sodio en este contexto puede neutralizar posibles ácidos y reducir la acidez de las muestras, algunas bacterias pueden ser sensibles a los cambios de pH y pueden ser eliminadas con esta solución. En el caso del hidróxido de sodio (NaOH) 0.1M, al ser una sustancia altamente alcalina y cáustica es capaz de desnaturalizar proteínas y romper las membranas celulares de las bacterias, este paso es muy eficaz ya que hace que la muestra de piel de tilapia sea una matriz acelular. Los lavados con la solución de PBS 0.01M se utilizaron principalmente para eliminar residuos entre cada uno de los cambios de soluciones y mantener un equilibrio en el pH de la muestra. Por último, el peróxido de

hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al ser un desinfectante oxidativo, pudo ser efectivo para oxidar y dañar aún más las células bacterianas y microorganismos presentes. En general, utilizando cada uno de estos pasos fue posible desnaturalizar proteína, romper membranas celulares, alterar el equilibrio del pH y además, proporcionar condiciones para eliminar los microorganismos para obtener una esterilización efectiva como se observó en los resultados.

Mediante la observación con el estereoscopio fue posible observar los cambios en las muestras de piel de tilapia, así como también del control. En la muestra de control donde no se aplicó ningún tratamiento, la piel de tilapia se mantuvo en su estado natural, es decir, igual que en su obtención (Figura 17). Es importante mencionar que en esta muestra la piel se observa hidratada debido a la presencia de agua en su matriz.

Al igual que en la prueba de control, la estereoscopía realizada en la muestra del método 1 (baños en Etanol 70 %) mostró que la piel no tuvo cambios significativos en su estructura, manteniendo el mismo color y transparencia que en la muestra de control (Figura 24). Sin embargo, el alcohol es un solvente que puede deshidratar y desnaturalizar las proteínas presentes en la muestra, por lo que sí pudieron haber cambios significativos si se realizan baños con una concentración más alta o bien de mayor tiempo de duración.

Por otro lado, si se pudieron observar cambios en la estructura de la muestra después de realizar el método de esterilización utilizando el autoclave. El cambio que tuvo la muestra después del autoclave (Figura 30) se debe directamente al efecto del calor y la presión del autoclave, se alcanzó una temperatura de  $120^\circ\text{C}$  la cual desnaturaliza las proteínas como se mencionó anteriormente, además este efecto puede afectar su estructura tridimensional ya que la proteínas es un componente esencial de los tejidos biológicos, por lo que su ausencia cambia la apariencia y propiedades de la piel de tilapia. También es importante mencionar que la presión que alcanzó la muestra en el autoclave (15 atmósferas de presión), afecta también la textura de la piel. Ambos componentes, tanto el calor como la presión pueden disminuir los pigmentos naturales que se encuentran en la muestra de piel y por ello se observa una piel más transparente y con ausencia de agua, es decir, más deshidratada comparada con el control.

Por último, se observó mediante la estereoscopía la estructura de la muestra sometida al método de esterilización 3 (matriz acelular) 36. Principalmente se observó un cambio en el color de la piel ya que justamente después de agregar el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) cambió de color gris/negro a un color amarillo con blanco. Si bien el peróxido de hidrógeno es una sustancia que tiene un efecto antibacteriano, también es un agente oxidante potente que puede causar combustión cuando entra en contacto con materia orgánica y puede volverse amarillo debido a la formación de peróxido de hidrógeno estabilizado 67.

Al comparar los resultados obtenidos de las muestras histológicas procesadas con Etanol 70 % se pudo identificar que hubo un efecto mínimo en la morfología dérmica. Este efecto podría atribuirse por el efecto deshidratante del Etanol ya que este agente extrae el agua presente en las células y componentes extracelulares. La deshidratación afecta directamente a las células ocasionando la contracción celular y cambios en la arquitectura del tejido, las fibras de colágeno pueden ser sensibles a la deshidratación ya que pueden contraerse y deformarse 68. Es por eso por lo que en la Figura 25 las fibras pueden observarse un poco menos organizadas que en las de la Figura 18, donde sí tienen un patrón de morfología más establecido.

Con respecto a el análisis histológico de las muestras de Autoclave se pudo observar un cambio más significativo en la estructura incluyendo burbujas y perforaciones en el tejido. Estos cambios pueden ser el resultado de la presión y temperaturas extremas, en el caso del colágeno al ser una proteína estructural de triple hélice clave en los tejidos conectivos posee enlaces sensibles a altas temperaturas y alteran la estructura del colágeno [69]. Si bien el Etanol actúa deshidratando el tejido, la autoclave somete las muestras a calor húmedo y presión, lo que puede tener un impacto mayor y afectar directamente la estructura molecular de las proteínas. Sin embargo, es esencial tener en cuenta que, a pesar de una degradación potencial, algunas partes del tejido todavía pueden mantenerse como se observa en la Figura 31 (B).

Además, cuando se realizó la conversión de la piel de tilapia a matriz acelular se provocó una reorganización significativa de las fibras de colágeno. Las fibras de colágeno son proteínas fibrosas secretadas por células del tejido conectivo, como los fibroblastos (músculo liso en los vasos), por lo que la ausencia de estas células también provoca una desvinculación de las fibras, pero a su vez indica una matriz acelular exitosa [70]. Estas matrices son útiles como biomateriales y han sido utilizados con éxito en diversas áreas de la medicina y odontología con el propósito de reconstruir tejido afectado, ya que es un tejido rico en fibras de colágeno tipo I y III, con resistencia a la humedad y estructura similar a la piel humana [71].

Es fundamental destacar que los resultados relacionados con la matriz acelular corroboran hallazgos de investigaciones anteriores, donde no se observó crecimiento bacteriano posterior a la formación de la matriz acelular. No obstante, en este estudio, para confirmar la ausencia de posibles bacterias contaminantes, las muestras fueron sometidas a radioesterilización [10]. Cabe señalar que otros estudios respaldan la viabilidad de una esterilización química efectiva mediante el uso de compuestos alternativos, como las nanopartículas de plata. En investigaciones previas, se demostró que este enfoque previene por completo el crecimiento microbiano, y no se observó ningún cambio en el contenido de colágeno incluso después de someterlo a diferentes tiempos de esterilización con dicho compuesto [11].

Si bien este es el primer paso para obtener pieles de tilapia estériles para aplicaciones en quemaduras, no fue posible realizar pruebas de biocompatibilidad en las que se esperaría tener resultados positivos. Este es un estudio que abre las puertas a más investigaciones en el amplio campo de la ingeniería de tejidos en Guatemala para promover más el uso de nuevas emergentes, económicas y necesarias para la situación médica en el país.

- Los apósitos de piel de tilapia fueron sometidos a diferentes métodos de esterilización incluyendo etanol, autoclave y matriz acelular. Ninguno de los métodos presentó un crecimiento bacteriano significativo inmediatamente después del procedimiento ni durante el período de una semana y un mes posterior. Estos resultados indican la efectividad de los métodos de esterilización empleados para mantener la integridad bacteriana de los apósitos de piel de tilapia a lo largo del tiempo si se mantienen en condiciones adecuadas.
- Los apósitos de piel de tilapia esterilizados por diferentes métodos sufrieron cambios de tinción de color en la composición química de la piel. A diferencia de el método de etanol 70 %, que presentó cambios menores en la estructura superficial de la piel sin afectar su morfología.
- El análisis estereoscópico permitió la identificación precisa de los cambios estructurales que sufren los apósitos a base de piel de tilapia sometidos a cada método de esterilización. Además, se observaron modificaciones en la morfología de la piel, especialmente al utilizar el método de autoclave, destacando la sensibilidad de la piel a las condiciones de esterilización de altas presiones y temperaturas.
- Se identificaron mediante un análisis histológico alteraciones significativas en la estructura de las fibras de colágeno de las muestras de piel procesadas. Los resultados revelaron una desorganización en las muestras tratadas con etanol presentando ligeras rupturas en las fibras, en autoclave mostró presencia de burbujas y perforaciones en los márgenes de la muestra y el método de matriz acelular presentó las fibras de colágeno sin un patrón específico, a diferencia de las muestras de control.

- Realizar experimentos adicionales duplicando o triplicando cada método de esterilización. Ampliar la muestra utilizando pieles de tilapia provenientes de diferentes lagunas para evaluar posibles variaciones en los resultados. Esto permitirá una evaluación más robusta de las diferencias entre los métodos y una comprensión más completa de su eficacia.
- Ampliar la investigación y aplicación de métodos de esterilización, tanto químicos como radiológicos, para comparar el crecimiento bacteriano y la influencia en la estructura de las pieles de tilapia. Explorar nuevas técnicas permitirá identificar métodos más eficientes y seguros, mejorando la calidad y esterilidad de los apósitos.
- Realizar una prueba de análisis a largo plazo de hasta un año con intervalos de verificación de 3 meses para identificar cuánto es el tiempo límite antes de tener un crecimiento bacteriano o perder propiedades beneficiosas como integridad de las fibras de colágeno, una vez que las pieles se encuentren cerradas estérilmente al vacío.
- Adicionalmente, se sugiere expandir el proyecto con pruebas in vitro, en particular pruebas de citotoxicidad. Estas pruebas se realizarán utilizando líneas celulares de fibroblastos, como NIH/3T3, para simular el entorno dérmico y evaluar respuestas específicas. Además, establecer un período de prueba específico para comprender la respuesta a corto y mediano plazo, y por último cuantificar la citotoxicidad mediante ensayos específicos como la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) cuando se tiene un ambiente celular.
- Se recomienda la utilización de un adaptador de teléfono para microscopio con el propósito de fijar el ocular y la cámara, asegurando una fotografía más estable y optimizando la resolución de las imágenes histológicas para una evaluación digital más detallada y precisa, especialmente para utilizar software especializado como Qupath.

- 
- [1] J. Benedí y C. Romero, “Apósitos,” *Farmacia Profesional*, págs. 52-56, 2006. dirección: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-apositos-13089951> (visitado 10-05-2023).
- [2] C. U. de Navarra. “¿Qué es un xenoinjerto?” (2023), dirección: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/xenoinjerto> (visitado 23-04-2023).
- [3] D. K. C. Cooper y R. P. Lanza, *Xeno: The Promise of Transplanting Animal Organs Into Humans*. Oxford: Oxford University Press on Demand, 2000.
- [4] S. L. Hub. “Xenotransplantation – introduction.” (2011), dirección: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1213-xenotransplantation-introduction> (visitado 13-06-2023).
- [5] C. Groth, “The potential advantages of transplanting organs from pig to man: A transplant Surgeon’s view,” *Indian Journal of Urology*, vol. 23, pág. 305, 3 2007, ISSN: 0970-1591. DOI: [10.4103/0970-1591.33729](https://doi.org/10.4103/0970-1591.33729).
- [6] T. Chiu y A. Burd, ““Xenograft” dressing in the treatment of burns,” *Clinics in Dermatology*, vol. 23, págs. 419-423, 4 jul. de 2005, ISSN: 0738081X. DOI: [10.1016/j.clinidermatol.2004.07.027](https://doi.org/10.1016/j.clinidermatol.2004.07.027).
- [7] A. P. Negreiros, N. Alves, M. E. Quezado et al., “Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo,” *Rev Bras Queimaduras*, vol. 14, págs. 203-213, 3 2015.
- [8] MedlinePlus. “Cuidados personales con los colgajos e injertos de piel.” (2022), dirección: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000743.htm> (visitado 23-04-2023).
- [9] B. F. Pujalte, F. P. Llatas, P. D. Fornes, V. M. Mañez y V. L. Fernandez, “Apósitos en el tratamiento de úlceras y heridas,” *Enfermería dermatológica*, págs. 16-19, 2008.
- [10] K. Lv, L. Wang, X. He, W. Li, L. Han y S. Qin, “Application of Tilapia Skin Acellular Dermal Matrix to Induce Acute Skin Wound Repair in Rats,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, feb. de 2022, ISSN: 2296-4185. DOI: [10.3389/fbioe.2021.792344](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.792344).

- [11] A. Ibrahim, D. Hassan, N. Kelany, S. Kotb y M. Soliman, "Validation of Three Different Sterilization Methods of Tilapia Skin Dressing: Impact on Microbiological Enumeration and Collagen Content," *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 7, dic. de 2020, ISSN: 22971769. DOI: [10.3389/fvets.2020.597751](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597751).
- [12] P. Morganti, G. Morganti y C. Colao, "Biofunctional Textiles for Aging Skin," *Biomedicines*, vol. 7, pág. 51, 3 jul. de 2019, ISSN: 2227-9059. DOI: [10.3390/biomedicines7030051](https://doi.org/10.3390/biomedicines7030051).
- [13] MedlinePlus, "Capas de la piel," *Capas de la piel*, nov. de 2022. dirección: [https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp\\_imagepages/8912.htm#:~:text=La%5C%20piel%5C%20es%5C%20el%5C%20%5C%3%5C%B3rgano,bacterias%5C%2C%5C%20sustancias%5C%20qu%5C%3%5C%ADmicas%5C%20y%5C%20temperatura.](https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/8912.htm#:~:text=La%5C%20piel%5C%20es%5C%20el%5C%20%5C%3%5C%B3rgano,bacterias%5C%2C%5C%20sustancias%5C%20qu%5C%3%5C%ADmicas%5C%20y%5C%20temperatura.) (visitado 17-06-2023).
- [14] W. Lopez-Ojeda, A. Pandey, M. A. Alhajj y A. M. Oakley, "Anatomy, Skin (Integument)," *Anatomy, Skin (Integument)*, oct. de 2022. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/#:~:text=The%5C%20skin%5C%20is%5C%20primarily%5C%20made,and%5C%20contributes%5C%20to%5C%20skin%5C%20tone.> (visitado 17-06-2023).
- [15] N. I. of General Medical Sciences, "Quemaduras," *National Institute of General Medical Sciences*, jul. de 2020. dirección: <https://nigms.nih.gov/education/fact-sheets/Pages/burns-spanish.aspx> (visitado 20-05-2023).
- [16] OMS, "Quemaduras," *OMS*, mar. de 2018. dirección: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/burns#:~:text=Las%5C%20quemaduras%5C%20constituyen%5C%20un%5C%20problema,Asia%5C%20Sudoriental%5C%20de%5C%20la%5C%20OMS.> (visitado 17-06-2023).
- [17] M. M. Alajmi, K. H. Aldosari y S. Al-Ghamdi, "Clinical, epidemiological, and management aspects of burn injuries in Saudi Arabia – A cross-sectional study," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 28, págs. 4342-4347, 8 ago. de 2021, ISSN: 1319562X. DOI: [10.1016/j.sjbs.2021.04.021](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.021).
- [18] J. Alipour, Y. Mehdipour y A. Karimi, "Epidemiology and outcome analysis of 3030 burn patients with an ICD-10 approach.," *Annals of burns and fire disasters*, vol. 33, págs. 3-13, 1 mar. de 2020, ISSN: 1592-9558.
- [19] P. Alfonso, C. Morales, M. Annayté, I. Marroquín, A. Cristina y R. Juárez, "Caracterización clínica y epidemiología de pacientes con traumas por quemaduras," Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de San Carlos de Guatemala, Tesis de grado, 2018.
- [20] MSPAS, "Quemaduras pediátricas aumentan en un 20 %," *Prensa Libre*, dic. de 2021. dirección: <https://prensa.gob.gt/comunicado/quemaduras-pediatricas-aumentan-en-un-20> (visitado 18-05-2023).
- [21] J. Román y M. A. Domínguez, "Niños quemados en Guatemala: Noviembre y diciembre son los meses con más casos y en el país, que suman 50 mil al año," *Prensa Libre*, oct. de 2022. dirección: [https://www.prensalibre.com/guatemala/comunitario/ninos-quemados-en-guatemala-noviembre-y-diciembre-son-los-meses-con-mas-casos-y-en-el-pais-que-suman-50-mil-al-ano-breaking/?utm\\_source=modulosPL&utm\\_medium=linkinterno&utm\\_campaign=ux](https://www.prensalibre.com/guatemala/comunitario/ninos-quemados-en-guatemala-noviembre-y-diciembre-son-los-meses-con-mas-casos-y-en-el-pais-que-suman-50-mil-al-ano-breaking/?utm_source=modulosPL&utm_medium=linkinterno&utm_campaign=ux) (visitado 18-05-2023).

- [22] M. B. Dreifke, A. A. Jayasuriya y A. C. Jayasuriya, "Current wound healing procedures and potential care.," *Materials science and engineering. C, Materials for biological applications*, vol. 48, págs. 651-62, mar. de 2015, ISSN: 1873-0191. DOI: [10.1016/j.msec.2014.12.068](https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.068).
- [23] P. A. E. Saavedra, J. V. Leal, C. A. Areda y D. Galato, "The Costs of Burn Victim Hospital Care around the World: A Systematic Review," *Iranian Journal of Public Health*, mayo de 2021, ISSN: 2251-6093. DOI: [10.18502/ijph.v50i5.6104](https://doi.org/10.18502/ijph.v50i5.6104).
- [24] R. Shimizu y K. Kishi, "Skin Graft," *Plastic Surgery International*, vol. 2012, págs. 1-5, feb. de 2012, ISSN: 2090-1461. DOI: [10.1155/2012/563493](https://doi.org/10.1155/2012/563493).
- [25] R. A. Manji, W. Lee y D. K. Cooper, "Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future," *International Journal of Surgery*, vol. 23, págs. 280-284, nov. de 2015, ISSN: 17439191. DOI: [10.1016/j.ijvsu.2015.07.009](https://doi.org/10.1016/j.ijvsu.2015.07.009).
- [26] A. N. Carrier, A. Verma, M. Mohiuddin et al., "Xenotransplantation: A New Era," *Frontiers in Immunology*, vol. 13, jun. de 2022, ISSN: 1664-3224. DOI: [10.3389/fimmu.2022.900594](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.900594).
- [27] E. M. Lima-Junior, M. O. de Moraes Filho, B. A. Costa et al., "Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion," *Journal of Surgical Case Reports*, vol. 2019, 6 jun. de 2019, ISSN: 2042-8812. DOI: [10.1093/jscr/rjz181](https://doi.org/10.1093/jscr/rjz181).
- [28] L. A. L. Paredes, F. F. G. Rosal, A. G. Rivas et al., "Análisis y plan de trabajo estratégico de la agrocadena de la tilapia 2017-2020." dirección: <https://www.maga.gob.gt/download/estrategia-ti20.pdf> (visitado 22-05-2023).
- [29] J. Chen, K. Gao, S. Liu et al., "Fish Collagen Surgical Compress Repairing Characteristics on Wound Healing Process In Vivo.," *Marine drugs*, vol. 17, 1 ene. de 2019, ISSN: 1660-3397. DOI: [10.3390/md17010033](https://doi.org/10.3390/md17010033).
- [30] Z. Hu, P. Yang, C. Zhou, S. Li y P. Hong, "Marine Collagen Peptides from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and Wound Healing Evaluation," *Marine Drugs*, vol. 15, pág. 102, 4 mar. de 2017, ISSN: 1660-3397. DOI: [10.3390/md15040102](https://doi.org/10.3390/md15040102).
- [31] N. L. of Medicine, *Burns*, 2016. dirección: <https://medlineplus.gov/burns.html> (visitado 27-10-2023).
- [32] *Clasificación de las quemaduras*, en. dirección: <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=classificationofburns-90-P09576> (visitado 02-10-2023).
- [33] A. Markiewicz-Gospodarek, M. Koziol, M. Tobiasz, J. Baj, E. Radzikowska-Büchner y A. Przekora, "Burn Wound Healing: clinical complications, medical care, treatment, and dressing types: The Current State of Knowledge for Clinical practice," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 19, n.º 3, pág. 1338, ene. de 2022. DOI: [10.3390/ijerph19031338](https://doi.org/10.3390/ijerph19031338). dirección: <https://doi.org/10.3390/ijerph19031338>.
- [34] D. W. Carter, *Quemaduras*, es, ago. de 2023. dirección: <https://www.msmanuals.com/es/professional/lesiones-y-envenenamientos/quemaduras/quemaduras#:~:text=Fisiopatolog%C3%ADa%20de%20las%20quemaduras&text=Los%20tejidos%20da%C3%B1ados%20a%20menudo,particular%20en%20las%20heridas%20expuestas>. (visitado 27-09-2023).

- [35] “Burns - Diagnosis and treatment,” en, ago. de 2022. dirección: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/burns/diagnosis-treatment/drc-20370545> (visitado 02-10-2023).
- [36] A. M. Chandra. “Burns and scalds: how to treat, do’s and don’ts, and prevention tips - HealthXchange.SG.” (2021), dirección: <https://www.healthxchange.sg/medicine-first-aid/first-aid/burn-injuries-treatment-tips> (visitado 29-11-2023).
- [37] E. of Texas. “Burns: When to visit the ER.” (2022), dirección: <https://www.eroftexas.com/burns/> (visitado 29-11-2023).
- [38] C. M. K. City. “What to expect: Getting a skin graft.” (2023), dirección: <https://www.childrensmercy.org/departments-and-clinics/general-and-thoracic-surgery/burn-and-trauma-care/getting-a-skin-graft/> (visitado 29-11-2023).
- [39] Mediafacil. “Apósito Biosintético Smith Nephew Biobrane.” (2023), dirección: <https://medifacil.com/products/aposito-biosintetico-smith-nephew-biobrane-de-13-x-13-cm> (visitado 29-11-2023).
- [40] M. Moreno, “Éste es el banco de piel de pescado para curar las quemaduras en Brasil,” *El Español*, 2017. dirección: [https://www.elespanol.com/ciencia/salud/20170816/239476416\\_0.html](https://www.elespanol.com/ciencia/salud/20170816/239476416_0.html) (visitado 29-11-2023).
- [41] P. Thangaraj, V. V. Padma y E. Santhini, “Wound Dressings – a review,” *Biomedicine*, vol. 5, n.º 4, nov. de 2015. DOI: [10.7603/s40681-015-0022-9](https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9). dirección: <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>.
- [42] FDA, *Xenotransplantation*, 2021. dirección: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/xenotransplantation>.
- [43] G. S. Alliance, *Evaluating genetic parameters for resistance to Tilapia Lake virus in Nile Tilapia - Responsible Seafood Advocate*, 2020. dirección: <https://www.globalseafood.org/advocate/evaluating-genetic-parameters-for-resistance-to-tilapia-lake-virus-in-nile-tilapia/> (visitado 30-11-2023).
- [44] F. Jones, *In the skin of Tilapia*, 2019. dirección: <https://revistapesquisa.fapesp.br/en/in-the-skin-of-tilapia/> (visitado 30-11-2023).
- [45] S. Mohapatra, “Sterilization and disinfection,” en *Elsevier eBooks*. ene. de 2017, págs. 929-944. DOI: [10.1016/b978-0-12-805299-0.00059-2](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805299-0.00059-2). dirección: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805299-0.00059-2>.
- [46] RAYPA. “Autoclaves de laboratorio horizontales de sobremesa de 22-79L.” (2019), dirección: <https://www.raypa.com/prod/autoclaves-sin-secado-ahs-n-2/> (visitado 30-11-2023).
- [47] *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare. Obtenido de Centers for Disease Control and Prevention*, 2008. dirección: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines-H.pdf> (visitado 02-10-2023).
- [48] L. F. de Magalhães Brito y D. Magagna, “114 - Sanitation,” en *Clinical Engineering Handbook*, ép. Biomedical Engineering, J. F. Dyro, ed., Burlington: Academic Press, 2004, págs. 532-546, ISBN: 978-0-12-226570-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012226570-9/50125-3>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780122265709501253>.

- [49] J. N. Kearney, "Guidelines on Processing and Clinical use of skin allografts," *Clinics in Dermatology*, vol. 23, n.º 4, págs. 357-364, jul. de 2005. DOI: [10.1016/j.clindermatol.2004.07.018](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.07.018), dirección: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.07.018>.
- [50] A. Merivaara, J. Zini, E. Koivunotko et al., "Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: change of paradigm," *Journal of Controlled Release*, vol. 336, págs. 480-498, ago. de 2021. DOI: [10.1016/j.jconrel.2021.06.042](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042), dirección: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>.
- [51] Telstar. "Liofilizador de sobremesa para investigación básica LyoQuest - Telstar-2022." (2022), dirección: <https://www.telstar.com/es/equipos-para-laboratorios-del-sector-de-las-ciencias-de-la-vida-y-para-hospitales/liofilizadores-de-laboratorio/liofilizador-de-sobremesa-para-investigacion-basica/> (visitado 29-11-2023).
- [52] H. Capella-Monsonís y D. I. Zeugolis, "Decellularized xenografts in Regenerative Medicine: From processing to clinical application," *Xenotransplantation*, vol. 28, n.º 4, mar. de 2021. DOI: [10.1111/xen.12683](https://doi.org/10.1111/xen.12683), dirección: <https://doi.org/10.1111/xen.12683>.
- [53] M.-J. Hernández-Navarrete, J.-M. Celorrio-Pascual, C. L. Moros y V.-M. S. Bernad, "Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, vol. 32, n.º 10, págs. 681-688, dic. de 2014. DOI: [10.1016/j.eimc.2014.04.003](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.04.003), dirección: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.04.003>.
- [54] E. Font, *Antisépticos y desinfectantes*, es, feb. de 2001. dirección: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-antisepticos-desinfectantes-13780> (visitado 02-10-2023).
- [55] C. for Devices y R. Health, "Sterilization for medical devices," en, *U.S. Food and Drug Administration*, jul. de 2023. dirección: <https://www.fda.gov/medical-devices/general-hospital-devices-and-supplies/sterilization-medical-devices#:~:text=0n%20April%2011%2C%202023%2C%20the,gamma%20radiation%2C%20or%20ethylene%20oxide.>
- [56] T. S. Gurina, *Histology, staining*, en, mayo de 2023. dirección: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557663/> (visitado 02-10-2023).
- [57] P. Steward Karen, *An introduction to culturing bacteria*, 2022. dirección: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/an-introduction-to-culturing-bacteria-355566> (visitado 30-11-2023).
- [58] H. Ahern, *Bacteriological culture methods*, 2021. dirección: <https://milnepublishing.geneseo.edu/suny-microbiology-lab/chapter/bacteriological-culture-methods/> (visitado 30-11-2023).
- [59] V. diagnostics, *Agar Sangre CNA*, 2021. dirección: [www.valtek.cl](http://www.valtek.cl).
- [60] "Cuidados personales en casa - infecciones por estafilococos: MedlinePlus Enciclopedia Médica." (2023), dirección: [https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000686.htm#:~:text=El%20estafilococo%20\(staphylococcus%20o%20su,en%20cualquier%20parte%20del%20cuerpo.](https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000686.htm#:~:text=El%20estafilococo%20(staphylococcus%20o%20su,en%20cualquier%20parte%20del%20cuerpo.) (visitado 30-11-2023).

- [61] A. Eldar, A. Horovitz y H. Bercovier, “Development and efficacy of a vaccine against streptococcus INIAE infection in farmed rainbow trout,” *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 56, n.º 1-2, págs. 175-183, mayo de 1997. DOI: [10.1016/s0165-2427\(96\)05738-8](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(96)05738-8). dirección: [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(96\)05738-8](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(96)05738-8).
- [62] V. diagnostics, *Agar MacConkey*, 2021. dirección: [www.valtek.cl](http://www.valtek.cl).
- [63] V. diagnostics, *Agar Cromo Orientación*, 2021. dirección: [www.valtek.cl](http://www.valtek.cl).
- [64] V. diagnostics, *Agar Plate Count*, 2021. dirección: [www.valtek.cl](http://www.valtek.cl).
- [65] A. A. de Farmacéuticos de Hospital (AAFH), *Alcohol Etílico como Antiséptico y Desinfectante*, nov. de 2020.
- [66] C. for Disease Control y Prevention, “Steam Sterilization.” dirección: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/steam.html> (visitado 27-09-2023).
- [67] M. Finnegan, E. Linley, S. P. Denyer, G. McDonnell, C. Simons y J.-Y. Maillard, “Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 65, n.º 10, págs. 2108-2115, 2010. DOI: [10.1093/jac/dkq308](https://doi.org/10.1093/jac/dkq308). dirección: <https://doi.org/10.1093/jac/dkq308>.
- [68] D. J. R. E. Mairena, “Efecto del Etanol sobre las Membranas Biológicas<sub>1993</sub>,” *Revista Médica Hondureña*, págs. 20-24, 1993.
- [69] K. Barrett, *Fisiología médica* (A Lange medical book). McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2010, ISBN: 9786071503053. dirección: <https://books.google.com.gt/books?id=w74YcgAACAAJ>.
- [70] M. O. Erijman y L. Silvio, “Aspectos fisiopatológicos y moleculares en la remodelación de la matriz extracelular vascular,” *Revista argentina de cardiología*, 2007. dirección: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1850-37482007000200011](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-37482007000200011) (visitado 04-12-2023).
- [71] L. A. Gómez, K. T. Gonzáles Sierra, Y. A. Carvajalino y S. S. Cortés, “Xenoinjertos de piel de tilapia en quemaduras cutáneas. Una revisión exploratoria,” *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, vol. 49, n.º 3, págs. 309-314, 2023.