

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Hospital Universitario Austral - Research and Development

*“MODELOS EXPERIMENTALES PARA AISLAMIENTO Y
MANTENIMIENTO IN VITRO DE QUERATINOCITOS Y
FIBROBLASTOS HUMANOS Y SU UTILIZACIÓN EN UNA
MATRIZ CON POTENCIAL EN INGENIERÍA DE TEJIDOS”*

Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

SILVIA ELENA CASTRO PIEDRA

CARTAGO, SETIEMBRE, 2009

**“MODELOS EXPERIMENTALES PARA AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO
IN VITRO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS HUMANOS Y SU
UTILIZACIÓN EN UNA MATRIZ CON POTENCIAL EN INGENIERÍA DE
TEJIDOS”**

Silvia Elena Castro Piedra¹

RESUMEN

La Ingeniería de Tejidos apunta al desarrollo de reemplazos dermo-epidérmicos, en lesiones cutáneas. Fibroblastos y queratinocitos humanos fueron cultivados, optimizando características y requerimientos para su desarrollo *in vitro*, para luego ser sembradas sobre un andamio tridimensional (MatriStem®). Se estudió su desarrollo, morfología y viabilidad. Fueron considerados: adhesión inicial, inóculo a sembrar, interacción célula-célula y célula-sustrato, y medio de cultivo. Se observó que los fibroblastos son células más nobles de cultivar que los queratinocitos. MatriStem® brindó una base estructural que favorece la adhesión y el reordenamiento de las células, sumamente atractivo para el desarrollo de sustitutos cutáneos, que al tensarla ligeramente, permite a las células adoptar un alineamiento determinado, brindando una organización similar al tejido *in vivo*.

Palabras clave: Cultivo celular, Ingeniería de Tejidos, Fibroblastos, Queratinocitos

¹ INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica, 2009.

“EXPERIMENTAL MODELS FOR ISOLATION AND MANTEINANCE OF FIBROBLAST AND KERATINOCYTES IN VITRO AND DEVELOPMENT OF A SYNTHETIC SKIN GRAFT WITH THE CELLS AND PORCINE DERIVED SCAFFOLD WITH TISSUE ENGINEERING POTENCIAL”

Silvia Elena Castro Piedra²

ABSTRACT

The Tissue Engineering look forward for the development of dermal-epidermal graft in wound healing. Fibroblast and keratinocytes were cultivated looking for the best techniques for their *in vitro* development and then inoculated over tridimensional synthetic scaffold called MatriStem[®]. Their development, morphology and viability were studied and analyzed. The first adhesion, amount to lay in the culture dishes per cm², cell-cell interaction and cell-substrate interaction and media were determinant in the success of the culture. The fibroblasts are easier to culture than the keratinocytes that require more specific thing environment similar to the *in vivo* environment. MatriStem[®] gave a structural base that increases the cell adhesion, organization very close to the *in vivo* organization, giving a great potential for the regeneration of the skin in deep a big wounds.

Keywords: Cell Culture, Tissue Engineering, Fibroblast, Keratinocytes

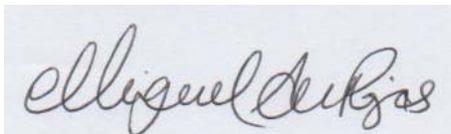
² INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica, 2009.

ACREDITACIÓN

“MODELOS EXPERIMENTALES PARA AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO IN VITRO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS HUMANOS Y SU UTILIZACIÓN EN UNA MATRIZ CON POTENCIAL EN INGENIERÍA DE TEJIDOS”

Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

Miembros de Tribunal



PhD. Miguel Rojas Chávez
Profesor Asesor - ITCR



Dra. Alicia Lorenti
Asesor – Hospital

Licda. Marta Martínez
Lectora

DEDICATORIA

A mi madre que ha dedicado todos sus
esfuerzos para la crianza de sus hijos.

A familia y amigos que siempre estuvieron
en el lugar y en el momento exacto
que los necesitaba y sin pedirlo.

Silvia.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecerle a la empresa Pfizer, al CONICIT, al MICIT y al ITCR por su apoyo económico, ya que sin el mismo, no hubiera sido posible la realización del proyecto.

Al Dr. Miguel Rojas que desde el principio de la carrera y durante la realización de la práctica me brindó todo su apoyo, confianza y sabiduría.

A la Dra. Alicia Lorenti, a bióloga Florencia Callero, al Dr. Alejandro Nieponice que fueron incondicionales en su colaboración y guía.

A la Ing. Laura Calvo Castro y a la Licda. Marta Martínez, por su disposición y sus valiosos consejos.

ÍNDICE GENERAL

SILVIA ELENA CASTRO PIEDRA	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
ACREDITACIÓN	4
DEDICATORIA	5
AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
1. REVISION DE LITERATURA	21
1.1 Función y estructura de la piel	21
1.1.1 La matriz extracelular y sus componentes	23
1.1.2 Proteínas estructurales: El colágeno y la elastina.....	24
1.1.3 Los glicosaminoglicanos o GAGs.....	25
1.1.4 Proteínas de adhesión de la matriz extracelular	26
1.1.5 Uniones intercelulares de las células dérmicas y epidérmicas	27
1.1.6 Factores de crecimiento (FC).....	30
1.2 Historia de cultivo celular y antecedentes de cultivo de piel	31
1.2.1 Aislamiento de células epidérmicas y dérmicas.....	33
1.2.2 Mantenimiento de células epidérmicas y dérmicas en cultivo.....	34

1.2.2.1. Cambios de medio de cultivo	35
1.2.2.2. Subcultivo de las células.....	35
1.3 Ingeniería de Tejidos (IT)	36
1.3.1 Historia y antecedentes.....	36
1.3.2 Función de las células en la IT, pequeñas fábricas	37
1.3.3 Origen y fuentes de células para la IT de las células	38
1.3.4 Biomateriales para la IT.....	39
1.3.4.1 Función del Biomaterial	40
1.3.4.2 Tipos de Biomateriales	42
1.3.5 Ingeniería de Tejidos en el reemplazo de piel.....	44
1.4 MatriStem ®, matriz a evaluar	48
1.4.1 Preparación de MatriStem®	50
2. MATERIALES Y MÉTODOS	51
2.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS Y MANTENIMIENTO DE SUBCULTIVOS IN VITRO.....	51
2.1.1 Procesamiento de la muestra.....	51
2.1.1.1 Aislamiento y siembra de queratinocitos	52
2.1.1.2 Aislamiento y siembra de fibroblastos	53
2.1.2 Conteo celular y viabilidad celular	54
2.1.3 Subcultivo de células	54
2.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS IN VITRO	55
2.2.1 Eficiencia de levantamiento de fibroblastos por método enzimático y mecánico	55
2.2.2 Cálculo del inóculo mínimo a sembrar de fibroblastos y queratinocitos.	56
2.2.2.1 <i>Fibroblastos subcultivados</i>	56

2.2.2.2 <i>Queratinocitos subcultivados</i>	56
2.2.3 Evaluación de un recubrimiento de Ácido Hialurónico a diferentes concentraciones, y Colágeno tipo I, sobre el comportamiento fibroblastos y queratinocitos subcultivados.....	56
2.2.3.1 <i>Preparación de los recubrimientos</i>	56
2.2.3.2 <i>Sembrado fibroblastos subcultivados</i>	57
2.2.3.3 <i>Sembrado de queratinocitos subcultivados</i>	58
2.2.4 Eficiencia de sembrado de fibroblastos subcultivados.....	58
2.2.5 Ensayo de <i>wound healing</i> : Migración celular de fibroblastos y queratinocitos.....	59
2.2.5.1 <i>Fibroblastos subcultivados</i>	59
2.2.5.1 <i>Queratinocitos subcultivados</i>	59
2.3.1 Preparación de la membrana.....	60
2.3.2 Sembrado de fibroblastos.....	60
2.3.3 Evaluación de las células sobre el andamio con microscopia de Fluorescencia.....	60
3 RESULTADOS	61
3.1 PROCESAMIENTO DE LAS DISTINTAS MUESTRAS: AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS Y MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO.....	61
3.2 ENSAYOS IN VITRO.....	64
3.2.1 Comparación en la eficiencia de levantamiento de fibroblastos por método enzimático y mecánico	64
3.2.2 Calculo del inóculo mínimo a sembrar de fibroblastos y queratinocitos.....	66
3.2.3 Evaluación de la adherencia celular sobre un recubrimiento de Ácido Hialurónico a diferentes concentraciones, y Colágeno tipo I.....	68
3.2.3.1 <i>Adhesión de fibroblastos subcultivados</i>	68
3.2.3.2 <i>Adhesión de queratinocitos subcultivados a diferentes recubrimientos</i>	70

3.2.4 Eficiencia de sembrado de fibroblastos subcultivados.....	72
3.2.5 Capacidad de migración de fibroblastos y queratinocitos: Ensayos de <i>wound healing</i>	73
3.2.5.1 Migración de fibroblastos subcultivados.....	73
3.2.5.2 Migración de queratinocitos subcultivados.....	73
3.3 PRUEBAS CON MATRISTEM®	75
3.3.1 Análisis de la morfología celular.....	75
3.3.1.1 Membrana sin tensar con fibroblastos.....	75
3.3.1.2 Membrana tensada con fibroblastos.....	76
4.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRA AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO EN CULTIVO DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS	78
4.2 PRUEBAS DE CULTIVO CELULAR IN VITRO	85
4.2.1 Comparación en la eficiencia de levantamiento de fibroblastos enzimática y mecánicamente	85
4.2.2 Cálculo de la cantidad mínima a sembrar de fibroblastos y queratinocitos. ..	86
4.2.3 Evaluación de un recubrimiento de Ácido Hialurónico a diferentes concentraciones, y Colágeno tipo I.	87
4.2.4 Eficiencia de sembrado de fibroblastos.....	90
4.2.5 Migración celular de fibroblastos y queratinocitos	91
4.3 PRUEBAS CON MATRISTEM®	93
4.3.1 Análisis de la morfología celular por microscopia de fluorescencia	93
5. CONCLUSIONES	94
5. CONCLUSIONES	94
6. RECOMENDACIONES	96
7. BIBLIOGRAFÍA	97
8. APÉNDICES.....	104

Figura 8.16. Sembrado de células sobre el “Biorreactor”	9. ANEXOS	113
9. ANEXOS		114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales componentes de la matriz extracelular de la pie.....	23
Tabla 2. Cantidad y viabilidad de las células obtenidas por levantamiento enzimático y mecánico en una muestra de fibroblastos.....	65
Tabla 3. Cantidad mínima a sembrar de células por cm ² , de fibroblastos con diferentes pasajes.	66
Tabla 4. Eficiencia de sembrado de fibroblastos.....	72
Tabla 5. Historia y evolución del cultivo celular.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura tridimensional de la piel humana.....	21
Figura 1.2. Capas de la epidermis.....	22
Figura 1.3. Estructura básica del colágeno.....	24
Figura 1.4. Estructura de la elastina, y enlaces intermoleculares.....	25
Figura 1.5. Estructura molecular del Ácido Hialurónico.....	26
Figura 1.6. Interacciones entre la laminina, fibronectina e integrina con la MEC.....	27
Figura 1.7. Moléculas responsables de la unión célula-célula y célula-sustrato.....	29
Figura 1.8. Ilustración de los cruces o uniones intercelulares.....	29
Figura 1.9. Uniones celulares y contacto con el citoesqueleto.....	30
Figura 1.10. Línea del tiempo de la utilización de los polímeros en el área médica.....	40
Figura 1.11. Clasificación de los biomateriales según su fuente o composición.....	42
Figura 1.12. Andamio y eventos que determinan el desarrollo del tejido.....	44
Figura 1.13. Principales productos desarrollados por la IT para la cobertura de piel....	46
Figura 1.14. Proceso general para la creación de sustitutos de piel por IT.....	47
Figura 1.15. Diseño de MatriStem, MEC hecha a partir de vejiga de cerdo.....	49
Figura 3.1. Imágenes de los queratinocitos primarios.....	62
Figura 3.2. Queratinocitos aislados de la muestra P00409.....	62
Figura 3.3. Queratinocitos aislados de la muestra P00509.....	63
Figura 3.4. Fibroblastos primarios confluentes.....	64
Figura 3.5. Fibroblastos primarios de la muestra P00409.....	64
Figura 3.6. Muestra del levantamiento mecánico con rastrillo.....	65
Figura 3.7. Muestra levantada enzimáticamente con Tripsina-EDTA.....	66
Figura 3.8. Fibroblastos P4, a los 10 días de cultivo con un inóculo de 72 cél/cm ²	67
Figura 3.9. Confluencia obtenida con diferentes concentraciones de fibroblastos P8...	67
Figura 3.10. Estado de los queratinocitos sembrados a diferentes concentraciones.....	68
Figura 3.11. Fibroblastos de pasaje 1 en cada uno de los diferentes recubrimientos...	69

Figura 3.12. Fibroblastos de pasaje 16 en cada uno de los diferentes recubrimientos...	70
Figura 3.13. Queratinocitos sobre los diferentes recubrimientos.....	71
Figura 3.14. Queratinocitos subcultivados al día 13 de cultivo sobre los recubrimientos.....	72
Figura 3.15. Imágenes de la migración de los fibroblastos a diferentes tiempos.....	73
Figura 3.16. Migración de queratinocitos en la zona 1 de la placa.....	74
Figura 3.17. Migración de queratinocitos en la zona 2 de la placa.....	74
Figura 3.18. Citoesqueleto de los fibroblastos sembrados sobre Matristem® sin tensor..	75
Figura 3.19. Núcleos de los fibroblastos sembrados sobre Matristem® sin tensor.....	76
Figura 3.20. Citoesqueleto de los fibroblastos sembrados sobre Matristem tensada....	76
Figura 3.21. Núcleos de los fibroblastos sembrados sobre la Matristem tensada.....	77
Figura 4.1. Gráfico de crecimiento logarítmico celular.....	79
Figura 4.2. Confluencia ideal (70-80%) el subcultivo de fibroblastos.....	84
Figura 4.3. Puente formado a los 3 días por los queratinocitos sobre el sitio de la herida.....	92
Figura 8.1. Muestra P00509, antes del procesamiento.....	106
Figura 8.2 Muestra P00509, después limpiada.....	106
Figura 8.3 Muestra P00509, después del tercer lavado con PBS y antibiótico.....	107
Figura 8.4 Muestra P00609, antes de ser procesada.....	107
Figura 8.5. Muestra P00609, después del tercer lavado.....	108
Figura 8.6. Muestra P00709, antes del procesamiento.....	108
Figura 8.7. Muestra P00809, antes del procesamiento.....	109
Figura 8.8. Fibroblastos pasaje 4 y 14.....	109
Figura 8.9 Fibroblastos pasaje 8.....	110
Figura 8.10. Queratinocitos pasaje 3.....	110
Figura 8.11. Fibroblastos pasaje 1.....	111
Figura 8.12. Fibroblastos pasaje 16.....	111

Figura 8.13. Queratinocitos P1	112
Figura 8.14. Ensayo de eficiencia de sembrado.....	112
Figura 8.15. Elaboración del “Biorreactor”	113
Figura 8.16. Elaboración del “Biorreactor”: colocación de células.....	113

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Historia del cultivo celular.....	114
---	-----

INTRODUCCIÓN

Las pérdidas funcionales de órganos y tejidos siguen siendo un problema frecuente, caro y grave a nivel mundial, a pesar de los grandes avances de la tecnología médica.

La piel constituye el órgano más grande del cuerpo humano, cuya función es evitar la pérdida de líquidos y proteger al individuo de las agresiones del medio ambiente, jugando además un papel importante en otras funciones vitales tales como metabólicas, nerviosa y psicológica (Gartner y Hiatt, 2002).

Como órgano, la piel, al estar en contacto directo con el ambiente, es susceptible a múltiples enfermedades, accidentes, traumatismos o cirugías extensas, que afectan mundialmente a miles de personas. El cáncer, las quemaduras y las úlceras son algunas de las enfermedades involucradas en alteraciones o pérdidas de piel.

En Costa Rica, por año, se producen aproximadamente 63 casos de quemaduras por cada 100 000 habitantes, siendo las principales víctimas los niños. Las áreas más susceptibles a las quemaduras son las partes superiores (brazos, torso y hombros) (Espinoza y Barahona, 2003).

En el caso de las quemaduras, la lesión de la piel propiamente dicha está acompañada por numerosas patologías asociadas, como deshidratación del paciente, susceptibilidad a contraer infecciones intrahospitalarias, entre otras. Es por ello que surge la necesidad de contar con estrategias que permitan cerrar las heridas de los pacientes en forma rápida y permanente.

El problema fundamental para este tipo de pacientes es la cobertura de grandes superficies de piel con quemaduras profundas. Históricamente, superficies pequeñas o medianas de quemaduras profundas fueron cubiertas con autoinjerto, es decir, tomar piel de zonas sanas para cubrir las regiones lesionadas. Sin embargo, cuando las quemaduras son extensas y profundas, la cantidad disponible de piel sana para autoinjerto es insuficiente. Es por ello que se han hecho múltiples intentos de obtener un sustituto cutáneo utilizando técnicas de cultivo celular, que permitieran amplificar las propias células del paciente. Pero sólo los grandes avances hechos en biología celular en el siglo XX permitieron, a partir de la década de los años 50, que se iniciaran y se desarrollaran diversas técnicas que permitieran alcanzar ese objetivo.

Cuando una enfermedad o lesión daña la piel en grandes extensiones, la Ingeniería de Tejidos puede proveer una alternativa innovadora, haciendo la diferencia entre la vida y la muerte (Mackneil, 2007; Vacanti *et al*, 1997). Con la toma de una pequeña muestra de tejido sano del paciente, es posible aislar, cultivar y expandir una gran cantidad de células *in vitro*, haciendo posible que éstas puedan sobrevivir y ser trasplantadas al paciente. Hasta la fecha múltiples investigaciones han sido llevadas a cabo con resultados prometedores (Gaspar *et al* 2006; Mackneil, 2007), mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Adicionalmente, se han venido estudiando múltiples técnicas de cultivo celular *in vitro* (Chaudhuri y Al-Rubeai, 2005; Langer y Vacanti, 1993), así como el uso de diversos medios de cultivo que provean nutrientes adecuados para el desarrollo exitoso de las células epidérmicas y dérmicas. Además de obtener una buena cantidad de células disponibles para trasplantar en el sitio de la herida, es necesario la utilización de un material que sea capaz de brindar un ambiente espacial adecuado para la adhesión, migración y proliferación para las células, con el fin de hacer un andamio que mimetice de la forma más parecida a la estructura de la piel (Freed *et al* 1994; Hutmacher, 2000).

Desde 1980, se han venido analizando y estudiando diversas fuentes, para la fabricación de estos andamios. Costa Rica, no es la excepción. A inicios del año 2002, un grupo de investigadores, pertenecientes a hospitales y universidades públicas iniciaron ensayos experimentales de cultivo *in vitro* de fibroblastos y queratinocitos para el tratamiento de quemaduras y úlceras principalmente (Rojas *et al*, 2005).

A partir de estos ensayos se empiezan a estudiar, además, diversas materias primas como el colágeno y el quitosano a partir de desechos de tilapia y camarón respectivamente, para la elaboración de biomateriales que cuenten con potencial para la regeneración de la piel (Sanchez *et al*, 2007; Sibaja *et al*, 2007).

A pesar de todos estos esfuerzos aún quedan muchos retos, como la optimización de protocolos de aislamiento y mantenimiento de células *in vitro* y la búsqueda de un material ideal que funcione como soporte para las mismas, y que además cuente con características estructurales y funcionales de la matriz extracelular (MEC) de la piel, así como lograr desarrollos que sean económicamente sustentables, con el fin de estandarizar y manejar una terapia que llegue al alcance de todos los afectados (Mackneil, 2007). En el presente trabajo, se llevaron a cabo diferentes ensayos con el fin de optimizar las condiciones para el cultivo de estas células; además se analizó el uso de un andamio biológico con el fin de determinar su potencial uso en la Ingeniería de Tejidos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sustituto dermo-epidérmico, mediante técnicas de Ingeniería de Tejidos, para ser utilizado como coberturas definitiva en casos de pérdidas cutáneas producidas por diversas enfermedades, como quemaduras, úlceras crónicas, resecciones quirúrgicas, y otras.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar una técnica efectiva para la obtención, aislamiento, cultivo y subcultivos de fibroblastos *in vitro* a partir de la dermis proveniente de una muestra de piel autóloga de pacientes.

Desarrollar una técnica efectiva para la obtención, aislamiento, cultivo y subcultivos de queratinocitos de la epidermis provenientes de muestras de piel autóloga de pacientes.

Probar los efectos de una matriz biológica (MatriStem®) sobre la morfología, viabilidad y disposición espacial de fibroblastos cultivados sobre la misma.

1. REVISION DE LITERATURA

1.1 Función y estructura de la piel

La piel humana, órgano más grande del cuerpo, provee regulación térmica, previene la deshidratación y protege contra agentes químicos o infecciosos (Mast, 1992).

La piel esta anatómicamente dividida en dos capas: la epidermis y la dermis (Figura 1.1).

La epidermis es superficial, es la capa protectora, y la dermis provee firmeza y elasticidad.

La epidermis consiste en varias capas de células epiteliales (queratinocitos), y se encuentra adherida a la dermis por la membrana basal.

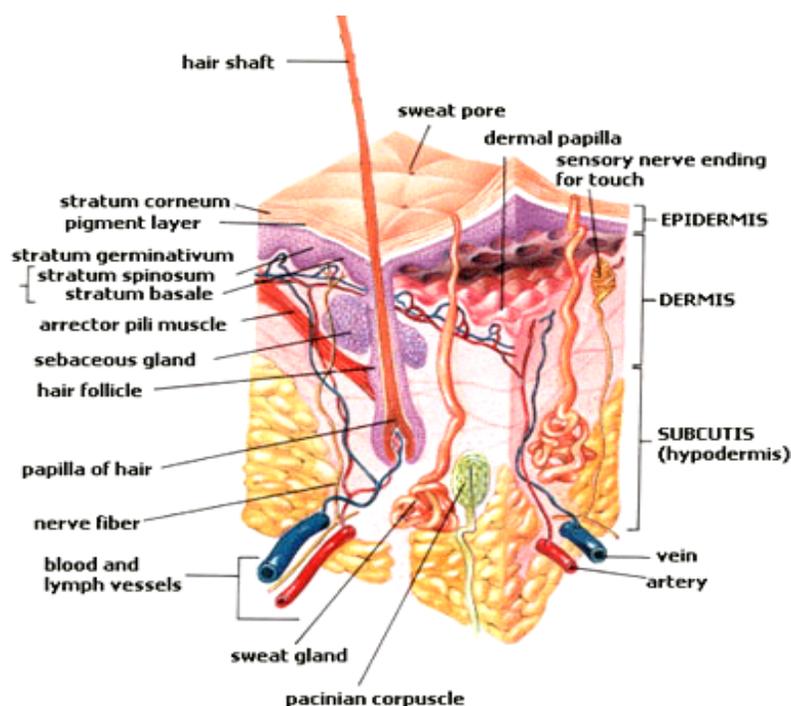


Figura 1.1. Estructura tridimensional de la piel humana. **Fuente:** Mackneil, 2007

Los queratinocitos son las células predominantes (90%) de la epidermis. La epidermis se divide en cinco capas (Ver Figura 1.2) en las que, los queratinocitos van atravesando distintos estadios de diferenciación. Las capas epidérmicas son, del interior al exterior: (Geneser, 2000):

- a. Capa germinativa o basal: cuenta con los queratinocitos menos diferenciados, presentan uniones desmosómicas entre sí, y se anclan a la membrana basal por uniones hemidesmosómicas.
- b. Capa espinosa: se conforma por células de características basofílicas.
- c. Capa granulosa: se compone de tres a cinco capas de células aplanadas, cuyo citosol contiene gránulos basófilos denominados gránulos de queratohialina precursora de la queratina.
- d. Capa lúcida: los núcleos de las células se comienzan a degenerar.
- e. Capa córnea: es la capa más superficial, contiene células planas queratinizadas anucleadas: los corneocitos. Compuestos mayormente por queratina.

Los queratinocitos están en continua renovación y pasan progresivamente de la capa basal a las zonas superiores, por diferenciación celular, hasta la capa córnea (MackNeil, 2007).

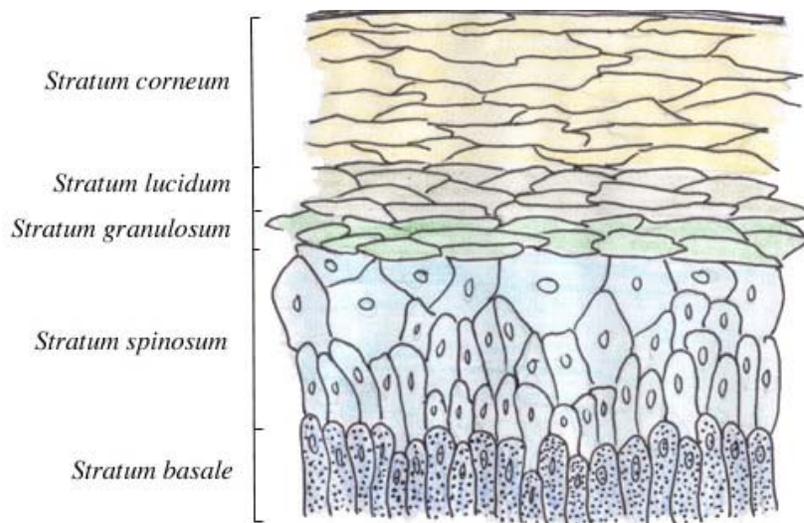


Figura 1.2. Capas de la epidermis. **Fuente:** www.ratbehavior.org, 2004

La dermis, por su parte, está compuesta por tejido conectivo donde sus células, los fibroblastos, están rodeados de una matriz de colágeno, especialmente colágeno tipo I, elastina, polisacáridos (glicoaminoglicanos o GAGs), y proteínas adhesivas (fibronectina

y laminina), que proveen un soporte estructural para la piel. Esta capa también contiene vasos sanguíneos, folículos pilosos y glándulas sebáceas (Mast, 1992). Varía en grosor dependiendo del sitio del cuerpo. Esta capa se encuentra bien vascularizada y contiene receptores de tacto, temperatura y dolor. (MackNeil, 2007).

1.1.1 La matriz extracelular y sus componentes

La matriz extracelular (MEC) es el conjunto de todos aquellos componentes extracelulares que rodean la célula. Su composición varía de acuerdo del tipo de tejido del que se trate, siendo las células de dicho tejido las encargadas de su síntesis (Cuadro 1).

Tabla 1. Principales componentes de la matriz extracelular de la piel

Agua		
Salas minerales		
Polisacáridos	Glicosaminoglicanos	Ácido hialurónico
		Condroitinsulfato
		Dermatán-sulfato
		Heparán-sulfato
		Heparina
Queratán-sulfato		
	Proteoglucanos	Núcleo proteico + glucosaminoglucanos
	Agregados de proteoglucanos	Ácido hialurónico + proteoglucanos
Proteínas	Proteínas estructurales	Colágenos (unas 30 variedades)
		Elastina + fibrilina + emilina
	Proteínas de adherencia	Fibronectina
		Lamininas (diversas variedades)
	Moléculas diversas	SPARC Fibulina Nidógeno-entactina Vitronectina, etc. + moléculas de la MEC del cartilago + moléculas de la MEC del hueso
Moléculas de señalización «secuestradas en la MEC»		Citocinas +++
		Hormonas
		Neurotransmisores

Nota: +solo en ciertas matrices extracelulares. **Fuente:** Alberts *et al*, 1994

Las fibras de colágeno fortalecen y ayudan a organizar la MEC, y las fibras de elastina proveen elasticidad. La fase gelificada de la matriz, altamente hidratada, resiste las fuerzas

compresivas en la MEC. La fase acuosa permite la rápida difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre la sangre y las células del tejido. Las proteínas adhesivas ayudan a la unión de las células a la MEC. La matriz dérmica influye en el desarrollo de los fibroblastos y queratinocitos en la migración, proliferación, morfología y función (Alberts *et al*, 1994).

1.1.2 Proteínas estructurales: El colágeno y la elastina

Hay diferentes tipos de colágeno en la piel (Figura 1.3). El colágeno tipo I es el principal constituyente de la piel (Alberts *et al*, 1994). El tipo III, está codistribuido con el tipo I. Estos dos tipos de colágeno forman fibrillas que brindan resistencia a la tensión. El colágeno tipo IV forma la lámina basal, entre la epidermis y la dermis por asociación para formar una red. El colágeno VII forma fibrillas de anclado que se encuentran en la interfase entre el epitelio y la membrana basal (Tryggvason, 1995).

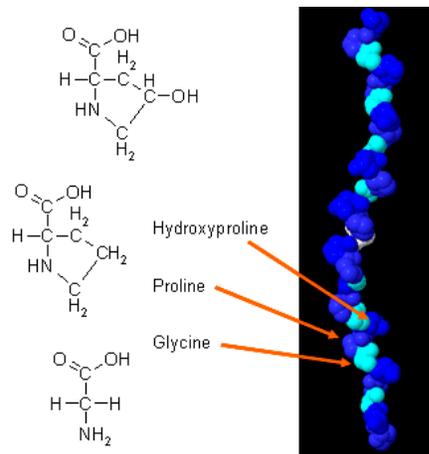


Figura 1.3. Estructura básica del colágeno. **Fuente:** <https://chempolymerproject.wikispaces.com>, 2007

Otra de las proteínas de la MEC, la elastina, está en forma de red de fibras elásticas, y es la responsable de proveer la elasticidad. Fibras largas de colágeno están entretejidas con las fibras elásticas para prevenir el desgarre de la piel (Figura 1.4).

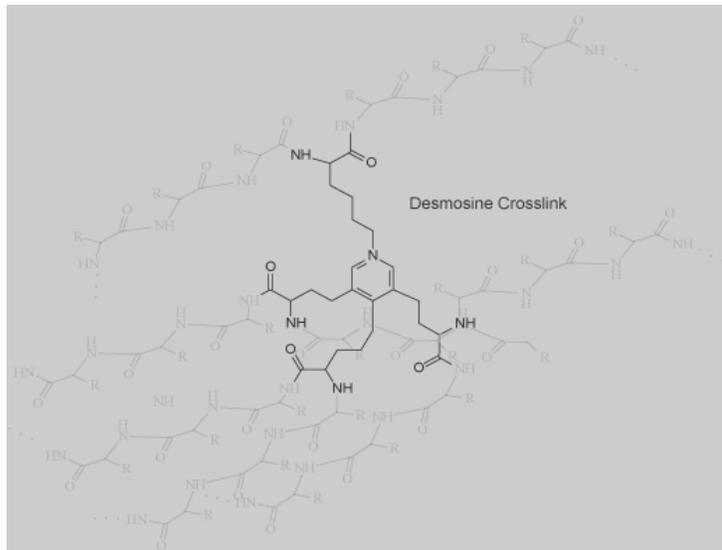


Figura 1.4. Estructura de la elastina, y enlaces intermoleculares. **Fuente:** www.sigmaaldrich.com, 2009

1.1.3 Los glicosaminoglicanos o GAGs

Los GAGs forman un gel altamente hidratado que rodea las proteínas fibrosas y resiste las fuerzas compresivas de la matriz (Alberts *et al*, 1994). Son polisacáridos (glicanos) que contienen hexosaminas (glicosamino) (Silbert, 1983). Debido a los grupos sulfato o carboxilo en la mayoría de los residuos de azúcar, los GAGs están cargados negativamente.

Los GAGs de la piel incluyen ácido hialurónico (AH), condroitina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato, dermatan sulfato, heparina y heparan sulfato (Silbert, 1983).

Los GAGs ocupan un gran volumen relativo a su masa y forman gel inclusive en bajas concentraciones. Su alta densidad de cargas negativas atrae cationes como K^+ , Na^+ y Ca^{+2} (Alberts *et al*, 1994; Voet y Voet, 1990).

Por su forma de gel hidratado ocupa la mayoría del espacio en la MEC, proveyendo soporte mecánico a la piel mientras permite una rápida difusión de moléculas solubles y migración celular.

El AH (Figura 1.5), es un polisacárido lineal que consiste en unidades disacáridas no sulfatadas compuestas de D-ácido glucurónico y N-acetil-D-glucosamina (Voets y Voets, 1990). Aparte de proveer soporte estructural, mantiene la homeostasis del tejido (Laurent y Fraser, 1992).

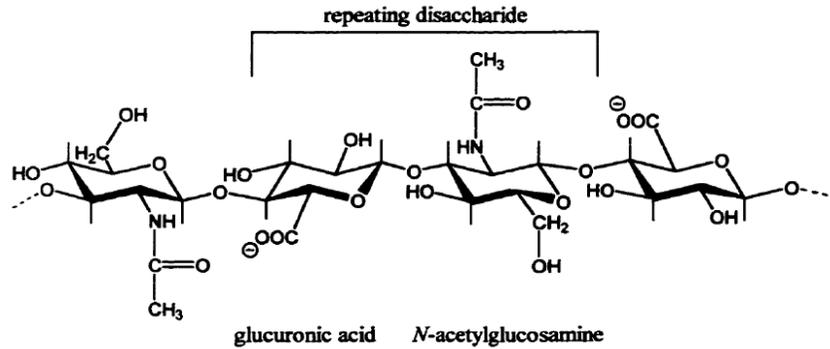


Figura 1.5. Estructura molecular del Ácido Hialurónico. **Fuente:** Alberts *et al*, 1994

La concentración del AH en la epidermis y en la dermis es de 0,601 mg/ml y 0,508 mg/ml respectivamente (Ueno *et al*, 1992; Laurent y Fraser, 1992).

El AH puede facilitar la adhesión-desunión entre la membrana celular y la matriz durante el movimiento celular. Además, asiste en la división celular y promueve la proliferación de fibroblastos *in vitro*. En experimentos realizados por Weigel y colaboradores, los autores mostraron que una matriz de fibrina-AH induce la movilidad o migración celular (Weigel *et al*, 1986).

1.1.4 Proteínas de adhesión de la matriz extracelular

Las proteínas adhesivas contribuyen a organizar la MEC. Estas proteínas tienen múltiples dominios, cada uno con sitios específicos de unión para otras moléculas de la matriz y para receptores de superficie de las células (Robin-Seurig, 1999).

La fibronectina (Figura 1.6) promueve la unión de los fibroblastos y otros tipos celulares a la matriz en tejidos conectivos (Robin-Seurig, 1999). Es una proteína que se une a

muchas moléculas como el colágeno, la fibrina, los proteoglicanos y los receptores de superficie celular. Se une a las células por medio de las integrinas (Robbins y Cotran, 2005).

Por otro lado, la laminina (Figura 1.6) promueve la unión de las células epiteliales a la lámina basal. Posee varios dominios: uno se une al colágeno tipo IV, otros a heparán sulfato, entactina y dos más a las proteínas receptores sobre la superficie celular (Alberts *et al*, 1994). En la membrana basal, la laminina y colágeno tipo IV forman redes estrechamente unidas. Además interviene en la unión de células al tejido conectivo (Robbins y Cotran, 2005).

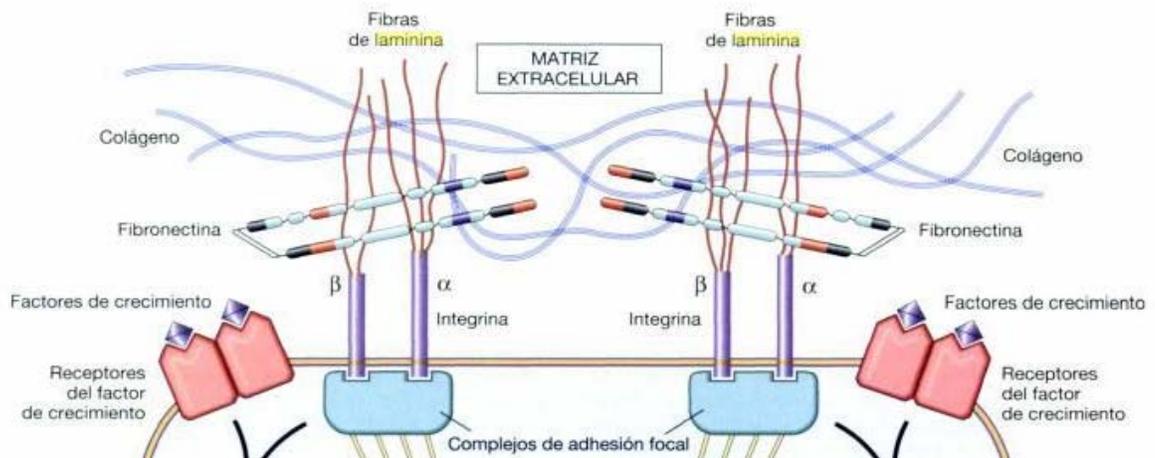


Figura 1.6. Interacciones entre la laminina, fibronectina e integrina con la matriz extracelular y la membrana celular. **Fuente:** Robbins y Cotran, 2005

1.1.5 Uniones intercelulares de las células dérmicas y epidérmicas

Hay tres grupos de proteínas de transmembrana que se encargan de adhesión célula-célula y célula-sustrato (MEC, u otro sustrato). Las moléculas de adhesión célula-célula (dependientes de calcio, CAMs) y las cadherinas (dependientes de calcio), están involucradas en la interacción entre células homólogas. Estas moléculas interactúan entre sí (Ver Figura 1.7), provocando un reconocimiento célula-célula que influye en el comportamiento de ambas (Frenshey, 2005).

Por su parte, la adhesión célula-sustrato está mediada por integrinas que se unen a moléculas de la MEC antes mencionadas, como la fibronectina, entactina, laminina y colágeno. Estas uniones se llevan a cabo por un reconocimiento de una secuencia específica de tres aminoácidos, arginina, glicina y ácido aspártico, (RGD). Cada integrina comprende una subunidad α y otra β , que son altamente polimórficas, por lo cual existen muchas variedades de integrinas. Además, se ha observado que interactúan con vinculina, proceso importante en la señalización al núcleo (Frenshey, 2005).

El tercer grupo de moléculas de adhesión son los proteoglicanos, los cuales interactúan con otros proteoglicanos (de la MEC) y con colágeno, pero no lo hacen vía RGD.

Algunos de estos proteoglicanos funcionan también como receptores de baja afinidad de factores de crecimiento, ellos son capaces de translocar estos factores a otros receptores de alta afinidad (Frenshey, 2005).

Las uniones intercelulares pueden ser llevadas a cabo por las proteína intermembrana y también se dan en sitios llamados cruces intercelulares, como los desmosomas, uniones adherentes (que mantienen a las células epiteliales unidas), uniones estrechas que sellan los espacios entre las células, y las uniones gap, las cuales permiten que iones, nutrientes y pequeñas moléculas de señalización como cAMP pasen entre las células (Alberts *et al*, 1994; Frenshey, 2005). Además se encuentran los hemidesmosomas (uniones entre la cara basal de la célula y la lámina basal) (Ver Figura 1.8 y 1.9).

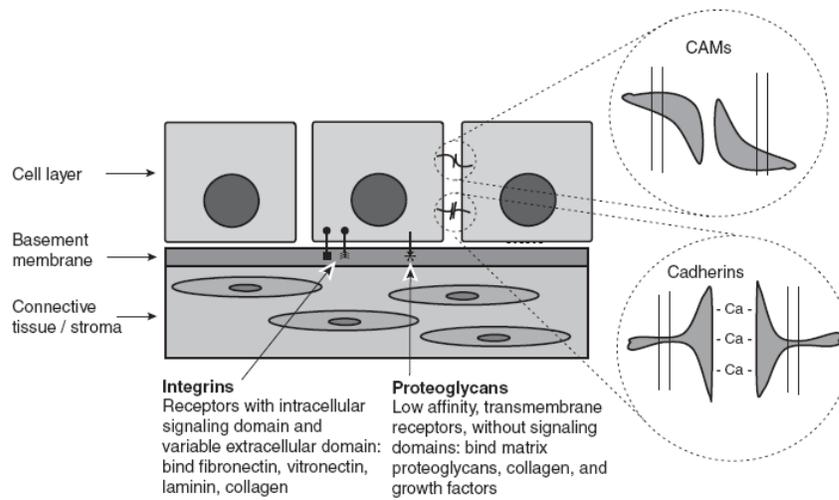


Figura 1.7. Esquema de las moléculas responsables de la unión célula-célula y célula-sustrato.

Fuente: Frenshey, 2005

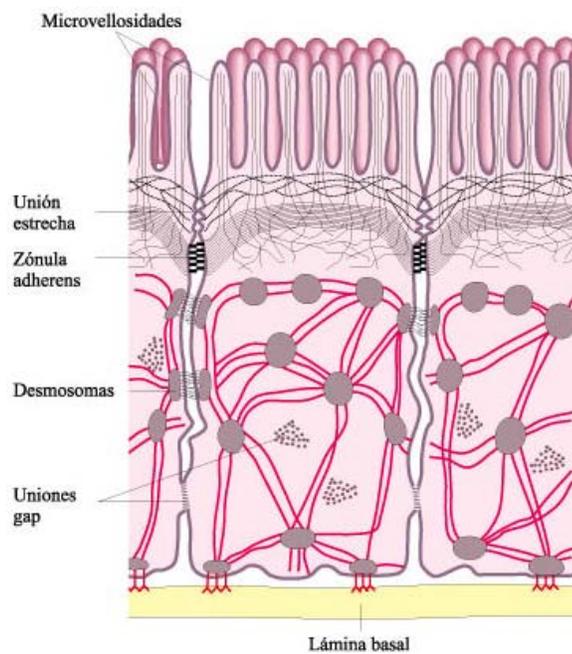


Figura 1.8. Ilustración de los cruces o uniones intercelulares **Fuente:** Curtis y Barnes, 2001

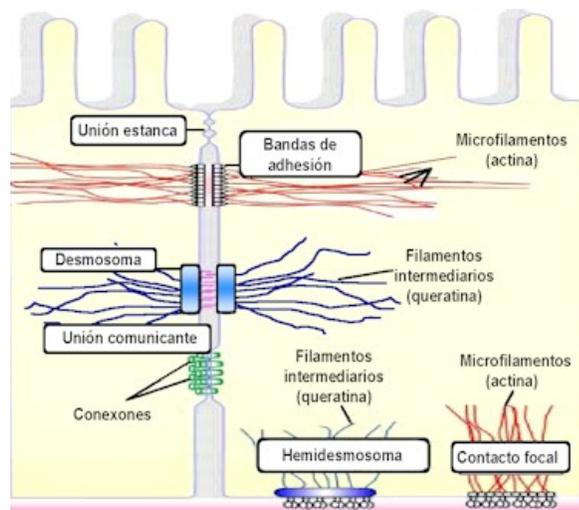


Figura 1.9. Uniones celulares y contacto con el citoesqueleto. **Fuente:** www.javeriana.com, 2004

1.1.6 Factores de crecimiento (FC)

Los factores de crecimiento son producidos por las células, participan en la dinámica de la MEC y favorecen el crecimiento, la proliferación, la migración y la diferenciación celular (Robbins y Cotran, 2005). Se han agrupado en familias de acuerdo a la respuesta inducida. No son específicos de ningún órgano ni elemento celular, por lo que un mismo factor de crecimiento puede ser detectado en tejidos diversos con acciones diferentes (Guanter, 2005).

Dentro de los más importantes se encuentran

- Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante (TGF): pertenecen a la familia EGF y comparten un mismo receptor. El EGF es mitogénico para una diversidad de células epiteliales y fibroblastos. En el proceso de cicatrización, tiene un papel fundamental y es producido por los queratinocitos. El TGF- α está implicado en el desarrollo de células epiteliales, tiene homología con el EGF. El TGF - β , funciona como agente fibrogénico que estimula la quimiotaxis de los fibroblastos, aumenta la producción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos e inhibe la degradación del colágeno (Robbins y Cotran, 2005; Guanter, 2005).

- Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un inductor de angiogénesis en adultos (Robbins y Cotran, 2005) y es producida por los queratinocitos (Morgan, 2006; Guanter, 2005).
- El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es producido por células endoteliales y estimula la migración y proliferación de fibroblastos y otros tipos de células (Robbins y Cotran, 2005; Guanter, 2005).
- El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) se asocia con el heparán sulfato, y puede servir como un reservorio de almacenamiento de factores inactivos. Estimula la angiogénesis, reparación de heridas, y hematopoyesis (Robbins y Cotran, 2005). El FGF estimula el crecimiento de queratinocitos *in vitro* (normalmente no lo sintetizan), estimula la producción de VEGF, favorece la resistencia de las células contra *E. coli*, *S. auerus*, *P. aeruginosa*. (Morgan, 2006; Guanter, 2005).
- Citocinas: poseen actividades promotoras en el crecimiento, diferenciación, inflamación, respuesta inmune, reparación tisular, hematopoyesis, apoptosis y otros procesos biológicos (Robbins y Cotran, 2005). Muchas citocinas distintas comparten funciones similares. Además, las citocinas son pleiotrópicas. Los fibroblastos producen citocinas tipo insulina (IGF-1), que estimula la síntesis de proteoglicanos sulfatados, colágeno, migración de queratinocitos y proliferación de fibroblastos, el IL-1, es producido por lo queratinocitos (Robbins y Cotran. 2005).

1.2 Historia de cultivo celular y antecedentes de cultivo de piel

El desarrollo histórico y metodológico del cultivo celular está íntimamente ligado a los del cultivo de tejidos y el cultivo de órganos. El cultivo de células animales empezó a ser una técnica rutinaria en los laboratorios de los años 50 (Chaudry, 2004), pero el concepto de mantener líneas de células vivas separadas del cuerpo de origen fue

descubierto ya en el siglo XIX (Ver Anexo 1) (Alberts *et al*, 2002; Reigosa y Rodriguez, 1999).

Las referencias iniciales para el cultivo de piel hacen alusión al cultivo celular en forma de explantes celulares alrededor de los años 50 (Navsaria *et al*, 1994). Esta técnica no fue muy efectiva ya que, el crecimiento de los fibroblastos superaba y limitaba el crecimiento de los queratinocitos, los cuales no eran capaces de proliferar. Además, el crecimiento de estas células no era organizado. Si bien se menciona habitualmente cultivo de piel, en sus comienzos se trató del cultivo de epidermis exclusivamente.

En años posteriores, se hicieron intentos por aislar queratinocitos epidermales por disgregación enzimática para ser cultivados en monocapa (Cruikshank *et al*, 1960; Briggaman *et al*, 1967; Yuspa *et al*, 1970). Esos estudios mostraron que los cultivos crecían limitadamente y no podían ser subcultivados exitosamente.

En 1975, Rheinwald y Green publicaron un método innovador de cultivo *in vitro* de queratinocitos, donde ellos realizaban un cocultivo de los queratinocitos con otras células, (*feeder-layer*), cuya función era secretar factores de crecimiento e inhibir el sobrecrecimiento de fibroblastos dérmicos. Las células de la feeder-layer son fibroblastos de una línea celular establecida (3T3), letalmente irradiadas. Es decir, su capacidad proliferativa estaba inhibida, pero su actividad metabólica estaba inalterada. Otra novedad introducida por estos autores fue el uso del EGF dentro del medio de cultivo, lo cual contribuyó enormemente a la capacidad proliferativa de estas células (Rheinwald y Green, 1975; Rheinwald y Green, 1977). Con este método se obtuvieron láminas epiteliales, de dos a ocho capas de queratinocitos con distinto grado de diferenciación. Estos autores determinaron las condiciones de cultivo ideales para el crecimiento de queratinocitos, con posibilidades terapéuticas.

Después de estos estudios, a comienzos de los años 80, se empezaron a desarrollar medios más específicos y completos para queratinocitos, lo que eliminó poco a poco el uso de *feeder-layers* para cultivo de los queratinocitos, y se demostró su crecimiento sin ésta.

Su primera aplicación clínica se produce en 1980, cuando el equipo de Banks-Schelegel demuestra la viabilidad del epitelio cutáneo obtenido *in vitro* empleándolo como injerto en animales de experimentación, lo cual llevó al perfeccionamiento de estas técnicas haciendo posible la utilización de estos tejidos, obtenidos en el laboratorio, en la práctica clínica (Green *et al*, 1979, Gallico *et al*, 1984, Gallico *et al*, 1989; Arvelo, 2007).

A mediados de los años 80, aparte de la eliminación de la *feeder-layer*, se practica el cultivo de queratinocitos sin el suero fetal bovino, lo que a su vez obliga a la utilización de nuevos medios más completos en cuanto a proteínas y factores de crecimiento, con el fin de reemplazar los provenientes de dicho suero (Pittelkow y Shipley, 1989). La necesidad de cultivar las células sin necesidades de componentes animales, tanto *feeder-layer* como sueros, se agudizó a partir de la aparición y transmisión de enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina.

Existían además otros retos, como ser que las láminas de queratinocitos eran muy frágiles, por lo cual, aplicadas sobre los pacientes, su prendimiento fracasaba frecuentemente por infecciones o pérdidas por roce. La situación anterior dio origen a la investigación y desarrollo de reconstrucciones o sustitutos cutáneos que contuvieran no sólo queratinocitos sino también fibroblastos autólogos y matrices de distintas composiciones y orígenes, GAG's, polímeros sintéticos entre otros, para tratar de mimetizar la estructura de la piel (Mackneil, 2007).

1.2.1 Aislamiento de células epidérmicas y dérmicas

Las células pueden ser aisladas de la piel para cultivos *ex vivo* de diversas maneras. Se pueden liberar de los tejidos mediante hidrólisis enzimática con colagenasa y tripsina, que degradan algunos componentes de la matriz extracelular, y obtenerlas por centrifugación en suspensión para que luego sean cultivadas directamente. Por otro lado, es posible colocar trozos de tejido en medio de crecimiento, con el objetivo de que las células migren a partir de esa pieza, y se adhieran a la superficie del frasco de cultivo, comenzando a proliferar *in vitro*. Este método es el conocido como cultivo de explantes.

La elección del método depende del tipo de tejido y de los objetivos del cultivo (Chaudry, 2004).

Las células que se cultivan directamente después del aislamiento a partir de un órgano o tejido provenientes de un individuo, se conocen como cultivos primarios, los cuales tienen un periodo de vida limitado. Después de un cierto número de divisiones las células entran en el proceso de senescencia y dejan de dividirse (Chaudry, 2004).

1.2.2 Mantenimiento de células epidérmicas y dérmicas en cultivo

Para que las células puedan ser cultivadas *in vitro*, deben ser mantenidas a una apropiada temperatura y mezcla de gases (habitualmente, 37°C, 5% CO₂ y 95% O₂, saturado de humedad) en un incubador celular, con medios de cultivo apropiados, que les provean a las células todos los nutrientes que necesiten para desarrollarse. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para fibroblastos y queratinocitos. Dichas condiciones pueden provocar cambios fenotípicos en las células *in vitro* (Chaudry, 2004).

La elección del medio de crecimiento es un factor fundamental. Los medios de crecimiento contienen fuentes de carbono, de nitrógeno, de energía, sales, hormonas, y otros componentes nutritivos. Uno de los suplementos más usados como fuente de proteínas y factores de crecimiento en los medios celulares ha sido el suero de origen animal, particularmente el suero fetal bovino. La aparición de zoonosis provocadas en el hombre por elementos derivados de la sangre animal, como la encefalopatía espongiforme bovina, ya mencionada, ha planteado una seria advertencia a su uso como componente de productos farmacéuticos derivados (Chaudry, 2004). En la actualidad se tiende a minimizar o eliminar el uso de estos ingredientes. En los últimos años se han desarrollado medios de cultivos libres componentes de origen animal.

En general, las células cultivadas son dependientes de anclaje, es decir necesitan adherirse a un sustrato para poder sobrevivir. Estos sustratos pueden ser envases de plástico especiales para el cultivo de tejidos, que pueden estar recubiertos con componentes de la MEC para aumentar sus propiedades de adhesión y proporcionar otras señales necesarias

para el crecimiento y diferenciación. Otro tipo de cultivo adherente es el cultivo organotípico que consiste en cultivar las células en un ambiente tridimensional (o una MEC artificial) a diferencia de las placas de cultivo bidimensionales. Este tipo de cultivo 3D es bioquímica y fisiológicamente similar al tejido vivo. Sin embargo, la elección del andamio a utilizar presenta dificultades técnicas importantes. (Chaudry, 2004).

En condiciones apropiadas, las células pueden estar en continua división durante el cultivo *in vitro*, hasta que lleguen a ocupar todo el área o volumen disponible. Esto puede generar varios problemas: agotamiento de los nutrientes del medio, acumulación de células apoptóticas o necróticas e inhibición de la división celular por contacto: los contactos entre células pueden desencadenar un arresto del ciclo celular y diferenciación celular provocada por los contactos intercelulares. Los problemas anteriores se evitan con el cambio frecuente de medio de cultivo y el subcultivo de las células, cuando éstas no han alcanzado aún la confluencia total.

1.2.2.1. Cambios de medio de cultivo

El objetivo de este procedimiento es renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y de células muertas. En los cultivos adherentes, como de las células epiteliales y fibroblastos, el medio puede eliminarse directamente mediante aspiración y reemplazarse por medio fresco (Chaudry, 2004).

1.2.2.2. Subcultivo de las células

Se basa en transferir un pequeño número de células a un nuevo frasco o placa de cultivo, con el objetivo de amplificarlas. Los subcultivos permiten evitar la senescencia de las células asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular. En cultivos adherentes, las células han de ser inicialmente despegadas de la superficie de cultivo, lo cual se efectúa comúnmente con una mezcla de tripsina y EDTA. El total de las células despegadas pueden sembrarse en varios frascos nuevos (Chaudry, 2004).

Para todas las manipulaciones llevadas a cabo con las células *in vitro*, es fundamental mantener las condiciones de esterilidad, con el objeto de evitar la contaminación del cultivo. Para ello es fundamental trabajar en una cámara de flujo laminar, que proporciona un flujo de aire estéril en el ambiente de trabajo. Además, normalmente se añaden antibióticos al medio de cultivo. El objetivo de estos métodos es evitar la contaminación con bacterias o levaduras que impedirían absolutamente la continuación del cultivo celular. (Chaudry, 2004).

Como se menciona anteriormente, en 1975, los pioneros Rheinwald, Green y colaboradores, establecieron las condiciones necesarias y fundamentales para cultivar y amplificar este tipo de células, con perspectivas terapéuticas. El desarrollo *in vivo* de las células epiteliales, así como su diferenciación y multiplicación, dependen de complejas interacciones con la matriz extracelular, así como de diferentes estímulos procedentes de los fibroblastos y sus productos.

1.3 Ingeniería de Tejidos (IT)

1.3.1 Historia y antecedentes

La IT es un campo interdisciplinario surgido a finales del siglo XX, que se nutre de disciplinas más tradicionales como la biología celular, la medicina, la robótica, la química, la bioquímica, la fisicoquímica y la ciencia de los materiales (Langer y Vacanti, 1993; Arnaud, 2005; Sipe, 2002).

Fue definida oficialmente en 1987 por la National Science Foundation como *la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos capaces de restaurar, mantener y mejorar la función de un órgano/tejido dañado* (Bello *et al*, 2001). El campo actual fue esencialmente fundado por Charles y Joseph Vacanti, además de Charles Patrick, Antonios Mikos, Robert Langer y Larry McIntire en los 80. Actualmente casi no hay rama de la biomedicina que no se nutra de los aportes de ella (Minuth *et al*, 2005).

La IT se encuentra en desarrollo y está creciendo, tanto en la investigación como en la industria (ya en el año 1999 representó en la Unión Europea un mercado de \$34.600 millones) (Infante *et al*, sf.). Ha sido aplicada para la reconstrucción de hueso, hígado, arterias, vejiga, páncreas, entre otras aplicaciones. También se ha aplicado al diseño de funciones bioquímicas usando células junto con sistemas de soporte creados artificialmente (por ej. un páncreas o hígado artificial) (Lorenti *et al*, 2005; Ramírez, 2005). Por otro lado se han hecho reemplazos de algunos tejidos por biomateriales con células, o implantes de tejidos obtenidos por técnicas *in vitro*, que recién están comenzando a salir de las etapas experimentales. Si bien aún no son completamente satisfactorios prometen ser muy ventajosos (Bello *et al*, 2001; MacNeil, 2007 y Macri y Clark, 2009).

Los dos componentes básicos de la IT son las células vivas y los biomateriales. En teoría, cualquier tejido podría ser creado usando los principios básicos de la IT. Sin embargo, para obtener éxito en la regeneración de tejidos y órganos basados en los conceptos de la IT, algunos elementos críticos tienen que ser considerados, como la fuente y características de las células así como los biomateriales que servirán como soporte mecánico para dichas células (Ikada, 2006).

1.3.2 Función de las células en la IT, pequeñas fábricas

Las células son fabricas de proteínas, FC y secretoras de las proteínas de la MEC de los distintos tejidos a las que pertenecen (MackNeil, 2007; Minuth *et al*, 2005). Por lo tanto, mantener la funcionalidad de las células es fundamental en los desarrollos de IT, dado que ellas serán las responsables de restaurar la función y muchas veces también la estructura del tejido que se pretende restaurar (Macri y Clark, 2009).

Las moléculas bioactivas (FC, proteínas, citocinas etc.), que emanan de la célula, proveen una respuesta biológica que estimula o inhibe un diverso repertorio de actividades celulares como proliferación, migración y síntesis de proteínas (Macri y Clark, 2009).

La creación de tejidos y estructuras biológicas *in vitro* requiere un profundo conocimiento del tipo celular usado, con el objeto de garantizar su supervivencia y crecimiento, e incentivar su funcionalidad. El proceso de cultivo celular presenta problemas adicionales en el mantenimiento de las condiciones óptimas. En muchos casos, el mantenimiento del cultivo celular requiere además de nutrientes, estímulos químicos y físicos.

1.3.3 Origen y fuentes de células para la IT de las células

Como se menciona anteriormente, para la elección de las células, hay que tomar en cuenta varios aspectos fundamentales, como las funciones especializadas que cumplen, sus potenciales efectos adversos y su disponibilidad.

Se pueden elegir según el tipo celular: células troncales (células madre), líneas celulares establecidas, o bien células primarias. Por otro lado, considerando su origen las células pueden ser seleccionadas de fuentes autólogas, alogeneicas o xenogeneicas.

Las células madre pueden a su vez tener varios orígenes: embrionarias, embrionarias germinales y adultas somáticas. Según su potencialidad las células troncales pueden clasificarse como: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales o de potencialidad más restringida.

Las líneas celulares establecidas son células inmortalizadas, de origen animal o humano, genéticamente modificadas (la transformación puede ser inducida o espontánea). Se originan a partir de tejidos normales o tumorales, y su capacidad proliferativa es prácticamente ilimitada. Sin embargo, su potencial tumorigénico nunca puede ser totalmente descartado.

Las células primarias son las células aisladas a partir de tejidos funcionales. Estas pueden ser de origen animal o humano. Las de origen animal tienen la desventaja que puede haber riesgo de transmisión de virus y priones, además de una respuesta inmunogénica, provocando un rechazo hiperagudo. Las de origen humano son, sin duda, la mejor

elección. Sin embargo la disponibilidad muchas veces puede ser limitada ya sea por la falta de donantes o bien porque su aislamiento y cultivo *in vitro* sea complicado.

Las células humanas se pueden usar recién aisladas o después de una serie de cultivos *in vitro*. El uso de las células recién aisladas tiene ciertas ventajas y desventajas. Por un lado el tiempo de preparación y el gasto de recursos son menores. Sin embargo la viabilidad no siempre es óptima. Las células cultivadas, aunque requieran un mayor tiempo de preparación y haya un mayor gasto, el cultivo les brinda la posibilidad de reorganizarse después del stress producido por el aislamiento en sí mismo y por lo tanto tendrán más posibilidades de sobrevivir. El objetivo de cultivar las células es por lo tanto, estabilizar o mejorar la funcionalidad de las células aisladas.

Es importante mencionar que las interacciones célula-célula, célula-MEC, los FC y otras señales son importantes para inducir una función o respuesta requerida para la regeneración del tejido, por lo cual determinar todas las condiciones necesarias para optimizar la actividad celular es una tarea difícil y es diferente y específica para cada tipo de tejido.

Finalmente, la interacción el andamio o MEC, es fundamental y determinante, para un buen desarrollo y funcionalidad celular.

1.3.4 Biomateriales para la IT

Un biomaterial es cualquier sustancia o combinación de ellas, de origen natural o sintético, diseñadas para interactuar con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del organismo humano (Infante *et al*, sf.).

La primera aplicación de biomateriales en medicina no se produce hasta 1860 con la introducción de las técnicas quirúrgicas asépticas. A principios de 1900 se aplican las primeras placas óseas hechas de metal con la finalidad de reparar roturas o fracturas. En la II Guerra Mundial se produce un rápido avance en la ciencia de los polímeros, enfocado a las aplicaciones médicas. El polimetilmetacrilato fue uno de los primeros

polímeros utilizados como material biomédico para reparar la córnea humana (Infante *et al*, sf.). Los polímeros no sólo reemplazaron a otros materiales en aplicaciones médicas, como la sustitución de los catéteres metálicos por polietileno, sino que abrieron el campo. Así, en 1950 se fabrica el primer corazón artificial, llevado a la práctica clínica a finales de 1960. En la actualidad los polímeros continúan en amplio crecimiento y sus aplicaciones son cada vez mayores, mejorando las propiedades de los materiales ya existentes y desarrollando nuevos polímeros para aplicaciones específicas. En la Figura 1.10 se muestra una secuencia histórica de los polímeros de mayor relevancia en el campo de la medicina desde su aparición (Infante *et al*, sf.).

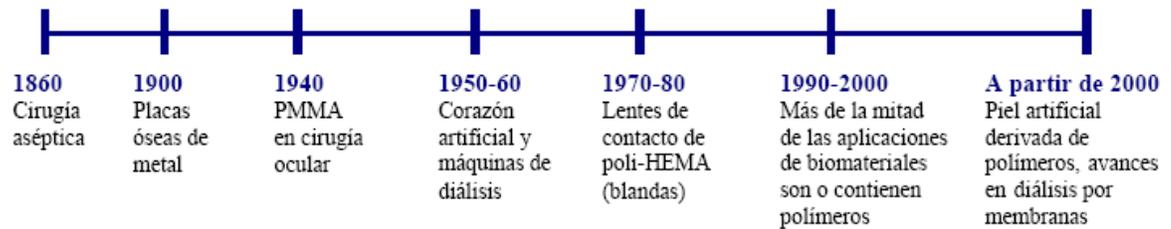


Figura 1.10. Línea del tiempo de la utilización de los polímeros en el área médica. **Fuente:** Infante *et al*, sf.

1.3.4.1 Función del Biomaterial

Cuando un tejido es severamente dañado o perdido, un gran número de células se pierde, así como también la MEC que las contiene. Como bien se sabe un tejido representa una interacción altamente organizada de las células y la MEC. Por lo tanto, la fabricación del reemplazo del tejido se puede facilitar tratando de imitar la organización espacial del tejido *in vivo*. Por esta razón es que se debe proveer una MEC artificial o biológica para que las células puedan crear un neotejido. Las células aisladas tienen la capacidad de formar un tejido estructural hasta un determinado punto cuando son puestas en suspensión en el tejido, porque ellas necesitan una plantilla que sea capaz de guiarlas (Ikada, 2006; Vaissiere *et al*, 2000).

La función primaria del andamio es proveer una estructura para organizar células disociadas en una estructura propia de un tejido, creando un ambiente 3-D que sea ideal para la proliferación celular y el desarrollo de un neot Tejido. Cuando las células se adhieren al andamio y este es implantado, las células se incorporarán en el cuerpo. La adhesión celular es el primer elemento crítico para iniciar el crecimiento celular y el desarrollo del neot Tejido (Ikada, 2006).

Dependiendo del tejido de interés, y la aplicación específica, el andamio y el material serán diferentes (Ikada, 2006). A grandes rasgos se habla de que el andamio debe tener al menos algunas de las siguientes características: proveer una estructura 3-D bien definida, con poros que aumenten la superficie, una estructura fisicoquímica que facilite la adhesión celular, proliferación, migración y diferenciación celular, una red de poros interconectada que promuevan la accesibilidad a nutrientes y factores exócrinos y parácrinos entre las células, un sustrato no tóxico, y en algunos casos reabsorbible con una tasa de degradación similar a la formación de tejido, propiedades biológicas que faciliten la vascularización, propiedades mecánicas que sean similares al tejido del sitio del implante, que sea capaz de distribuir de agentes bioactivos como FC, una geometría que induzca la formación deseada del tejido, que sea fácilmente esterilizable (que no altere sus características), económicamente viable y que permita una eficiente producción del material a nivel industrial (Ikada, 2006; Ratanavaraporn *et al*, 2006).

Indudablemente, una de las principales características de los biomateriales es la biocompatibilidad, para que no presente ningún tipo de reacción biológica adversa.

Inicialmente el andamio va a rellenar el espacio que ocupaba el tejido natural, y luego proveerá un armazón sobre el cual el tejido se regenerará. La selección y síntesis del andamio apropiado va depender indiscutiblemente de la aplicación y el ambiente en el cual va a ser implantado (Ikada, 2006).

Finalmente, el andamio será reemplazado con las células de hospederero y una nueva MEC, el cual deberá proveer propiedades mecánicas y funcionales similar al tejido nativo (Ikada, 2006).

1.3.4.2 Tipos de Biomateriales

Según su origen, los biomateriales se clasifican tal cual se observa en el siguiente diagrama:

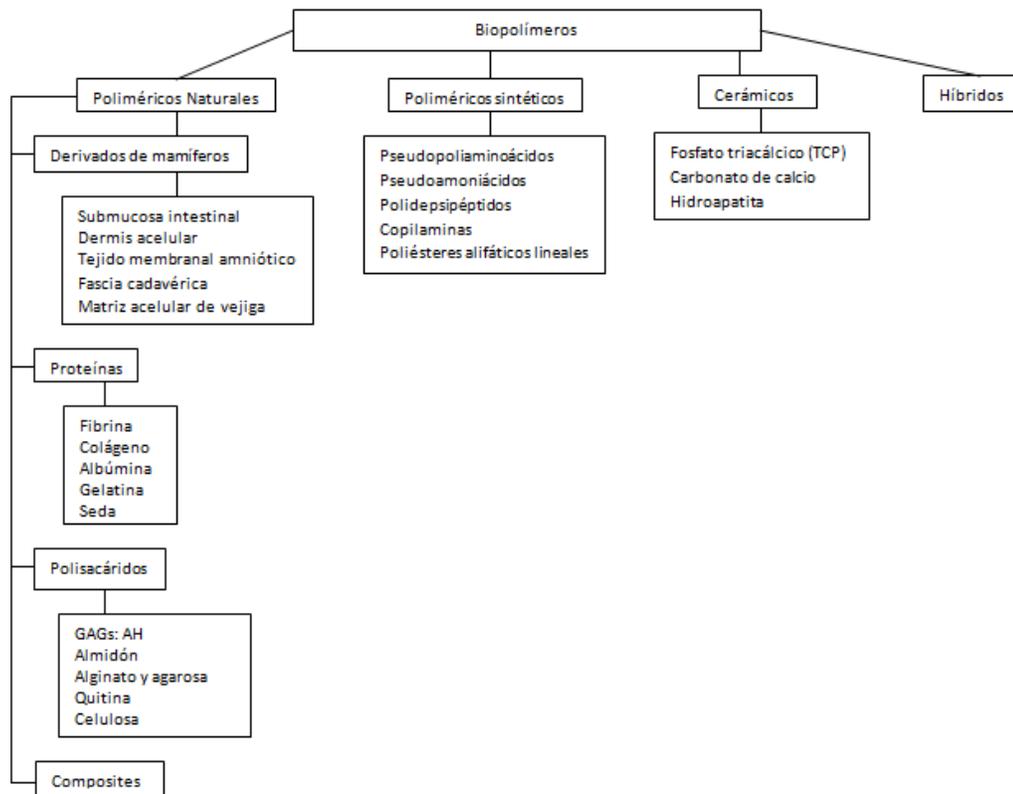


Figura 1.11. Clasificación de los biomateriales según su fuente o composición. **Fuente:** Modificación de Ramírez, 2005

La ventaja de los polímeros de origen natural es que generalmente son más biocompatibles que los de origen sintético, se obtienen fácilmente (dependiendo del tipo) y no son demasiados caros (depende de que clase), además son fácilmente modificables químicamente, y son más versátiles ya que pueden proveer funciones biológicas. Por otro lado, los sintéticos son favorables en el sentido de que pueden ser fabricados a partir de

una gran variedad de polímeros biodegradables, con una degradación controlada y tienen una gran disposición para que sean modificados (Chung y Park, 2007)

Además de la fuente del material, los biopolímeros pueden ser permanentes (que no se degradan a través del tiempo) o bioabsorbibles (biodegradables). En el primer grupo se incluyen todos aquellos implantes que deben tener un carácter permanente, como son los sistemas o dispositivos utilizados para sustituir parcial o totalmente a tejidos u órganos destruidos como consecuencia de una enfermedad o trauma. En el segundo grupo, se incluyen los biomateriales degradables de aplicación temporal, es decir, aquellos que deben mantener una funcionalidad adecuada durante un periodo de tiempo limitado, ya que el organismo humano puede desarrollar mecanismos de reparación y regeneración tisular para reparar la zona o el tejido afectado reemplazando finalmente al implante (Infante *et al.*, sf; Griffith y Naughton, 2002; Hou *et al.*, 2003; Hutmacher, 2000; Sipe, 2002). En caso de que sea biodegradable es importante tener en cuenta que los productos de degradación sean fácilmente eliminables y no-tóxicos (Ikada, 2006).

Las interacciones entre las células y la matriz son importantes ya que determinarán el fenotipo de las células (Figura 1.12). A través de las integrinas y otros receptores de la célula, el citoesqueleto interactúa con el microambiente y envía señales al núcleo. Estas señales influirán en la expresión genética y por lo tanto el fenotipo y la función. A parte de la señalización química, la elasticidad de la matriz afecta funciones celulares como la adhesión, organización del citoesqueleto y diferenciación celular. Recíprocamente, las células producen y remodelan la MEC y en muchos casos la degradan a través de proteasas (Macri y Clark, 2009).

Es importante mencionar que, según las condiciones del cultivo, las células pueden cambiar su metabolismo y morfología hacia estadios menos diferenciados. Sin embargo, las células mantienen su genotipo y tendrán capacidad de diferenciar cuando el microambiente en el que estén ubicadas las estimule para ello, por ejemplo, cuando sean injertadas en un lugar apropiado *in vivo*, o también en modelos tri-dimensionales *in vitro*

basados en el uso de equivalentes dérmicos, que permitan las interacciones célula-célula y célula-MEC. Se da una reconsideración de la matriz extracelular, no simplemente como un soporte mecánico pasivo, sino como concepto integral de micro-medioambiente capaz de sostener la señalización que coordina el mantenimiento de la estructura de una piel normal, como también los eventos necesarios para la cicatrización de heridas (Ingber D, 1997).

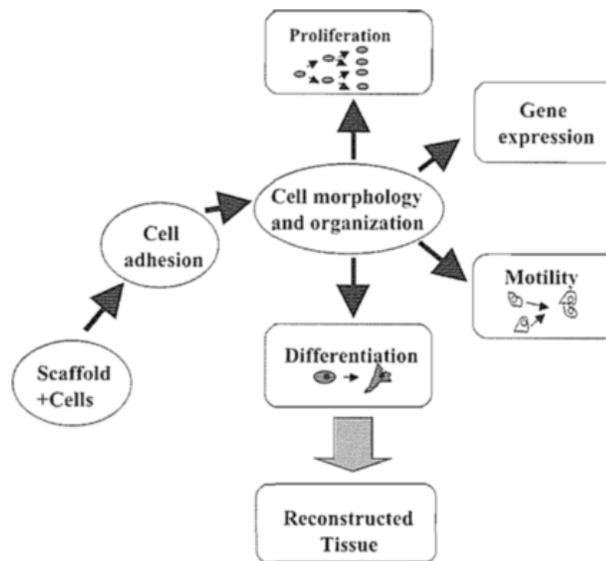


Figura 1.12. Relaciones entre el andamio y la serie de eventos que determinan el desarrollo del tejido. **Fuente:** Li y Yang, 2001

1.3.5 Ingeniería de Tejidos en el reemplazo de piel

La IT de la piel se refiere a sustitutos cutáneos formados por células o materiales de la matriz extracelular solos o en conjunto, para aplicarlos sobre lesiones no cicatrizantes como quemaduras extensas y úlceras profundas y crónicas (Bello *et al*, 2001).

Inicialmente, el uso de apósitos biológicos como autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos para el tratamiento de heridas cutáneas data desde 3000-2500 a.c., aunque no se aceptaron como tratamiento hasta el siglo XIX. Aloinjertos y xenoinjertos pueden ser utilizados como cubiertas temporales. Los primeros principalmente se derivan de piel

cadavérica y los segundos vienen de piel bovina y porcina. Esos injertos no son de larga duración y en su mayoría nunca se logran incorporar en la piel del huésped, aunque hay casos en los que se los ha usado con éxito como cobertura definitiva en conjunto con epidermis cultivada (Perroni *et al*, 1996). Además, podrían estar asociados a fenómenos de rechazo inmunológico y transmisión de enfermedades. Alternativamente los autoinjertos epidérmicos pueden ser reproducidos *in vitro* a partir de una pequeña biopsia. Sin embargo, se requieren de 2 a 3 semanas para cultivar las células. (Bello *et al*, 2001).

Hasta la fecha se pueden mencionar tres grupos de injertos para la piel: cobertura epitelial que consiste básicamente en láminas de queratinocitos, reemplazo de dermis con biomateriales como dermis acelular de origen humano o animal, y sustitutos compuestos epidérmicos/dérmicos (Ver Apéndice 1 y Figura 1.13) (MackNeil, 2007).

Epithelial cover

Involves the delivery of autologous keratinocytes as one of the following

- An integrated sheet such as Epicel (Genzyme Tissue Repair). This is developed from the methodology originally pioneered in 1981 (ref. 12). A biopsy of the patient's cells is grown into an integrated sheet and enzymatically detached for delivery to the patient⁴³.
- Subconfluent cells on a carrier such as Myskin (Cell Tran)⁴². Cells are delivered to the patient before they reach confluence on a chemically defined carrier dressing.
- Small sheets cultured from a patient's hair follicles such as Epidex (Modex Therapeutics)⁴⁴.
- A spray such as CellSpray (Clinical Cell Culture). Subconfluent cells are expanded in the laboratory and made into a suspension in which they are transported. They are then delivered to the patient as a spray⁴⁵.

Dermal replacement materials

- Donor skin³⁴: skin from screened skin donors can be used to provide either a temporary wound cover or a permanent source of allover skin.
- Integra²¹ (Integra LifeSciences): an alternative to donor skin that provides a vascularized dermis for a subsequent split-thickness skin graft.
- Alloderm (Lifecell): freeze-dried human donor dermis²⁵.
- Dermagraft (Advanced Biohealing): a synthetic material conditioned with donor fibroblasts²⁸.
- Transcyte (Advanced Biohealing): similar to Dermagraft but with a silicone membrane to act as a temporary epidermal barrier²⁹.
- Permacol (Tissue Science Laboratories): porcine skin that provides a temporary wound dressing³⁶.

Epidermal/dermal replacement materials

- Apligraf (Organogenesis): this combines allogeneic keratinocytes and fibroblasts with bovine collagen to provide a temporary skin-replacement material suitable for use in chronic wounds but not major burns³⁰.
- Orcel (Ortec International): combines allogeneic keratinocytes and fibroblasts with bovine collagen to provide a temporary skin-replacement material suitable for use in chronic wounds³¹.
- Cincinnati skin substitute, or Permaderm (Cambrex): comprises autologous keratinocytes and fibroblasts crafted into reconstructed skin with bovine collagen. Can provide a permanent skin substitute for burns patients³⁷.

Figura 1.13. Principales productos con análisis clínicos, desarrollados por la IT para la cobertura de piel en heridas de quemados o ulcerados. **Fuente:** MackNeil, 2007

Para diseñar un sustituto de piel el primer objetivo es diseñar un sistema *in vitro* en el cual células cultivadas puedan crecer en matrices biodegradables que proveen señales físicas y químicas que ayuden a controlar la correcta formación espacial-temporal del tejido *in vivo* (Figura 1.14). Para la selección del material, es necesario en primer lugar seleccionar aquél que sea capaz de reclutar células del tejido al sitio (conductivo) y que

luego pueda brindar las señales necesarias para que proliferen y se diferencien, de tal manera que logren regenerar el tejido dejando la mínima cicatriz (inductivo) (Macri y Clark, 2009).

Una vez alcanzado el primer objetivo, el siguiente es conseguir la viabilidad *in vivo*, inicialmente en modelos animales para luego probar en humanos (Macri y Clark, 2009).

Para el futuro, lo más importante será que la estructura tenga la habilidad de incorporarse a la piel o bien que exhiba un ambiente que sea conductivo e inductivo para las células de la piel, para que así la cicatrización sea más rápida, produciendo un tejido regenerado en lo posible sin cicatriz. De esta manera se logrará la restauración de la funcionalidad y además el aspecto estético (Macri y Clark, 2009).

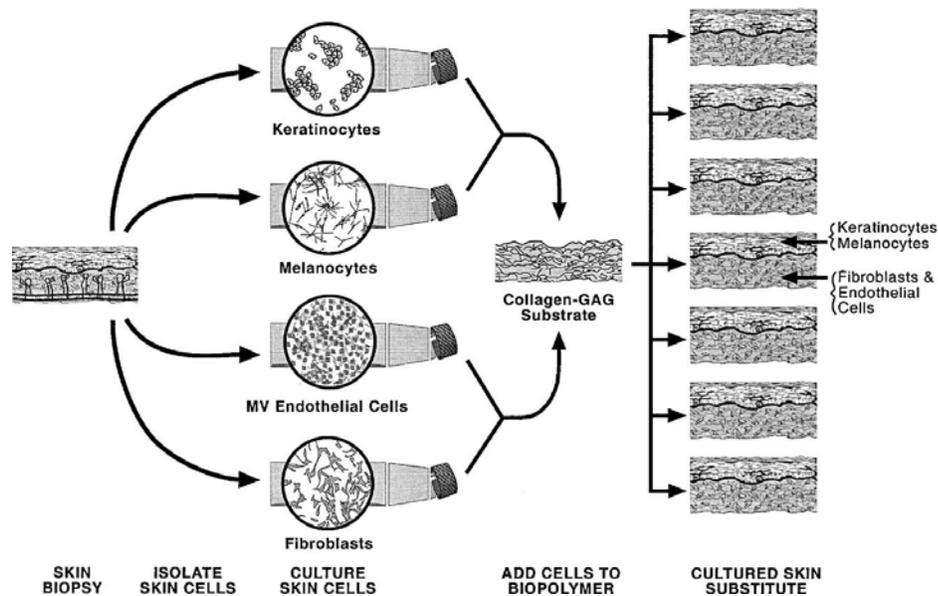


Figura 1.14. Diagrama del proceso general para la creación de sustitutos de piel por IT. Una pequeña biopsia de piel es tratada enzimáticamente para aislar queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos para que luego cada tipo celular sea cultivado *in vitro*. Las células se crecen hasta obtener grandes poblaciones, para que luego sean inoculadas en un sustrato de diversa naturaleza. **Fuente:** Boyce, 2004

Aparte de fibroblastos y queratinocitos, también se ha trabajado conjuntamente con otro tipo de células cutáneas como complemento de las anteriores, como es el caso de los melanocitos, para aplicaciones específicas.

1.4 MatriStem[®], matriz a evaluar

Este material (Figura 1.15) es una membrana con capas múltiples, obtenido a partir de vejiga de cerdo tratada por métodos químicos para la eliminación completa de las células que contiene, dejando una matriz acelular, evitando así el riesgo de la existencia de un estímulo antigénico al paciente. (ACELL, 2009)

Tiene características bimodales; una superficie consiste en una membrana basal intacta, la cual promueve la adhesión de células epiteliales y endoteliales, así como la proliferación y diferenciación. El lado opuesto, consiste en una red de tejido conectivo con las características de la lámina propia de la vejiga. Esta superficie es ideal para la integración en la herida del paciente. (Freytes *et al* 2008)

Morfológicamente, cuenta con una colección de proteínas estructurales y funcionales dispuestas en 3-D. Son básicamente las proteínas propias de la MEC dermal, en condiciones normales, como colágenos tipo I, II, III, IV y VI; GAGs como heparán sulfato, AH, condroitinsulfato, glicoproteínas (fibronectina y laminina), y factores de crecimiento como TGF- β (Robin-Seurig, 1999) que interviene en el proceso de curación incrementando la síntesis de colágeno y la deposición en la matriz, PDGF, BFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos que estimula la formación de tejido conectivo), y VEFC (factor de crecimiento vascular epidermal, que estimula la angiogénesis) (Brown *et al* 2006).

Tiene propiedades mecánicas fuertes, es fácil de manipular, resiste la sutura y tiene actividad antimicrobiana especialmente contra bacterias. (Brown *et al* 2006)

En ensayos preclínicos, se han estudiado aplicaciones de esta matriz en tejido de esófago, vejiga, cuerdas vocales, laringe, musculo esquelético, válvulas cardiacas e inclusive en el miocardio (Gilbert *et al*, 2008; Kochupura *et al*, 2005; Wood *et al*, 2005; Badylak *et al*, 2006; Robinson *et al*, 2005; Niaponice *et al*, 2006; Badylak *et al*, 2005). Hasta la fecha, no hay reportes de cultivo de células epidérmicas y dérmicas *in vitro*.



Figura 1.15. Diseño de MatriStem, matriz extracelular hecha a partir de vejiga de cerdo. **Fuente:** ACELL, 2009.

Se ha observado que esta MEC, soporta la angiogénesis *in vivo*, deposición de neomatriz y curación constructiva dermal asociada con epitelización. Durante el proceso de la reconstrucción del tejido, el andamio injertado es gradualmente degradado hasta que solo las células y tejidos hayan sido depositados por el hospedero (Brown *et al* 2006).

Al ser este andamio una colección de proteínas semejantes a la de la MEC, altera la forma en la cual los mamíferos responden al daño, sirviendo como un inductivo para remplazo de tejido y evitando la formación de cicatriz. El cuerpo es estimulado a depositar tejidos organizados, como un fenómeno similar al que ocurre durante el desarrollo fetal (Badylak *et al* 2008). Dicho proceso es inducido por la gran variedad de FC.

En un adulto, durante la cicatrización, cantidades abundantes de colágeno altamente desorganizado son depositados en el sitio de la herida, creando una cicatriz fibrótica. En cambio, durante la embriogénesis, el colágeno es depositado en un patrón altamente organizado y forma un tejido perfectamente normal, sin formación de cicatriz. La matriz de feto contiene una cantidad mucho mayor de AH en comparación con la matriz de un adulto. Esta variación puede contribuir a la diferencia de cicatrización (Robin-Seurig, 1999).

1.4.1 Preparación de MatriStem®

Para la obtención de esta matriz es fundamental mantener altas condiciones de seguridad sanitaria para la crianza de los cerdos de los cuales se extrae el material. En cuanto a la dieta, no reciben ningún nutriente de origen bovino, y no se dejan pasar de un peso de 80 lbs. Además 30 días antes del sacrificio se evita la aplicación de vacunas a los animales (ACELL, 2009). En cuanto al manejo del mismo es muy simple. Este viene empacado previamente esterilizado y se puede almacenar ya sea a temperatura ambiente o bien en refrigeración (ACELL, 2009).

Durante la preparación de la membrana se aplican las GMPs y pasan por un alto grado de control de calidad (ACELL, 2009).

Proceso de preparación: la capa de la vejiga urinaria es llevada en hielo desde el lugar del sacrificio hasta la fábrica. Después esta capa pasa por un proceso de inspección y de selección, y se descarta si hay evidencias visibles de defectos. Después pasa por el proceso de limpieza y eliminación de células y demás tejido extra, y lavados. Posteriormente es hidratada y congelada.

Luego las membranas son cortadas y colocadas sobre una superficie de acero inoxidable. Cada una de estas láminas es mecánicamente rebanada para eliminar capas restantes de tejido indeseable (ACELL, 2009).

Luego son inmersas por dos horas en una solución desinfectante con etanol, ácido paracético y agua bidestilada, después se sumergen en PBS en constante agitación y finalmente se le hacen dos lavado con agua bidestilada. (ACELL, 2009).

Una vez superado este punto crítico de control, se liofilizan o se cortan en sus tamaños de presentación y se envuelven en doble empaque y se esteriliza por via E beam (ISO 1137-01). Cuenta con normas de calidad como: Validación de Inactivación Viral, de Biocompatibilidad, Citotoxicidad, Sensibilización, Reactividad Intrecelular o Irritación, Toxicidad sistémica, Genotoxicidad, Estudio Pirogénico ISO Rabbit (*Pyrogen Study*), USP *Pyrogen Study 8-layer* (ACELL, 2009).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRIMARIAS Y MANTENIMIENTO DE SUBCULTIVOS IN VITRO

2.1.1 Procesamiento de la muestra

Seis muestras de piel fueron obtenidas por el servicio de cirugía del Hospital Universitario Austral, de pacientes sometidos a diversas cirugías. Una vez extraídas, siguiendo un protocolo específico, las biopsias de piel fueron colocadas en un recipiente estéril conteniendo medio de transporte que consta de HBSS (Gibco) y antibióticos Penicilina-Streptomicina (Gibco) al 1%. En primer lugar se controló la documentación pertinente, se detalló la edad del paciente, el sexo, fecha y hora de recepción de muestra, zona de toma, y otras observaciones de interés.

Una vez lista la documentación, comenzó el procesamiento de la muestra dentro de la cámara de flujo laminar, que es previamente preparado mediante una limpieza con alcohol.

Con la vestimenta apropiada (guantes estériles, cofia, mascarilla, gabacha estéril) y usando pinzas estériles, se pasaron las muestras a una placa de cultivo con 10 ml PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} (Gibco) con 2% de antibióticos, colocando la parte dérmica hacia arriba. Se examinó el espesor de las biopsias, se eliminó la grasa y todo tejido subcutáneo presente, y cuidadosamente se redujo el espesor a 0,4-0,5 mm, sin dañar el epitelio. Se lavó tres veces con 10 ml de PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} con 2% de antibióticos, en placas de cultivo. El último lavado se realizó por 30 min. Después de este periodo se aspiró el líquido dejando unas gotas en la placa para evitar la desecación.

Las muestras se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 cm de lado, utilizando tijeras estériles. Los fragmentos fueron transferidos con el lado dérmico hacia abajo a una placa con la cantidad suficiente de termolisina 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma), y se incubó durante 2 horas 30 min a 37°C, las muestras 5, 6, 7 y 8; mientras que las muestras 3 y 4 se dejaron incubando overnight con la misma enzima a 4°C. Después de este periodo, se

transfirieron las muestras a otra placa y con la ayuda de pinzas estériles se separó la dermis de la epidermis (Boyce, 2004) (Ver apéndices 2).

2.1.1.1 Aislamiento y siembra de queratinocitos

Después de obtener la capa epidérmica de las muestras, éstas se lavaron con PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} , posteriormente se pasaron a un tubo con Tripsina 0.17% (Gibco) y se incubaron a 37°C , durante 5 min. Después de este periodo, se agitó suavemente con el fin de liberar los queratinocitos de la capa córnea, observándose la turbidez generada. Para inhibir la acción de la tripsina, se agregó 10% del volumen de SFB (Natocor), y se filtraron las suspensiones celulares a través de un filtro de $70\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Cell strainer, Falcon), utilizando un tubo para centrifuga de 50 ml como receptor. Se lavó el tubo de la suspensión celular con HBSS, y se filtró agregando al filtrado anterior correspondiente.

El filtrado total se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 min a 8°C . Posteriormente se aspiró y se eliminó el sobrenadante.

El pellet obtenido se resuspendió en un volumen definido, y se tomó una alícuota para realizar el conteo mediante la técnica de exclusión con azul tripán (Gibco) (Ver conteo celular). Una vez calculado el número de células y el porcentaje de viabilidad, se sembraron los queratinocitos en diferentes recipientes de cultivo con diferentes densidades de siembra de acuerdo a la cantidad de queratinocitos obtenidos y a los objetivos específicos de cada experimento. Se le agregó el medio de cultivo respectivo (EpiLife®, suplementado con factores de crecimiento (Gibco) y antibióticos, se incubó a 37°C , 5% de CO_2 , y se le cambió el medio cada 2-3 días hasta que alcanzó un 80% de confluencia, condición en la que era subcultivado (Ver subcultivo de queratinocitos). (Boyce, 2004)

Para incrementar la adhesión de los queratinocitos, se preparó un recubrimiento de la superficie de la placa a sembrar. Para ello, se preparó 1,7 ml del medio de dilución (Recubrimiento Matrix Kit, Gibco) junto con 0,017 ml de colágeno tipo I (Gibco). En

cada uno de los pozos a sembrar, se colocó un volumen del recubrimiento, suficiente como para cubrir toda la superficie de la placa y se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este periodo, se eliminó la solución de cada pozo cuidando de no rasgar la superficie con la punta de la micropipeta. Posteriormente, se realizó la siembra de las células.

En determinados casos, se sembró queratinocitos en las placas termosensibles de 30 mm (P30) probando diferentes inóculos (todos superiores a 4×10^4 cel/cm²) diferentes inóculos.

2.1.1.2 Aislamiento y siembra de fibroblastos

La dermis obtenida en el procesamiento de la muestra se transfirió a una placa con HBSS, en cantidad suficiente como para humectar la muestra, y con una tijera estéril se cortó en segmentos más pequeños, que fueron colocados en un tubo estéril con cantidad suficiente de colagenasa tipo 1A al 0,05% (Sigma). Se incubó con agitación periódica a 37°C durante 40-90 min hasta observar digestión. La suspensión obtenida fue filtrada a través de un cell strainer (Falcon, poro 70 µm). Después de filtrar toda la suspensión, a este mismo tubo se le hizo un lavado con HBSS que también fue filtrado. El filtrado total obtenido se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 min, a 8°C.

Después del centrifugado, se aspiró y se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el pelet obtenido en un volumen definido de medio de cultivo DMEM con SFB al 10%, antibióticos y L-glutamina al 1%, Se procedió al conteo de células y cálculo de viabilidad (Ver conteo celular). Una vez obtenido el número de fibroblastos y su viabilidad, se procedió a sembrarlas en diferentes recipientes de cultivo en y diferentes inóculos de acuerdo a la cantidad de células obtenidas y al objetivo de cada experimento. Se agregó el volumen de medio adecuado (DMEM suplementado con SFB al 10%, 1% de antibiótico Penicilina-Estreptomicina y 1% de L-Glutamina). Se incubó a 37°C, 5% de CO², cambiando el medio cada 2-3 días hasta que alcanzaron una confluencia del 80% para subcultivar. (Ver subcultivo de fibroblastos). (Boyce, 2004)

2.1.2 conteo celular y viabilidad celular

De la suspensión celular –ya sea fibroblastos o queratinocitos-, se tomó una alícuota de 10 µl y se mezcló con el mismo volumen de azul tripán al 4% (Gibco). De esa mezcla, se tomaron 10 µl y se colocaron en una cámara de Neubauer. Se contaron los cuatro cuadrantes, tanto células vivas como células muertas. Posteriormente se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = (\text{N}^\circ \text{ de células contadas} / 4) \times 2 \times 10^4$$

$\text{N}^\circ \text{ de células totales} = \text{n}^\circ \text{ de células/ml} \times V$, siendo V el volumen en el que se resuspendió el pellet.

La viabilidad se calculó como:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \text{N}^\circ \text{ de células vivas} / \text{N}^\circ \text{ de células totales} \times 100.$$

2.1.3 Subcultivo de células

El subcultivo de fibroblastos o queratinocitos se realizó cuando las células alcanzaron el 70% u 80% de confluencia dentro del frasco o placa de cultivo. Para ello se aspiró el medio de cultivo respectivo de los frascos o las placas conteniendo las células. Se lavó con PBS sin Ca^{++} y Mg^{++} , que luego fue aspirado y descartado. Se agregó tripsina 0,05% - EDTA 0,02% (Gibco), en cantidad suficiente como para cubrir la superficie de los frascos, que fueron incubados durante 5 minutos. Pasado este periodo se ayudó al despegue de las células golpeando cuidadosamente los frascos y verificando en el microscopio el despegue. Se bloqueó la acción de la tripsina con SFB en relación 1:10. Se aspiró el contenido de los frascos y se colocó en tubos estériles de 15 ml. Se volvió a lavar los frascos con PBS sin Ca^{++} y Mg^{++} , y este contenido se agregó a los tubos anteriores.

De ser necesario, se ayudó el despegue de las células mediante el uso de un rastrillo, realizando un nuevo lavado, que fue agregado a la suspensión anterior para ser centrifugada.

Se centrifugó la suspensión a 1000 r.p.m., a 8°C, durante 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en un volumen medido de medio de cultivo respectivo de cada tipo

celular. Se realizó el conteo de células y el cálculo de viabilidad, se procedió a sembrar en placas nuevas. Se agregó el volumen de medio adecuado respectivo y se incubaron los frascos o placas a 37°C, 5% CO₂. Se cambió el medio cada 2-3 días.

De ser necesario, el procedimiento de subcultivo se repitió cuando las células alcanzaron nuevamente una confluencia de 70%-80%.

2.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS IN VITRO

2.2.1 Eficiencia de levantamiento de fibroblastos por método enzimático y mecánico

De una misma muestra de fibroblastos (mismo paciente, mismo pasaje y mismas condiciones de cultivo), cultivados en dos placa de cultivo, se hicieron dos tipos de levantamiento. El primero fue realizado con tripsina 0,05%-EDTA 0,02%, y el segundo fue realizado con rastrillo. El levantamiento enzimático fue llevado a cabo como se procedió a contar las células y calcular su viabilidad según el protocolo.

El levantamiento mecánico se hizo con la ayuda de un rastrillo estéril, el que fue pasado cuidadosamente por toda la superficie de la placa, sin eliminarle el medio de cultivo. Se mencionó anteriormente (subcultivo de células). Una vez realizado el levantamiento se controló el despegue mediante observación microscópica, se aspiró el medio de cultivo, y se puso en un tubo para centrifugar. Después, se hicieron lavados con HBSS, y estas soluciones de lavado fueron agregadas al mismo tubo para centrifugar.

Se centrifugó a 8°C, durante 10 min. a 1000 r.p.m. Realizado este proceso, se descartó el sobrenadante y el pelet obtenido se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo, y se contó según el protocolo descrito anteriormente.

2.2.2 Cálculo del inóculo mínimo a sembrar de fibroblastos y queratinocitos.

2.2.2.1 Fibroblastos subcultivados

Fibroblastos de pasaje 3, 7 y 13 que alcanzaron una confluencia del 80% fueron levantados normalmente. Después de obtener la suspensión celular, se realizaron respectivamente tres soluciones madre de las cuales se sembraron un volumen determinado para realizar los siguientes inóculos, del pasaje 4 se sembraron 350, 175, 72, 36, 7 y 3 cél/cm², con 5 repeticiones c/u; del pasaje 8 se sembraron 1250, 625, 312, 156, 62, 31, 6, 1 cél/cm², con 9 repeticiones cada inóculo y finalmente las células del pasaje 14 fueron sembradas de la misma manera que el pasaje 4 con el mismo número de repeticiones. Todas las placas se incubaron en condiciones normales durante 10 días sin cambio de medio, revisándolas de día por medio. (Freshney, 2005, modificado por Lorenti*) (Ver Apéndice 3a y 3b)

2.2.2.2 Queratinocitos subcultivados

Los queratinocitos de un cultivo de pasaje 2 que alcanzaron una confluencia del 70-80%, se levantaron normalmente. Después de obtener la suspensión celular, se sembró un determinado volumen para sembrar los siguientes inóculos en una placa multipozo: 1250, 625, 312, 156, 62, 31, 6, 1 cél/cm², con 9 repeticiones cada inóculo. La placa se dejó incubando en condiciones normales durante 10 días sin cambio de medio, revisándolas de día por medio. (Ver Apéndice 3c)

Nota: Antes de sembrar los queratinocitos a cada pozo utilizado de la placa de 96 pozos se les hizo un recubrimiento con colágeno tipo I

2.2.3 Evaluación de un recubrimiento de Ácido Hialurónico a diferentes concentraciones, y Colágeno tipo I, sobre el comportamiento fibroblastos y queratinocitos subcultivados

2.2.3.1 Preparación de los recubrimientos.

A partir de una solución madre de ácido hialurónico 5 mg/ml, se preparó 2,5 ml de una solución 200 µg/ml, tomando 100 µl de la solución inicial y disolviéndola en 2,4 ml de PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺ frío (4°C).

Posteriormente, de la solución anterior se tomó 1 ml y se disolvió en 1 ml de PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} , para obtener una solución 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido hialurónico. Ambas soluciones fueron dispensadas inmediatamente.

En una microplaca de 12 pozos, se hicieron cuatro columnas con tres réplicas cada una, de los siguientes recubrimientos o recubrimientos:

Columna 1: 0,5 ml de una solución de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido hialurónico

Columna 2: 0,5 ml de una solución de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido hialurónico.

Con ambas concentraciones el recubrimiento se dejó toda la noche en la refrigeradora y el exceso de líquido fue posteriormente eliminado.

En la columna 3 del misma microplaca de 12 pozos mencionado en el punto anterior, se hizo un recubrimiento con colágeno tipo I, agregando 0,5 ml de disolvente con 5 μl de colágeno tipo I en cada uno de los pozos. Este recubrimiento se dejó reposando por 30 minutos en la cámara de flujo laminar y luego se eliminó la solución restante.

2.2.3.2 Sembrado fibroblastos subcultivados

Fibroblastos p1

Una vez listo el recubrimiento, cada uno de los pozos fue inoculado con 300 fibroblastos (Ver Apéndice 4a), lo cual representa un inóculo de 78 $\text{cél}/\text{cm}^2$. En la columna 4 de la misma placa, se sembraron fibroblastos con igual inóculo, sin recubrimiento (directamente sobre la placa) para utilizarlo como control.

Este experimento se realizó con fibroblastos provenientes de un primer subcultivo (P1). En este último caso, la placa se incubó hasta que cada uno de los pozos alcanzara confluencia, realizando observaciones diariamente, y registrando las diferentes observaciones y diferencias. Este ensayo se evaluó durante 28 días (Ver apéndice 4).

Fibroblastos p16

En este caso cada uno de los pozos fue inoculado con inóculo de $0,1 \times 10^4$ $\text{cél}/\text{cm}^2$, de fibroblastos con 16 subcultivos (Ver Apéndice 4b). De la misma manera, en la columna

4 de la misma placa, se sembraron fibroblastos con igual inóculo, sin recubrimiento (directamente sobre la placa) para utilizarlo como control.

La placa fue revisada a los 3, 7, 14 y a los 21 días de cultivo anotando las diferencias y observaciones permitientes respectivas de cada recubrimiento.

2.2.3.3 Sembrado de queratinocitos subcultivados

Para el caso de los queratinocitos (Ver apéndice 4c) se utilizaron células de un pasaje 1. Se colocó un inóculo de $9,2 \times 10^3$ cél/cm². De cada uno de los tres tipos de recubrimiento se hicieron dos réplicas, además de un control.

Además, se suplementó el medio para queratinocitos con 1% de SFB, que fue dejado por tres días, el cuarto día se le cambió el medio respectivo pero sin suplementar con SFB y se dejó durante una semana más. A los 13 días se evaluó el desarrollo sobre los distintos recubrimientos y controles.

2.2.4 Eficiencia de sembrado de fibroblastos subcultivados

Células de pasaje 1, que habían alcanzado 95% de confluencia, fueron levantadas (Ver protocolo de subcultivo), y la suspensión fue centrifugada a 1000 r.p.m. por 10 minutos a 10°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio de cultivo. Se contó la cantidad de células obtenidas.

En una microplaca de 12 pozos, se sembró de la siguiente forma (Ver apéndice 5):

- ✓ Dos columnas (seis pozos) con un inóculo de 9 700 células/cm²
- ✓ Dos columnas (seis pozos) con un inóculo de 97 000 cél/cm².

Se incubaron durante tres horas continuas a 37°C, 5% de CO₂. Después de este periodo se aspiró el medio de cultivo de 2 de los 6 pozos con inóculo de 9 700 células/cm² y de dos de los seis pozos con inóculo de 97 000 cél/cm². Estos sobrenadantes se colocaron separadamente en tubos, se centrifugaron y se contaron las células contenidas en el pellet de cada uno. Se calculó un promedio (N1), para cada uno de los inóculos. Por otro lado,

las células que se habían adherido a las superficies de estos mismos pozos durante las primeras 3 horas, fueron despegadas y contadas, calculando un promedio (N2) para cada uno de los inóculos.

Se realizaron los siguientes cálculos:

- Porcentaje de células pegadas: $N2 / \text{células sembradas totales} \times 100$.
- Porcentaje de células no pegadas: $N1 / \text{células sembradas totales} \times 100$
- Finalmente se comparó $N1 + N2$ con el número sembrado inicial.

Todo el procedimiento anterior se repitió a las 6 y 24 horas después de la siembra, calculándose los porcentajes ya mencionados, para los distintos tiempos.

2.2.5 Ensayo de *wound healing*: Migración celular de fibroblastos y queratinocitos

2.2.5.1 *Fibroblastos subcultivados*

A una placa de cultivo de fibroblastos confluentes de pasaje ocho, se le trazaron dos líneas perpendiculares con la punta de una micropipeta de 200 μl . Después de realizar el trazo con la punta (estría), se le cambió el medio de cultivo respectivo, sin suplementar con el SFB al 1%. Se revisó la placa con el microscopio invertido y se seleccionaron dos sectores de la estría, los cuales fueron fotografiados a las 6, 24 y 48 horas de haber realizado la estría, para estimar la migración de las células.

2.2.5.1 *Queratinocitos subcultivados*

A una placa de cultivo de queratinocitos confluentes de pasaje cuatro, se le trazaron dos líneas perpendiculares con la punta de una micropipeta de 200 μl . Después de realizar la estría (trazado), se le cambió el medio de cultivo respectivo, sin suplementar con el SFB. Se revisó la placa con el microscopio invertido y se seleccionaron dos sectores de herida, los cuales fueron fotografiados durante cinco días a la misma hora, para estimar la migración de las células.

2.3 PRUEBAS CON MATRISTEM®

2.3.1 Preparación de la membrana

Para la realización de este ensayo la cámara de flujo laminar fue limpiada minuciosamente con alcohol 70°, y se estableció dentro de ésta un campo estéril. Se colocó sobre ese campo todo el material estéril que se iba a usar durante el procedimiento (pinza curva, pinza punta ancha, tijeras, sutura monocril 5-0).

La membrana MatriStem® (ACELL) de 3 x 3 cm, se cortó a la mitad dejando dos trozos de 1,5 x 3 cm. Con la ayuda de un asistente, 2 placas de 60 mm y una de 100 mm fueron colocadas en el campo estéril. En cada una de las placas de 60 mm, se colocó una de las mitades de la membrana, con el lado de la lámina opaco hacia arriba. A su vez se colocó un ml de DMEM con antibiótico, SFB (10%) y L-glutamina en cada una de las placas.

En una de las mitades de la membrana se colocaron suturas en los cuatro vértices que se sujetaron con cinta estéril a la base de la placa ejerciendo una ligera tensión.

La otra membrana se la dejó flotando en otra placa, sin tensión (Ver apéndice 6).

2.3.2 Sembrado de fibroblastos

Las membranas, preparadas como se describió, fueron sembradas con fibroblastos de un pasaje 7, con un inóculo de 5000 cél/cm², en cada membrana. Las células fueron cuidadosamente colocadas sobre toda la superficie de las membranas, tratando de evitar que cayeran fuera de las membranas. Ambas placas se colocaron en la incubadora, cambiando el medio cada 3 días.

2.3.3 Evaluación de las células sobre el andamio con microscopía de Fluorescencia

Láminas con los fibroblastos fueron teñidas con faloidina para observar la estructura de las células sobre las láminas, y con yoduro de propidio para la observación de los núcleos. Las observaciones fueron realizadas con microscopio de fluorescencia.

3 RESULTADOS

3.1 PROCESAMIENTO DE LAS DISTINTAS MUESTRAS: AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS Y MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

En las seis muestras procesadas se obtuvieron resultados similares. Se aislaron entre $2,5-4 \times 10^6$ queratinocitos con una viabilidad entre 50-92%. Los queratinocitos fueron sembrados en superficies para cultivo *in vitro* (Figura 3.1, 3.2 y 3.3), con inóculos entre $2-8 \times 10^4$ cél/cm², siendo el inóculo que mejor resultó de 4×10^4 cél/cm², ya que entre 7 y 10 días el cultivo alcanzaba la confluencia ideal para amplificar. Los queratinocitos pudieron ser subcultivados hasta un cuarto pasaje. A partir de éste, las células empezaban a mostrar menor adhesión, migración y proliferación.

Células provenientes de dos muestras fueron inoculadas en placas P30 termosensibles, de origen japonés, no habiéndose obtenido adhesión celular en ellas.

La adhesión de las células epiteliales fue siempre dificultosa, tanto las células primarias como las subcultivadas, ya que no siempre se lograba una adhesión óptima.

En cuanto a la amplificación, siempre se observó que de una placa p60 de cultivo primario confluyente, se obtenía cantidad suficiente de células como para amplificar 1:2, respetando el inóculo mínimo a sembrar. Hay que marcar una diferencia importante, en el caso de las células primarias el inóculo mínimo a sembrar es el mencionado anteriormente, mientras que para un subcultivo, la cantidad a inocular podía ser inferior a esta (alrededor de $1-4 \times 10^4$ cél/cm²).

La presencia de fibroblastos puede suponerse, pero para afirmar hay que comprobar su presencia con tinciones, por ej. Yo pondría esto: en los cultivos primarios de queratinocitos se observó la presencia de células de características morfológicas compatible con células epiteliales, así como también algunas de aspecto fibroblástico, que iban desapareciendo con el tiempo.

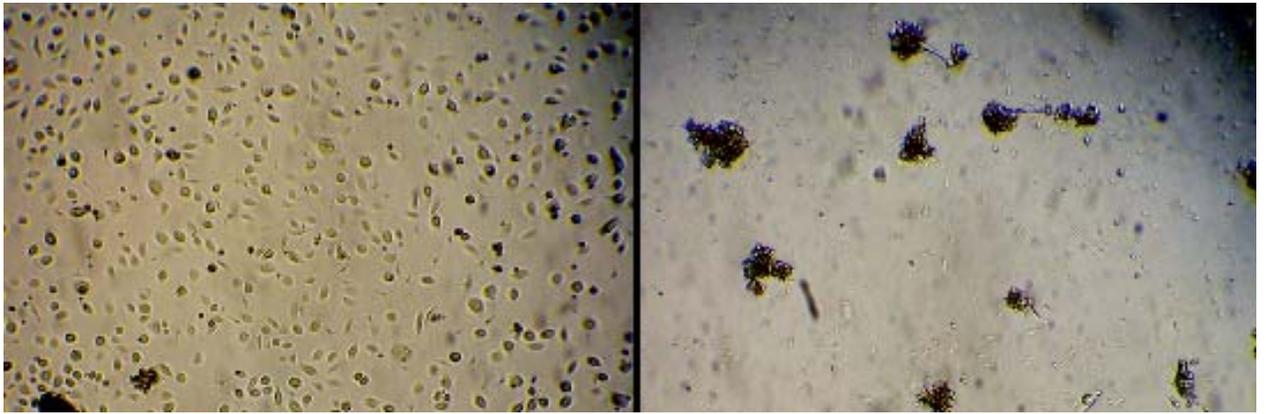


Figura 3.1. Imágenes de los queratinocitos primarios aislados de la muestra P00309 a la semana de cultivo



Figura 3.2. Queratinocitos aislados de la muestra P00409, sembrados con un inóculo de 4×10^4 cél/cm². Se observa una típica morfología de célula epitelial basal (10x)

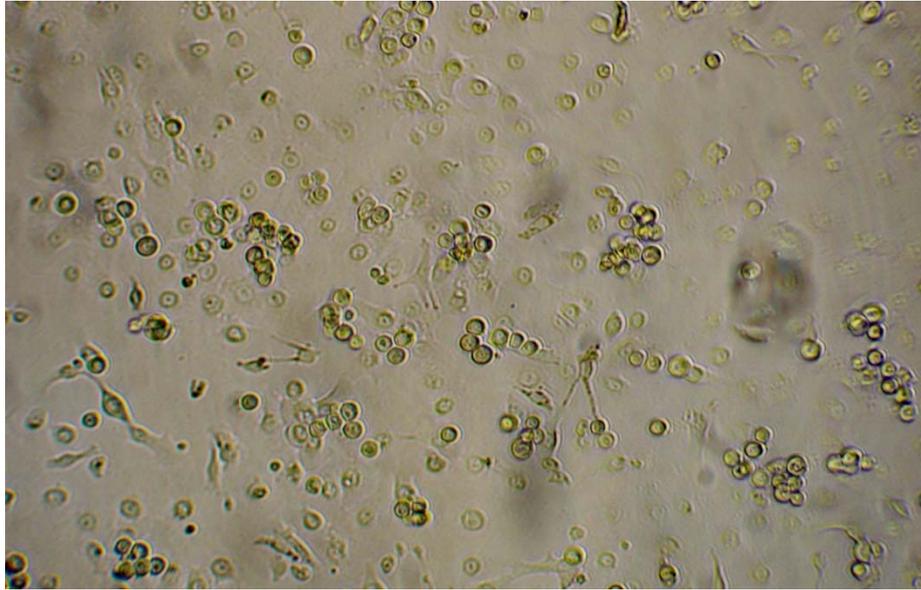


Figura 3.3. Queratinocitos aislados de la muestra P00509, a los 5 días de la siembra. Se observa baja adhesión de las células (4x)

En cuanto a los fibroblastos, de las muestras se aislaban un promedio de $2-5 \times 10^5$ células con una viabilidad de 95% o superior.

Los fibroblastos fueron inoculados en cantidades desde $0,8 \times 10^3$ para las células subcultivadas, y de 4×10^4 cél/cm² para las primarias (Figura 3.4 y 3.5). En todos los casos, el inóculo inicial fue determinante para asegurarse del éxito de las células recién aisladas. A la semana de siembra de los fibroblastos primarios, éstos alcanzaban la confluencia ideal para ser subcultivadas (80%), logrando una amplificación de 1:6, lo que demuestra que estas células tienen gran capacidad proliferativa.

Además, estas células mostraron buena capacidad de adhesión, migración, y proliferación.

Los fibroblastos pudieron ser subcultivados hasta el pasaje 16, a partir del cual comenzó a notarse una disminución en la adhesión, migración y proliferación.

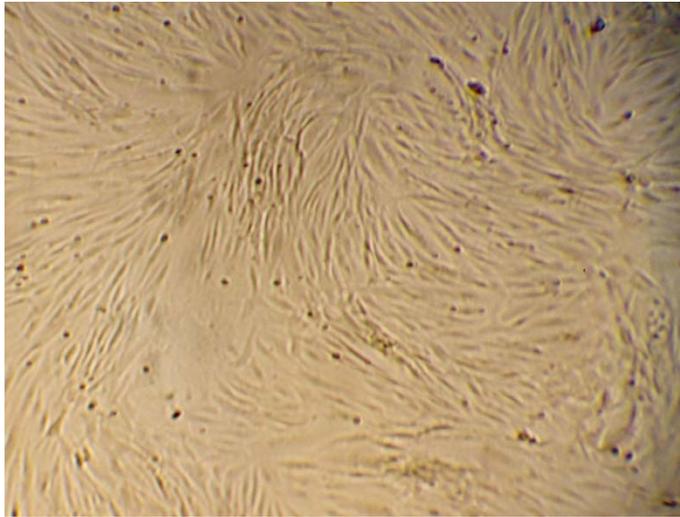


Figura 3.4. Fibroblastos primarios confluentes a los 7 días de siembra, provenientes de la muestra P00309 (4x)

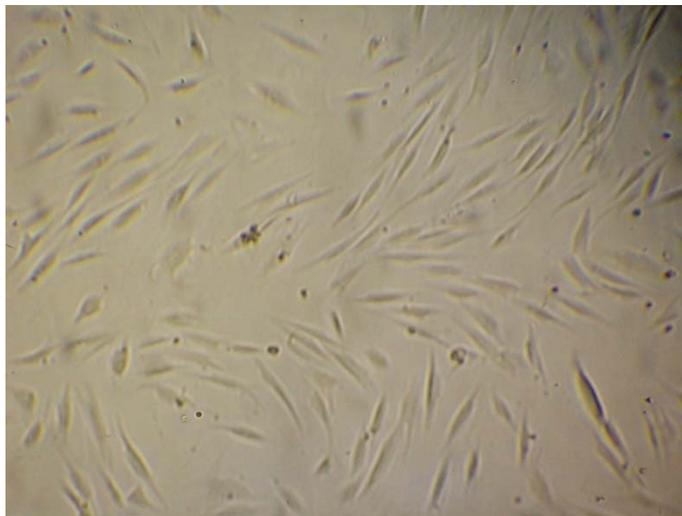


Figura 3.5. Fibroblastos primarios de la muestra P00409, a los 4 días de cultivo (4x).

3.2 ENSAYOS IN VITRO

3.2.1 Comparación en la eficiencia de levantamiento de fibroblastos por método enzimático y mecánico.

A continuación se muestra, en el cuadro 2, la cantidad de células aisladas, así como la viabilidad obtenida con los dos tipos de levantamiento celular, como se explicó en Materiales y Métodos. Las muestras utilizadas eran placas de 60 mm (25 cm² de área) por

duplicado, con fibroblastos de la misma muestra, de un pasaje N° 8, que se encontraban en similares condiciones en cuanto a su confluencia al momento de levantarlas. Como se puede observar en el cuadro, la viabilidad en ambos tipos es bastante alta, aunque fue ligeramente superior en la que se utilizó el método enzimático. La diferencia más notable radica en el número de células obtenidas, así como la presencia de acúmulos observados durante el recuento celular en la placa levantada por el método mecánico. Es importante mencionar, que a la hora de verificar microscópicamente el desprendimiento de las células, éste era completo en ambas placas.

Tabla 2. Cantidad y viabilidad de las células obtenidas por levantamiento enzimático y mecánico en una muestra de fibroblastos.

Levantamiento	Cél. Vivas	Cél. muertas	Viabilidad
Enzimático	$1,375 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$	99%
Mecánico	4×10^5	$2,5 \times 10^4$	94%

*Muestra proporcionada por el UTC-R&D, Buenos Aires, Argentina. 2009

En las siguientes figuras se observa uno de los acúmulos resultantes después de levantar con el rastrillo, en el día 1 y 2 de la resiembra y la comparación con las células obtenidas por el levantamiento con tripsina, tanto en el primero como el segundo día después de la siembra.



Figura 3.6. Muestra del levantamiento mecánico con rastrillo. Acúmulo de fibroblastos al primer y segundo día respectivamente posterior a la siembra. A: 10x, B: 4x

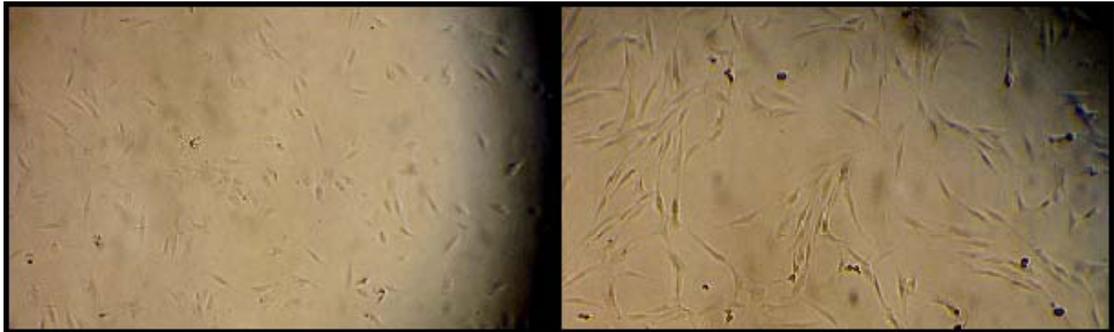


Figura 3.7. Muestra levantada enzimáticamente con Tripsina-EDTA al primer y segundo día de siembra respectivamente (4x).

3.2.2 Calculo del inóculo mínimo a sembrar de fibroblastos y queratinocitos.

En el cuadro siguiente se muestran los resultados de los ensayos realizados para calcular, en ambos tipos celulares, el inóculo mínimo de células a sembrar para obtener adhesión y proliferación. Nótese que cuanto menor es el número de pasaje (Figura 3.8 y 3.9), menor fue el inóculo de células que podía ser inoculada con crecimiento exitoso. A pesar de que se logró crecimiento a concentraciones muy bajas, en esos casos las células mostraban signos de estrés, manifestados por una morfología ligeramente diferente a la que se observó en los inóculos mayores.

Tabla 3. Cantidad mínima a sembrar de células por cm^2 , de fibroblastos con diferentes pasajes.

Fibroblastos subcultivados	cél/ cm^2
Pasaje 4	72
Pasaje 8	156
Pasaje 14	1 000



Figura 3.8. Diferentes fotografías de los fibroblastos P4, a los 10 días de cultivo con un inóculo de 72 cél/cm². (10x)

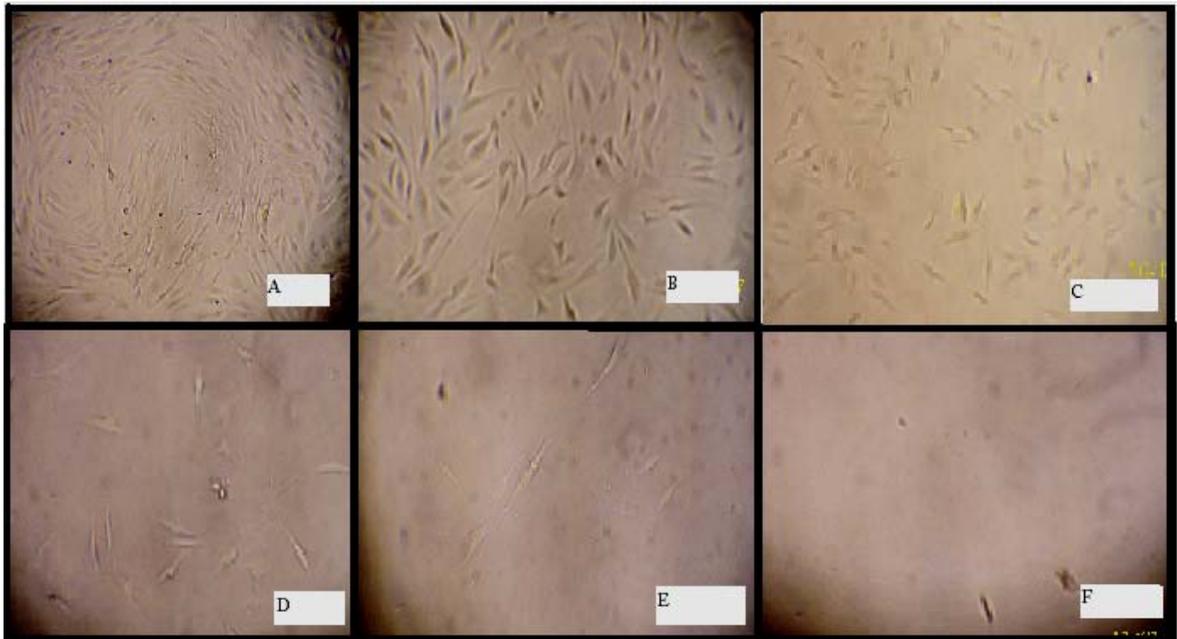


Figura 3.9. Confluencia obtenida después de 10 de cultivo con diferentes concentraciones de fibroblastos P8 sembrados en una placa multiwell de 96 pozos. A: inóculo de 1250 células/cm². B: inóculo 625 células/cm². C: inóculo 312 células/cm². D: inóculo 156 células/cm². E: inóculo de 62 células/cm². F: inóculo 31 células/cm². **Nota:** los Pozos G y H, no se muestran en la figura. (4x)

En el caso de los queratinocitos, ninguno de los inóculos que se probó logró crecimiento (Figura 3.10), y por supuesto tampoco confluencia. Las células se encontraban adheridas parcialmente y no adoptaban una morfología típica de célula basal. Las densidades probadas fueron las mismas que para los fibroblastos P8 (experimento anterior).

Según el resultado mencionado, se considera que el inóculo mínimo a sembrar debe ser superior a todas las concentraciones probadas, sin embargo se afirma enfatizando que se

está hablando de células subcultivadas. Se observa en la figura a continuación que no hubo una adherencia total, sino que ésta fue parcial. Esto se deduce por la observación de la morfología redondeada de las células en lugar de poligonal, característica del queratinocito en estado basal y adherido a la superficie totalmente. No hubo proliferación.

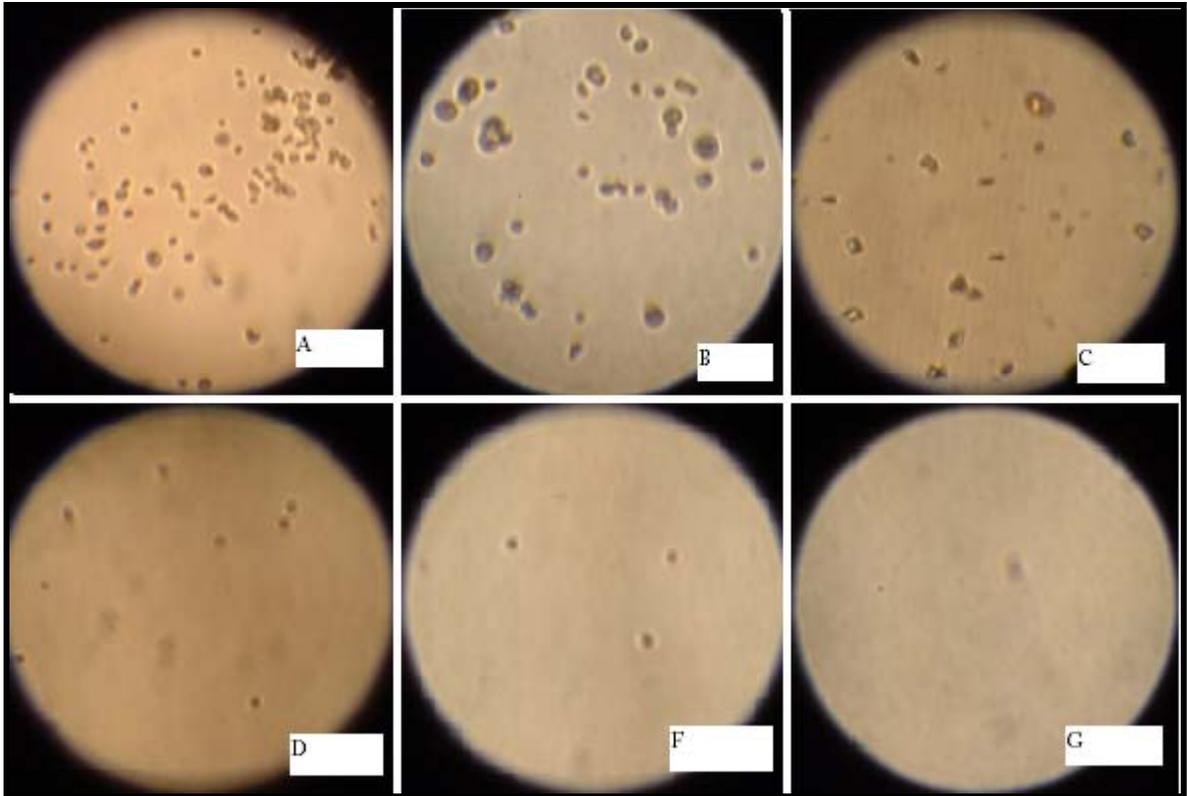


Figura 3.10. Estado de los queratinocitos P2 después de 10 de cultivo, sembrados a diferentes concentraciones en una placa multiwell de 96 pozos. A: inóculo de 1250 células/cm². B: inóculo 625 células/cm². C: inóculo 312 células/cm². D: inóculo 156 células/cm². E: inóculo de 62 células/cm². F: inóculo 31 células/cm². **Nota:** los Pozos G y H, no se muestran en la figura. (4x).

3.2.3 Evaluación de la adherencia celular sobre un recubrimiento de Ácido Hialurónico a diferentes concentraciones, y Colágeno tipo I.

3.2.3.1 Adhesión de fibroblastos subcultivados

La capacidad de adhesión de los fibroblastos a distintas superficies, ensayada sobre cobertura con colágeno, ácido hialurónico (100 y 200 ug/ml) y la superficie del plástico de cultivo como control, mostró los siguientes resultados: al día 3 de cultivo, el número

de células contabilizadas fue similar en todas las superficies, mostrando una buena adhesión en todos los recubrimientos. Para los fibroblastos del subcultivo P1, el recubrimiento que tuvo el mejor efecto en el pegado, proliferación y morfología es el del ácido hialurónico 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los fibroblastos de un subcultivo P16 mostraron similar comportamiento, aunque alcanzaron una mayor confluencia en menor tiempo. En la figura 3.11 y 3.12 se muestran las imágenes de los fibroblastos de los pasajes P1 y P16 respectivamente en cada uno de los diferentes recubrimientos a los 21 días de la siembra. En el recubrimiento de ácido hialurónico 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se observó la mayor cantidad de células, y el mayor porcentaje de confluencia, comparado con los resultados obtenidos con el recubrimiento de ácido hialurónico 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el control. Finalmente en el recubrimiento de Colágeno tipo I, los fibroblastos se observan con morfología alterada

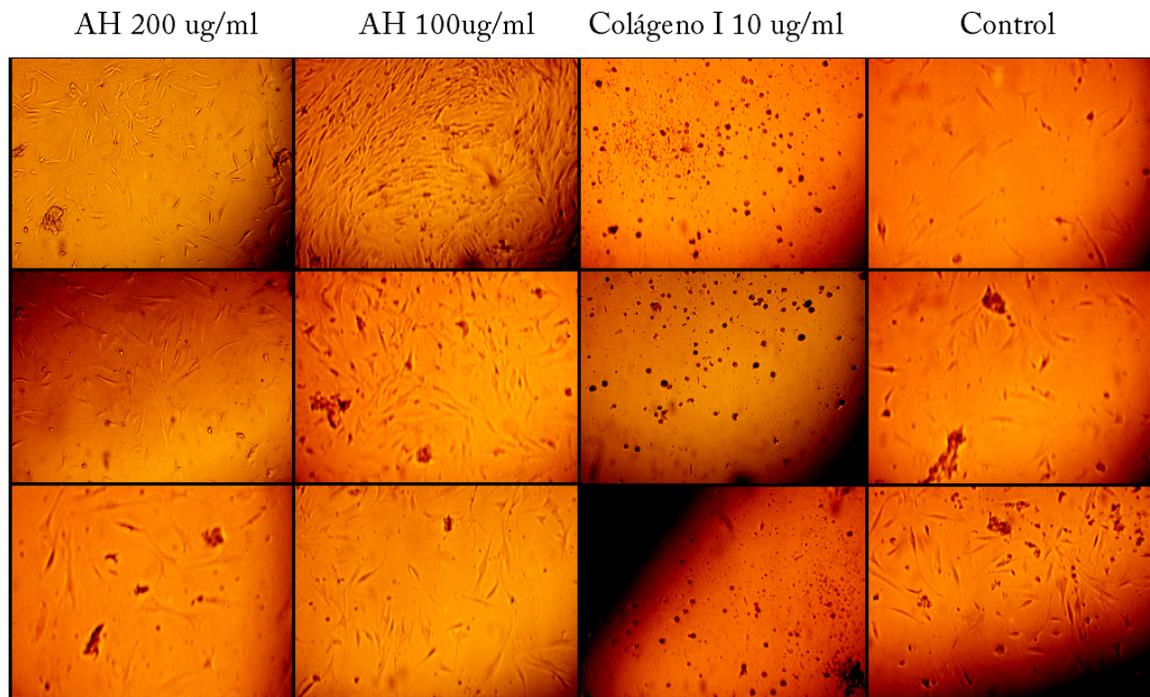


Figura 3.11. Estado de los fibroblastos de pasaje 1 en cada uno de los diferentes recubrimientos probados y el control (4x)

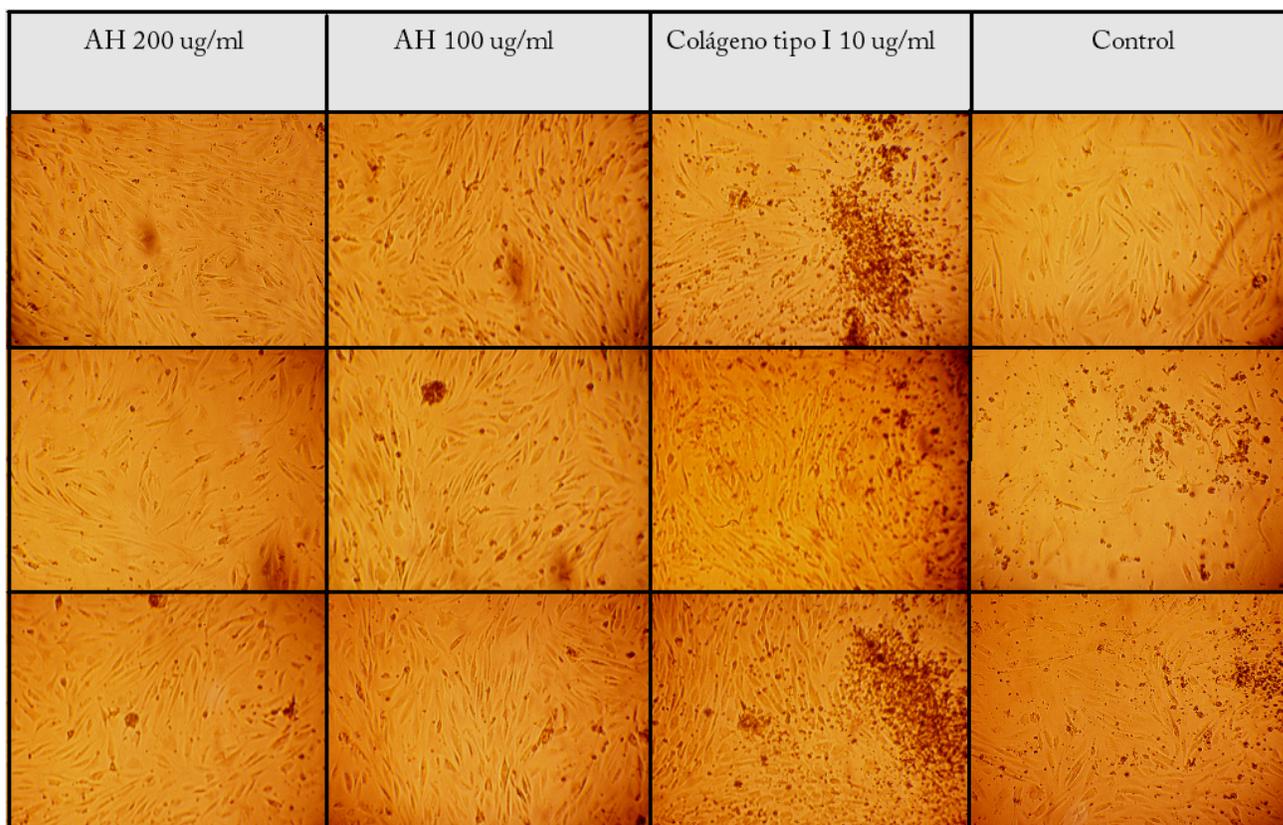


Figura 3.12. Estado de los fibroblastos de pasaje 16, a los 21 días en cultivo, en cada uno de los diferentes recubrimientos probados y el control (4x)

3.2.3.2 Adhesión de queratinocitos subcultivados a diferentes recubrimientos

La adhesión de queratinocitos a diferentes coberturas de superficie fue ensayada de manera similar a los fibroblastos (Figura 3.13). Fueron usados en estos experimentos queratinocitos subcultivados, de un pasaje 1, con un inóculo de $9,2 \times 10^3$ cél/cm². Los queratinocitos mostraron mayor adhesión, migración, proliferación y mejor morfología en el recubrimiento de colágeno 10 ug/ml. En la siguiente figura se muestran los queratinocitos al tercer día, en el recubrimiento de colágeno tipo I, observándose muy buena adhesión y morfología con característica de células basales, que son condiciones ideales que permitirán mantener en buenas condiciones y amplificar el cultivo de queratinocitos *in vitro*. Por el contrario, en los otros recubrimientos, los queratinocitos se observan parcialmente pegados y con una morfología de aspecto regular.

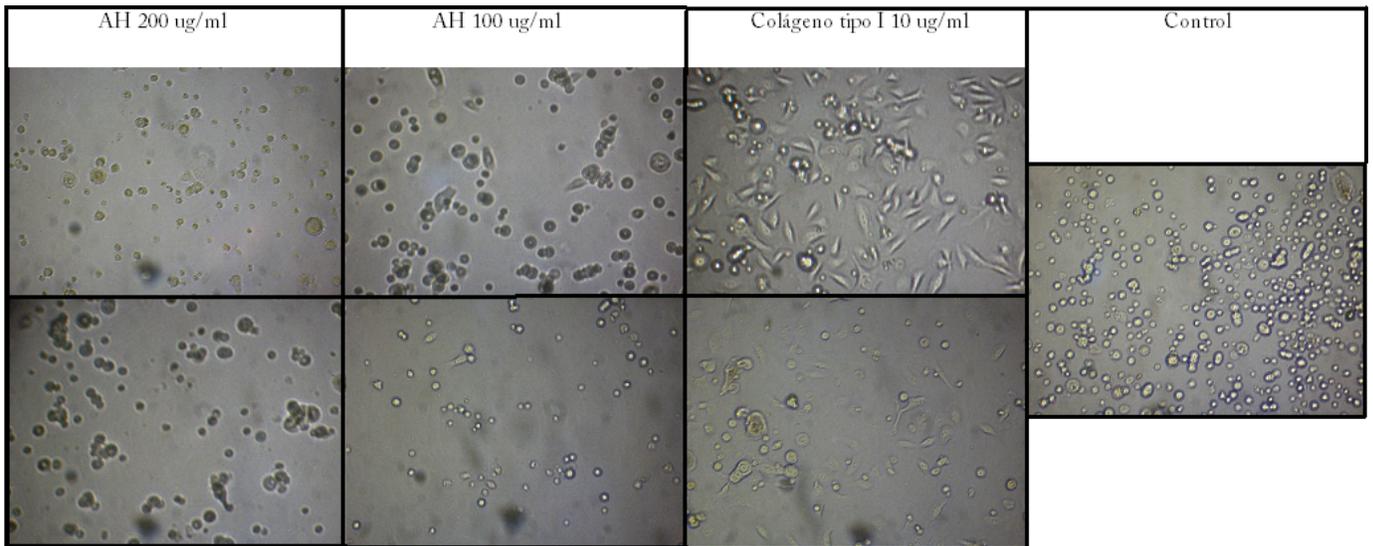


Figura 3.13. Morfología de los queratinocitos subcultivados al tercer día de siembra sobre los diferentes recubrimientos o recubrimientos (4x)

A los 13 días de cultivo y sin cambio del medio de cultivo desde el cuarto día, los resultados cambiaron considerablemente respecto de la primera evaluación al tercer día, ya que ambos recubrimiento de AH mostraron un 100% de confluencia. En el de 100 $\mu\text{g/ml}$ se observó que las células empezaban a estratificarse igualmente que en el del colágeno. Por otro lado en el recubrimiento de colágeno tipo I, las células en su mayoría se encontraban estratificándose (Figura 3.14). Además, en el control, existían algunos sectores confluentes, pero en su totalidad, la confluencia era menor que en las superficies con recubrimientos.

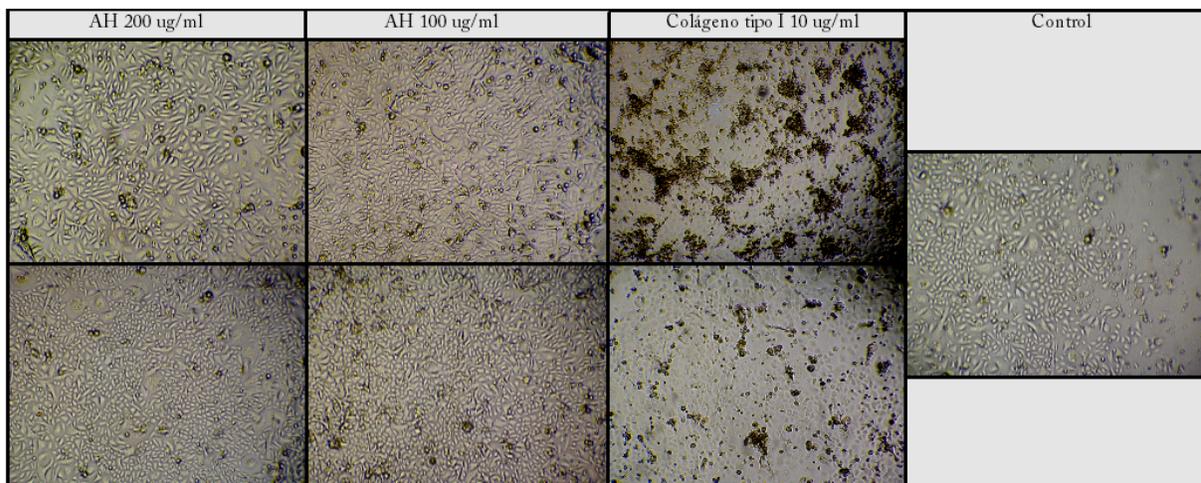


Figura 3.14. Morfología de los queratinocitos subcultivados al día 13 de cultivo sobre los diferentes recubrimientos (4x)

3.2.4 Eficiencia de sembrado de fibroblastos subcultivados

Los ensayos de eficiencia de sembrado, calculada como porcentaje de células adheridas a las 3, 6 y 24 horas de sembrados, fueron realizados con fibroblastos. Se puede afirmar que después de las seis horas de la siembra casi no hubo un incremento en la adhesión. Por lo tanto seis horas son necesarias para la adhesión de estas células

Tabla 4. Eficiencia de sembrado de fibroblastos

Tiempos	Células no adheridas	Células adheridas	% adhesión	Células totales
Hora 0				
9 700 cèll/cm ²	-	-	-	9 700 cèll/cm ²
97 000 cèll/cm ²	-	-	-	97 000 cèll/cm ²
3 horas				
9 700 cèll/cm ²	1,9 x 10 ³ cèll/cm ²	7,3 x 10 ³ cèll/cm ²	78,5%	9,2 x 10 ³ cèll/cm ²
97 000 cèll/cm ²	3,9 x 10 ³ cèll/cm ²	9,1 x 10 ⁴ cèll/cm ²	95%	9,5 x 10 ⁴ cèll/cm ²
6 horas				
9 700 cèll/cm ²	1,3 x 10 ³ cèll/cm ²	7,9 x 10 ³ cèll/cm ²	86%	9,2 x 10 ³ cèll/cm ²
97 000 cèll/cm ²	0,7 x 10 ³ cèll/cm ²	9,6 x 10 ⁴ cèll/cm ²	99%	9,6 x 10 ⁴ cèll/cm ²
24 horas				
9 700 cèll/cm ²	1,3 x 10 ³ cèll/cm ²	8,5 x 10 ³ cèll/cm ²	87%	9,8 x 10 ³ cèll/cm ²
97 000 cèll/cm ²	0,7 x 10 ³ cèll/cm ²	9,6 x 10 ⁴ cèll/cm ²	99%	9,6 x 10 ⁴ cèll/cm ²

3.2.5 Capacidad de migración de fibroblastos y queratinocitos: Ensayos de *wound healing*

3.2.5.1 Migración de fibroblastos subcultivados

Los ensayos de migración mostraron que los fibroblastos migraron e invadieron el sitio de la herida a las 24 horas. Su movimiento es al azar y en cuestión de 48 horas son capaces de poblar toda la zona con una confluencia del 100%, tal y como se muestra en la Figura 3.15.

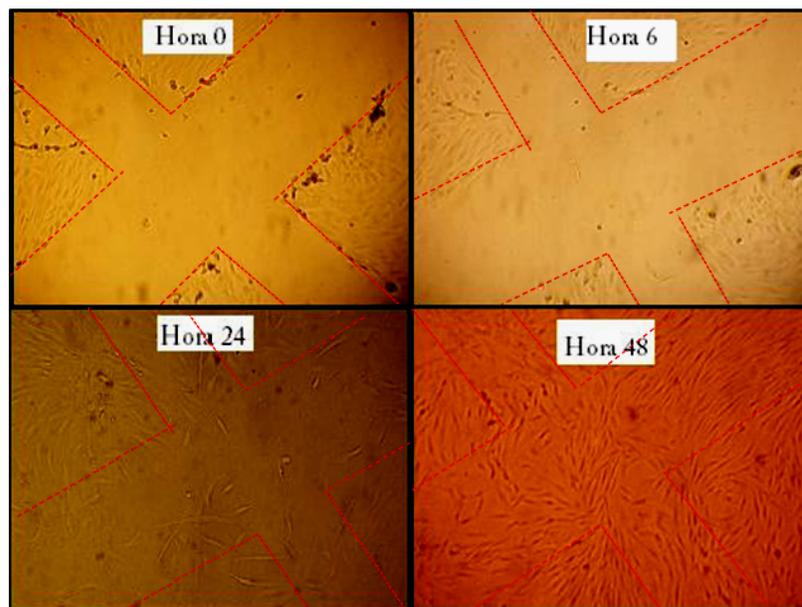


Figura 3.15. Imágenes de la migración de los fibroblastos a diferentes tiempos (4x)

3.2.5.2 Migración de queratinocitos subcultivados

En los ensayos con queratinocitos subcultivados, pasaje 4, se observó que la migración fue bastante lenta, o casi nula. En estos ensayos se seleccionaron 2 zonas que fueron evaluadas a distintos tiempos. En ambas zonas (1 y 2) (Figura 3.16 y 3.17.) la migración fue evidente sólo en algunas áreas, a partir del cuarto día, aunque fue un poco más notable que en la zona 1 de la placa.

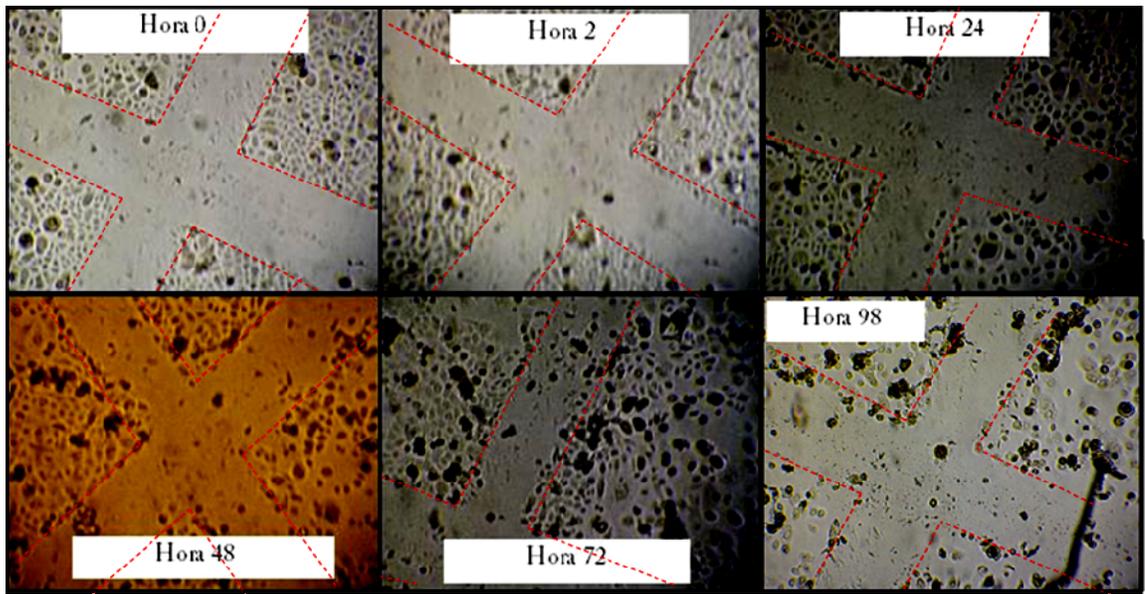


Figura 3.16. Migración de queratinocitos en la zona 1 de la placa. No se muestra migración hasta el cuarto día de haberle provocado la herida (4x).

En la figura 3.17 puede observarse además, que las células empezaron a estratificarse en ciertos sectores a partir del día uno. Estos no crecían hacia los sectores adyacentes, sino que, crecían estratificándose.

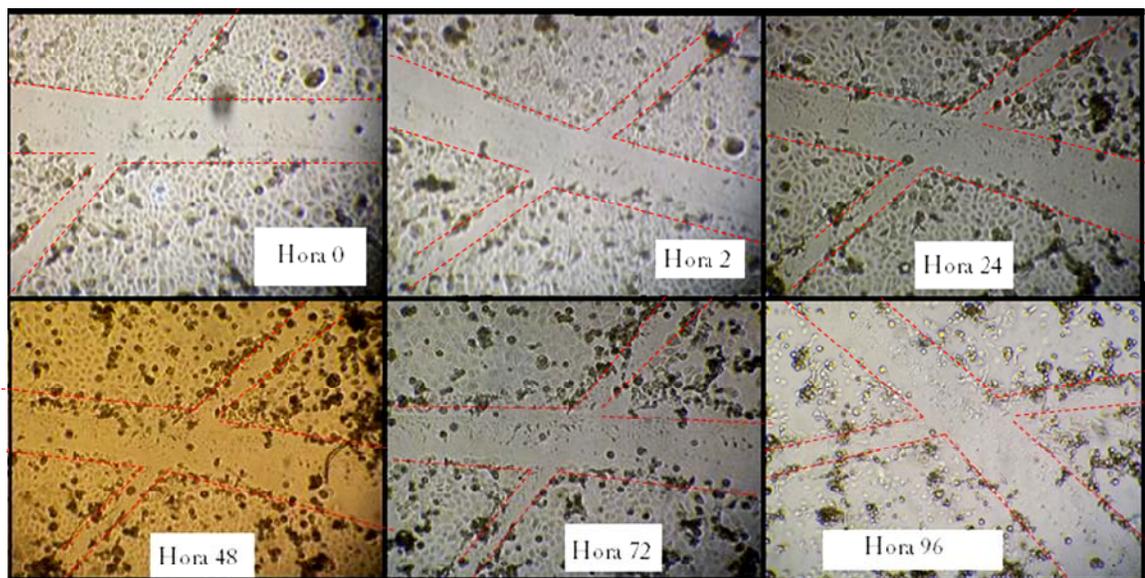


Figura 3.17. Migración de queratinocitos en la zona 2 de la placa. Se muestra una ligera migración al cuarto día de haberle provocado la herida 4x.

3.3 PRUEBAS CON MATRISTEM®

3.3.1 Análisis de la morfología celular

Fue analizada la morfología de fibroblastos sembrados sobre la cara dérmica de la membrana biológica MATRISTEM en dos condiciones: con la membrana flotando en el medio de cultivo y con la membrana tensada, tal como se explicó en Materiales y Métodos. A continuación se muestran las observaciones realizadas a las membranas con las células teñidas con un microscopio de fluorescencia a un aumento de 60X.

3.3.1.1 Membrana sin tensar con fibroblastos

La observación de los fibroblastos después de 15 días en cultivo muestra sus núcleos sólo sobre la cara dérmica de la membrana. Existe mayor concentración de los núcleos sobre los bordes extremos de las membranas, dispersos sin ninguna orientación determinada. Muchos de los núcleos se observan muy pequeños y picnóticos (Figura 3.19) La tinción con faloidina permitió observar las características del citoesqueleto, que en el caso de la membrana sin tensar aparecía dañado.

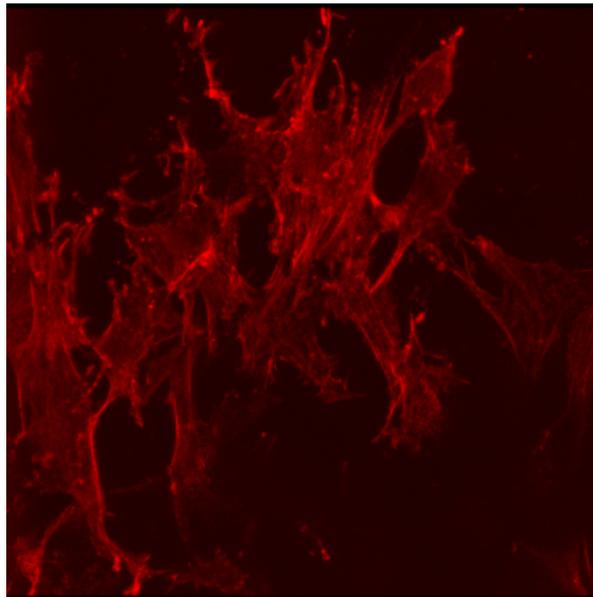


Figura 3.18. Citoesqueleto de los fibroblastos sembrados sobre la membrana Matristem® sin tensar (60X)

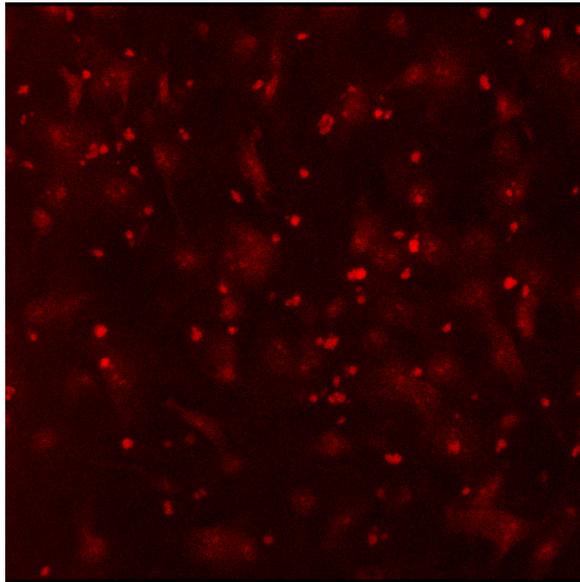


Figura 3.19. Núcleos de los fibroblastos sembrados sobre la membrana Matrigel® sin tensar (60X)

3.3.1.2 Membrana tensada con fibroblastos

La membrana tensada sembrada con fibroblastos, mostró características bastante diferentes respecto de la membrana sin tensar. Se pudo observar un excelente esqueleto fibrilar (Figura 3.20), y células dispuestas en varios estratos de espesor. Sus núcleos tenían características morfológicas normales. Se observaron zonas de la membrana donde los núcleos de las células están orientados en forma paralela (Figura 3.21).

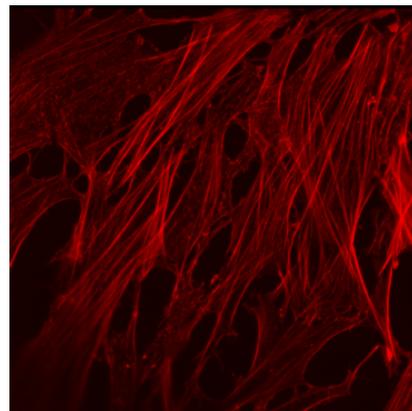
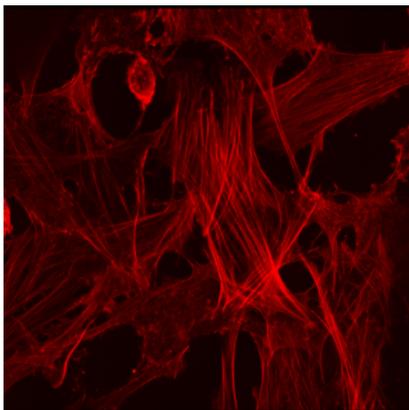


Figura 3.20. Citoesqueleto de los fibroblastos sembrados sobre la membrana Matrigel tensada (60X)

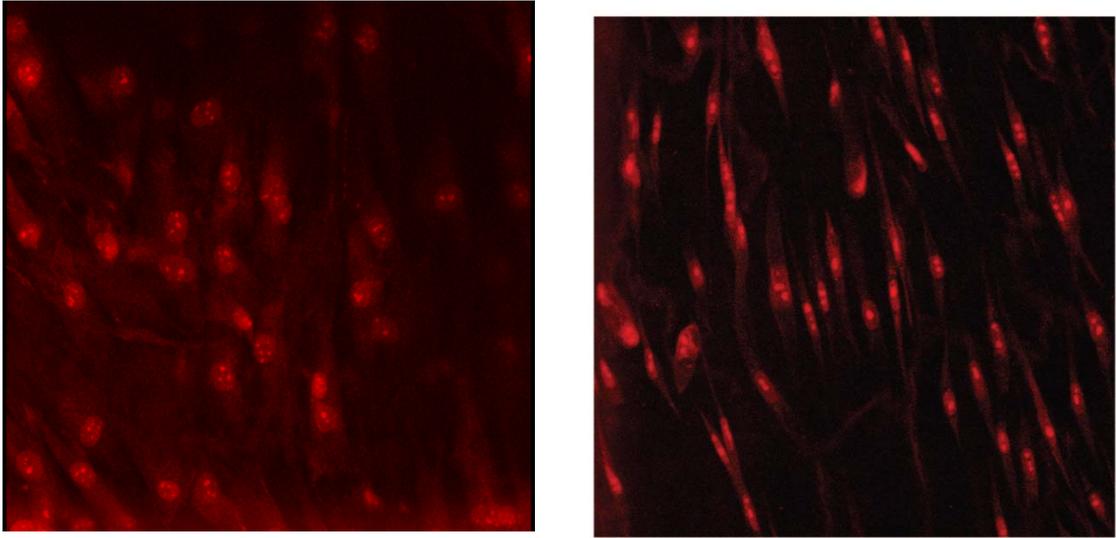


Figura 3.21. Núcleos de los fibroblastos sembrados sobre la membrana Matristem tensada (60X)

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRA AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO EN CULTIVO DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS

Las muestras en general, provenían de pacientes de 50 -70 años de edad. La edad de los pacientes de los que fue extraída la muestra, influye bastante, ya que entre mayor edad del paciente, la obtención de células viables y que sean capaces de proliferar disminuye considerablemente. Dentro de los factores que se ven afectados por la edad del paciente se encuentra: la diferenciación, ya que las células tienden a estar más diferenciadas, hay una mayor cantidad de tejido conectivo fibroso y MEC y hay una reducción de las células proliferantes indiferenciadas (Freshney, 2005).

Las muestras como eran tomadas principalmente de entre la zona abdominal y la zona pélvica siempre exhibían un poco de vello, y una cantidad de grasa considerable, el grosor de dermis variaba. El grosor de la dermis influye en la digestión con enzimas, ya que la disgregación es más efectiva si las biopsias son delgadas, ya que la enzima logra penetrar mejor en la membrana basal para separar los enlaces entre la epidermis de la dermis (Vaissiere *et al*, 2000). Es importante a la hora de separar ambas capas cutáneas, no raspar para separarlas, ya que en este proceso, los queratinocitos basales que se van a quedar adheridos a la lamina basal por lo tanto en la dermis.

Dos de las muestras (las que no fueron exitosas), se procesaron 17 horas después, mientras que el resto de las muestras fueron procesadas inmediatamente. Según Freshney, 2005, si existiera un retraso inevitable en el procesamiento de la muestra, ésta puede ser mantenida a 4°C hasta 72 horas, sin embargo, entre más rápido sea procesada ésta, mejor resultados se van a obtener.

Es bueno considerar la alta heterogeneidad de las muestras de acuerdo al estado fisiológico del paciente ya que dicha condición va a afectar directamente en la calidad de las células aisladas.

Como bien se refleja en los resultados, existen ciertas coincidencias en cuanto al aislamiento de queratinocitos y fibroblastos se refiere respectivamente.

A manera general, cuando las células son aisladas de un tejido ellas necesitan una fase de recuperación, en la cual automecanismos de reparación y adaptación actúan para reponerse del impacto de ser removidas del tejido mismo y adaptarse a las condiciones *in vitro* respectivamente, una vez superada esta fase, proliferan y llegan a la etapa de confluencia, donde hay una inhibición del crecimiento por contacto, en este punto se procede a levantar o a subcultivar.

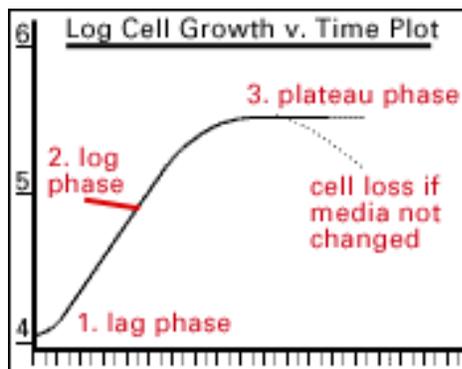


Figura 4.1. Gráfico de crecimiento logarítmico celular. Se muestran cada una de las etapas así como el tiempo y la proliferación Fuente: Department of biomedical engineering, Georgia Tech and Emory University

En cuanto al aislamiento de queratinocitos, siempre se obtienen cantidades importantes, sin embargo la viabilidad es muy baja.

La disgregación de la epidermis con tripsina, digiere algunos dominios de las proteínas de unión célula-célula como las CAM's y las cadherinas, permitiendo a las células disociarse una de otra. Sin embargo, la exposición a esta enzima puede causar cierta toxicidad a las células, por lo que puede responder con una disminución en la viabilidad (Freshney, 2005).

Por otro lado, cuando se utilizan métodos enzimáticos para el aislamiento de queratinocitos, éstos pueden perder capacidad de formar una colonia, ya que se ha visto

en diferentes investigaciones la inducción a una diferenciación terminal de las células por la enzima (Graghani *et al*, 2003).

Por su naturaleza, el inóculo inicial de queratinocitos principalmente y las células en general, tiene que ser bastante alto (4×10^4 cél/cm²), ya que las células primarias o recién aisladas, todavía no se encuentran bien adaptadas para sobrevivir en las condiciones *in vitro*, y por lo tanto, es necesario sembrar una gran cantidad de éstas para que logren adherirse y proliferar. Además, influye bastante el frasco o la placa de cultivo en la que se van a sembrar las células. Los queratinocitos responden mejor en placas de cultivo (Placas Petri) que en frascos de cultivo (T25 por ejemplo).

Como se menciona anteriormente, debido a la gran heterogeneidad entre los pacientes y las muestras, no es recomendable utilizar un inóculo bajo de siembra inicial, ya que aunque algunas células si logren adherirse efectivamente, otras procedentes de otras muestra pueden ser que no lo logren y por lo tanto al utilizar un inóculo límite, se disminuye el riesgo de a perder las células de la muestra.

Los queratinocitos *in vitro*, presentan altas demandas nutricionales y condiciones estrictas de cultivo (*feeder layers*, o bien medios bien ricos y suplementados con FC y proteínas). Se reporta también que solo el 3 o 4% de las células aisladas podrán proliferar *in vitro*, como bien se observó en los ensayos. Este porcentaje representa a la proporción de los queratinocitos en estado basal, que tienen capacidad proliferativa (Graghani *et al*, 2003).

Durante todo este experimento, se utilizó un medio de cultivo que no contiene suplementos de origen bovino -EpiLife[®]-, por lo cual dificulta más el mantenimiento del queratinocito, por la falta de factores de crecimiento importantes para la adhesión a la superficie y proliferación que se encuentra en el extracto pituitario bovino, componente de la mayoría de los medios para queratinocitos. Sin contar además que no se está utilizando la *feeder layer* que provee factores importantes como el KFC, entre otros.

Según Turksen, 2005; un medio conveniente es aquel que sea bajo en calcio y que contenga los factores de crecimiento que producen los fibroblastos, además de una placa

cubierta con Colágeno tipo IV para la adhesión. En el presente estudio el recubrimiento que se utilizó de Colágeno tipo I (humana recombinante), cuyo resultado es bastante variable.

Teórica y experimentalmente se pudo comprobar que, a los 7 días de cultivados se obtienen confluencias de 90%, utilizando un inóculo inicial de 4×10^4 cél/cm², y a los 18-21 días crecen diferenciándose y estratificándose (Brychta *et al*, 1994)

En el momento que las células epiteliales se convierten en cultivos confluentes, ellas pueden generar un gran número de desmosomas y si alguna organización morfológica tisular inicia, pueden formar uniones muy complejas. Es por esta razón que las células no se tienen que dejar hasta el 100% de confluencia para realizar el subcultivo, ya que la disgregación puede presentar dificultades. Estas uniones desmosómicas también son dependientes de calcio, por lo que la utilización del agente quelante como EDTA, es utilizada antes o durante de la tripsinización, facilita y colabora con el levantamiento (Freshney, 2005).

Otra de las razones por la cual no se recomienda dejar cualquier cultivo a un 100% de confluencia, es que se va a producir una alteración en la morfología típica de la célula y se va a inducir a la diferenciación y en el caso de los queratinocitos a la estratificación.

El problema de la diferenciación de los queratinocitos es que en cierto punto de ésta, las células pierden la capacidad proliferativa y migrativa, y empiezan a asumir su rol funcional (el de barrera de protección, y pierden su núcleo para formar el estrato córneo) (Haddow *et al*, 2006). En este estado, las células son más resistentes a la disgregación ya que poseen complejos más unidos y complejos (desmosomas, y hemidesmosomas), manteniéndolas juntas (Freshney, 2005) como se menciona anteriormente, por lo que el levantamiento con la Triple® o Tripsina-EDTA no es suficiente para despegarlas entre sí y entre el sustrato, por lo tanto se recurre al uso del rastrillo.

Una vez que las células sean subcultivadas por primera vez, el inóculo a sembrar en las nuevas placas puede ser inferior que al de la siembra inicial y así sucesivamente con

pasajes superiores, ya que éstas se van a ir adaptando poco a poco al cultivo *in vitro* y lograrán sobrevivir mejor en concentraciones inferiores. Tal y como lo muestran los resultados ya que se utilizaron inóculos para subcultivar de $4-2 \times 10^4$ cél/cm² y e inclusive inferiores.

Es importante mencionar que, los queratinocitos para que sean utilizados en los ensayos no tienen que superar el pasaje 4, ya que en este punto las células no se adhieren, migran y proliferan adecuadamente.

A pesar de que se estuvo utilizando un medio libre de aditivos bovinos, siempre se tuvo que suplementar al cultivo con 1% de SFB en el momento de inicial siembra para favorecer la adhesión y proliferación. Después del primer cambio de cultivo a las placas, no se les agregaba el SFB, sino hasta a ser subcultivadas. Este paso permitió la adhesión de mayor cantidad de células sobre el sustrato.

El suero fetal bovino, ha sido utilizado por la gran cantidad de mitógenos para la proliferación celular, sin embargo hay riesgo de transmisión viral o por priones. Para reducir el riesgo de enfermedades es preferible cultivar células con medio de cultivo completamente definida, sin ningún material xenogénico. Para tal caso, es preferible que los mitógenos presentes en el medio sean recombinantes (Ykada, 2006).

El cambio de medio de cultivo en algunos casos es contraproducente realizarlo muy seguido, ya que las células como bien se sabe, son capaces de producir factores de crecimiento que estimulan su propio crecimiento (factores autocrinos) (Robbins y Cotran, 2005; Guanter, 2005). Al cambiar de medio se eliminan muchos de estos factores (Freshney, 2005), lo cual puede provocar un lento crecimiento. Por otro lado, las células al estar metabólicamente activas, producen desechos, que pueden ser perjudiciales para ellas mismas. Es por lo cual, no es recomendable cambiarle muy seguido el medio de cultivo, para lograr concentrar los factores autocrinos y que las células reciban estas señales y puedan proliferar y desarrollarse efectivamente. Sin embargo, tampoco hay que

dejarles mucho tiempo el medio de cultivo ya que sus propios desechos metabólicos las pueden afectar.

Por otro lado, la contaminación con fibroblastos es un hecho bastante común y difícil de evitar, sin embargo con cada subcultivo la población de estos va a ir disminuyendo gracias a la especificidad del medio de cultivo de queratinocitos (Parkison y Yeudall, 2002; Freshney, 2005).

En cuanto al aislamiento de fibroblastos de las muestras, éste fue bastante bajo, en relación con el tamaño de la muestra, sin embargo la viabilidad era bastante alta. La dermis durante la incubación con colagenasa, en varias ocasiones no se veía bien disgregada, señal de una mala digestión enzimática.

En experimentos realizados, se ha observado que la colagenasa es una enzima bastante noble, ya que no genera toxicidad, y por esa razón la viabilidad es tan alta, pero por otro lado, no disgrega completamente el tejido, y por lo tanto, la cantidad aislada de estas células es bajo a pesar de la gran cantidad de tejido (Freshney, 2005).

El inóculo inicial puede ser inferior al de los queratinocitos, porque los fibroblastos son células más dóciles y más fáciles de cultivar, responden mejor ante las condiciones de cultivo *in vitro*, y el inóculo inicial puede variar desde 4×10^4 cél/cm² a 5×10^3 cél/cm².

A manera general se puede decir que el único requerimiento de los fibroblastos es la unión al sustrato, para que éstos se puedan extender y proliferar inclusive a bajas concentraciones (Freshney, 2005).

En algunos casos, después de la digestión de la dermis, a la hora de contabilizar las células, se podía observar una gran cantidad de glóbulos rojos u otro tipo celular que dificultaba el conteo.

La mala proliferación de estos fibroblastos puede ser debido a múltiples factores, inicialmente, como se mencionó antes, las muestras se dejaron almacenadas 17 horas a 4°C antes de ser procesadas, sin embargo este no es el motivo suficiente para justificar

este resultado. Por otro lado, la muestra *per se* pudo no haber sido muy buena, o bien se presentó una inadecuada digestión de la enzima.

Los fibroblastos crecen con bastante facilidad *in vitro*, no requieren de medios altamente complementados ni condiciones muy estrictas de cultivo (Graghini *et al*, 2003). En una semana los fibroblastos llegaron a 100% de confluencia.

El medio utilizado, el DMEM suplementado al 10% con SFB, L-glutamina y antibióticos, ambos al 1%, es excelente para el mantenimiento de estas células.

Una vez que el cultivo primario llegó a confluencia, este se pudo levantar sin dificultad alguna, mostrando siempre una alta viabilidad. Al igual que los queratinocitos no es recomendable dejar el cultivo de fibroblastos a un 100% de confluencia para levantarlos, sino que este procedimiento tiene que realizarse cuando el cultivo alcance un 75-80% de confluencia tal y como se muestra en la siguiente figura.

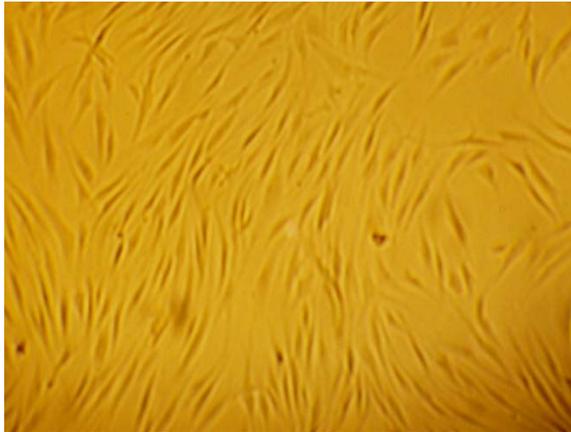


Figura 4.2. Confluencia ideal (70-80%) el subcultivo de fibroblastos. (4x)

Al subcultivar estas células, el inóculo para la resiembra puede ser mucho más bajo que el inicial, ya que al igual que los queratinocitos, estas células en este punto se habrán adaptado mejor a las condiciones *in vitro* y este nuevo subcultivo llegará otra vez a la confluencia sin dificultad (Freshney, 2005). Se observó que incluso inóculos de 1×10^3 cél/cm², eran capaces de proliferar en un tiempo relativamente corto, 10-15 días.

El cambio de medio de cultivo puede realizarse perfectamente de 1 a 2 veces por semana –de acuerdo a las posibilidades de cada laboratorio-, si hubiera pocos recursos, cambiarle el medio de cultivo una sola vez, será suficiente para estas células.

En algunas ocasiones, el cambio de medio se puede hacer parcial, (cambiarle únicamente la mitad del volumen respectivo), con el fin de dejarle, algunos factores de crecimiento autocrinos y bien el de renovarle nutrientes importantes como la L-glutamina y la glucosa, necesarios para mantener activo el metabolismo y por ende la proliferación celular.

4.2 PRUEBAS DE CULTIVO CELULAR IN VITRO

4.2.1 Comparación en la eficiencia de levantamiento de fibroblastos enzimática y mecánicamente

La Tripsina es una proteasa pancreática que se ancla a las proteínas de la superficie celular, por lo que rompe la unión célula-placa. El EDTA causa disociación química ya que se une al calcio de los hemidesmosomas y provoca una separación entre las células y el sustrato. Estos dos agentes, por lo tanto desunen las células de la superficie de la placa petri casi en su totalidad (Davis, 1994). Una mezcla de EDTA y tripsina provoca un levantamiento adecuado, sin embargo, la sobreexposición causa daño celular.

Durante el levantamiento mecánico, se formaron acúmulos de células que no se pudieron disgregar a pesar de que se resuspendió de manera insistente.

Esto se debe a que la tripsina es capaz de romper las uniones intercelulares, como se menciona anteriormente, cosa que con el rastrillo no, y a pesar de que si se despegan de la superficie del frasco de cultivo, las células no son capaces de separarse entre sí, dejando acúmulos, dificultando además en conteo celular y por lo tanto dando un erróneo número de células totales y cálculo de la viabilidad.

Se puede asegurar que se logró levantar ambas placas en su totalidad, ya que después de dichos procesos y después de revisar microscópicamente el despegue de las células, en ningún cultivo se observaba células adheridas en la superficie de la placa.

Después del subcultivo con ambos métodos, las dos placas de cultivo llegaron a confluencia, sin embargo, la que provenía del levantamiento mecánico, tardó un par de días más en llegar al mismo punto de confluencia que la tratada enzimáticamente.

Si bien es cierto que el método de rastrillo no es perjudicial, este debe ser utilizado según algunas circunstancias, y en el caso de los fibroblastos es preferible utilizar método el enzimático.

Para el caso de los queratinocitos, cuando se realiza el subcultivo, a parte del método enzimático, se usa posteriormente el rastrillo, como complemento, ya que estas células presentan una dificultad mayor para que sean levantados únicamente con la enzima.

4.2.2 Cálculo de la cantidad mínima a sembrar de fibroblastos y queratinocitos.

Como bien se observó en los resultados anteriores, las células primarias necesitan un inóculo muchísimo mayor para sembrar por primera vez, contrario a las células que cuentan ya con pasaje uno o superior.

En el caso de los fibroblastos, y como se ha enfatizado bastante, son células que nada más requieren un sustrato adecuado para la adhesión y esparción y son capaces de migrar y proliferar a bajas concentraciones (Freshney, 2005).

Según Freshney, 2005, una vez que estas células sean subcultivadas, el inóculo a resembrar puede ser muchísimo menor, ya que en este punto las células se han adaptado a las condiciones *in vitro* y por lo tanto son capaces de sobrevivir y proliferar, tal y como se observó experimentalmente que con un inóculo de 312 cél/cm², en 21 días lograron un crecimiento importante.

Igualmente, en cultivo *in vitro* juegan factores autocrinos, paracrinos (homocrinos) que van a influenciar en la proliferación, migración, diferenciación celular. Cuando los inóculos de siembra son muy bajos (cél/cm²), los factores mencionados van a estar muy

diluidos, por lo que no va a haber un estímulo suficiente para la proliferación de las células, también se muestra ahí la importancia de trabajar con un medio de cultivo bien suplementado (Freshney, 2005).

Estos factores van a actuar en sinergia con otros, por lo que hay que estimular la interacción célula-célula aumentando la concentración de siembra inicial en la cual exista este contacto óptimo (Freshney, 2005).

Por otro lado, las células epiteliales, específicamente los queratinocitos, requieren si o si interacción célula-célula para una adhesión, sobrevivencia y crecimiento adecuado en cultivo, por lo a estas células se les dificulta más crecer y proliferar a bajos inóculos de siembra (Freshney, 2005), y es por esa misma razón que tienden a crecer por colonias, parches o sectores en un crecimiento coordinado.

Experimentalmente se ha demostrado que la cantidad a sembrar ideal es de 4×10^4 cél/cm² para cultivos primarios, para subcultivos, esta cantidad puede ser ligeramente inferior.

Nótese que el experimento de los queratinocitos, la cantidad máxima de siembra que se utilizó fue de $1,3 \times 10^3$ cél/cm², ni siquiera logró proliferar, contrario a los fibroblastos que una tercera parte de ese inóculo logra una proliferación adecuada y normal. Estos demuestran las diferencias fisiológicas ambos tipos células y por lo tanto, las diferentes condiciones de cultivo que se deben de tomar para cada una respectivamente con el fin de lograr un adecuado desarrollo y mantenimiento *in vitro*.

4.2.3 Evaluación de un recubrimiento de Ácido Hialurónico a diferentes concentraciones, y Colágeno tipo I.

En diversos estudios, se ha encontrado que el AH asiste en la división celular y promueve la proliferación de fibroblastos *in vitro*. Una matriz de fibrina modificada con AH que fue investigada, mostró que induce la movilidad o migración celular (Weigel *et al*, 1986). Por otro lado un andamio de PGLA, modificado también con AH en su superficie,

incrementó enormemente la adhesión de los fibroblastos, comparado con el andamio de PLGA sin modificar (Chung y Park, 2007). Es una molécula muy estudiada por su gran beneficio a la proliferación y desarrollo celular.

En el ensayo de los fibroblastos sembrados sobre diferentes recubrimientos, la superficie de AH 100 µg/ml fue la que mejores resultados presento en cuanto a la proliferación celular, ya que logró que un inóculo de 78 cél/cm², llegaran a confluencia en tres semanas, mostraron una adhesión excelente, una distribución equidistante sobre la placa de cultivo y su morfología era bastante buena, sin embargo, no era la ideal, debido al estrés provocado por la baja concentración celular sembrada inicialmente, esta morfología era similar en los otros recubrimientos y en el control.

El recubrimiento de AH 200 µg/ml, aunque fue bueno, no mostró una proliferación adecuada, hubo una adhesión parcial y además las células no estaban distribuidas equidistantemente sobre la superficie de la placa de cultivo, sino que estaban concentradas en el centro de la misma. Es importante comentar que la concentración del AH en la epidermis y en la dermis es de 0,601 mg/ml y 0,508 mg/ml respectivamente (Ueno *et al*, 1992), pero no necesario utilizar concentraciones tan altas para realizar el recubrimiento.

La superficie ideal para la adhesión celular va a ser aquella heterogénea, con carácter iónico que le permite mantener una carga positiva a pH ácido, e interaccionar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas, favoreciendo la adhesión celular y por lo tanto la proliferación (Sanchez *et al*, 2007).

Originalmente, se descubrió que las células se atan, se esparcen en superficies que tienen una ligera carga negativa (Freshney, 2005), y el ácido hialurónico es una molécula cargada negativamente (Khademhosseini *et al*, 2004), lo cual es ideal para la adhesión celular.

Con respecto al colágeno tipo I, se sabe que es el mayor constituyente de la ECM de la piel, y se ha utilizado en muchos casos para construir andamios derivados de esta

proteína. Los primeros trabajos en comparar células sembradas sobre vidrio y colágeno los hizo Ehrmann y Grey (1956), posteriormente, Bell *et al* (1979) sembraron fibroblastos sobre un gel hecho a base de colágeno, sin embargo este modelo mostró una retracción fuerte del gel, de ese modo inhibiendo la síntesis de colágeno y activando la síntesis de colagenasa por los fibroblastos.

Experimentos posteriores mostraron que el cultivo de fibroblastos sobre gel de colágeno induce la apoptosis (Vaissiere *et al*, 2000). Por otro lado, esponjas hechas a base de colágeno puro tipo I, han mostrado una baja proliferación y una gran tasa de apoptosis (Beier *et al*, 2009).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos cuando se sembraron fibroblastos sobre el recubrimiento de colágeno tipo I. Inicialmente, las células son capaces de adherirse y proliferar ligeramente, sin embargo, 15 días después de la siembra estas se mostraban con apariencia apoptótica; contrarios a los fibroblastos de los otros recubrimiento y al control.

Se ha visto en otros estudios realizados que los fibroblastos en presencia de geles de colágeno provocan una contracción en el gel. Este cambio en el gel es acompañado por un cambio metabólico de las células. La contracción no es debida a la interacción célula-célula sino por tensiones mecánicas ejercidas por los fibroblastos en las fibrillas de colágeno, y esta tensión se esparce a las fibrillas más distantes. Esta contracción del gel, provoca una baja movilización de factores de crecimiento (autocrinos y homocrinos) limitando la proliferación y crecimiento de los fibroblastos (Chevallay y Herbage, 2000).

En el caso de las células epiteliales, para que estos se logren adherir a alguna superficie o sustrato, inicialmente ellos necesitan sintetizar moléculas de la MEC que interactúe con el sustrato para que estas se adhieran, o bien, recubrir la placa con moléculas de naturalmente intervienen con la adhesión naturalmente (Freshney, 2005).

La respuesta de los queratinocitos con pasaje 3 fue bastante buena, estos mostraron una excelente adhesión en los recubrimientos con la única diferencia en el tiempo en llegar a

confluencia. El primer cultivo en llegar a confluencia fue el de colágeno tipo I, el segundo en llegar a confluencia fue el de AH 200 $\mu\text{g/ml}$ y finalmente, el tercero en llegar a confluencia fue el de AH 100 $\mu\text{g/ml}$, la diferencia en el periodo de llegar a confluencia fue apenas de un par de días entre cada uno. La morfología de los queratinocitos en todos los recubrimientos era basal. Estos al ser parte del componente estructural de la matriz extracelular de la piel, contienen moléculas que promueven la adhesión de las células epiteliales a la membrana basal (Davis, 1994; Freshney, 2005). Al utilizar moléculas de esta naturaleza como recubrimiento para el cultivo celular, se incrementará notablemente y facilitará el cultivo de las células *in vitro* (Freshney, 2005).

Se determina entonces que los recubrimientos utilizados son ideales para la adhesión, proliferación y migración de los queratinocitos subcultivados, y cada uno se utilizara de acuerdo a la disponibilidad de los recursos con que se cuente.

4.2.4 Eficiencia de sembrado de fibroblastos

La adhesión celular se puede dividir en tres grados de adhesión: adhesión temprana, que significa que las células se adhieren pero no se esparcen, adhesión intermedia se caracteriza por la expansión celular pero con falta de fibras estresadas y la adhesión tardía que indica que las células se esparcen con fibras estresadas y adhesiones focales. La adhesión temprana es el primer paso para la adhesión a los sustitutos, unión que resulta en crecimiento celular, diferenciación viabilidad y esparción (Ykada, 2006).

Se observó un comportamiento interesante, en cuanto a la eficiencia de sembrado de los fibroblastos subcultivados se refiere, entre más grande sea el inóculo sembrado mayor va a ser adhesión y en menor tiempo, probablemente porque entre más células haya, más contacto y señalización habrá entre ellas que favorezcan la adhesión sobre a la superficie de la placa. Se observó además que a las 6 horas, los fibroblastos con el inóculo mayor se pegan casi en su totalidad, mientras que el inóculo menor no se adhirió totalmente inclusive a las 24 horas de la resiembra. Se puede afirmar entonces que a las seis horas de sembrados los fibroblastos subcultivados, logran el tercer grado de adhesión.

Aparentemente se observa una relación en la cual la adhesión celular al sustrato va a ser directamente proporcional al inóculo de siembra.

Sin embargo, no está de más mencionar que cuando se cuenta una pequeña cantidad de células en la cámara de Neubauer, aumenta el error, cuestión que pudo haber influido en los resultados.

Según Freshney, 2005, en cuanto más rápido se adhieran las células en cultivo, es más probable que éstas permanezcan viables y puedan proliferar, he ahí la importancia de una adhesión adecuada de las células y por lo tanto es necesario optimizar los soportes para que las células se puedan adherir con el fin de obtener un cultivo adecuado.

4.2.5 Migración celular de fibroblastos y queratinocitos

El movimiento o migración celular está influenciado por factores solubles de crecimiento y la matriz extracelular, sin embargo, en ausencia de ésta, el movimiento se ve influenciado solo por mencionados factores, que le dictaran a la célula cuando moverse y cuando detenerse. Casi siempre, la movilidad va dirigida hacia un mayor gradiente de dichos factores, lo que se conoce como quimiotaxis (Li *et al*, 2004).

Los fibroblastos son mucho más móviles a bajas densidades (no es necesario tener contacto directo célula-célula) y los menos móviles son las células epiteliales, inclusive en altas densidades en monocapa (Freshney, 2005).

Como bien demuestra los resultados, se observa que, para el caso de los queratinocitos, en los sectores menos confluentes la migración es menor que en los sectores más confluentes, ya que hay mayor contacto célula-célula, que como se mencionó anteriormente es necesario para la esparción (Freshney, 2005).

Los fibroblastos se ven influenciados directa o indirectamente por los siguientes FC para que migren: factor de crecimiento de fibroblastos básico y ácido, TFC, VEFC y PDFC-BB (Li *et al*, 2004). Ellos migran como células individuales con una polaridad de movimiento reconocible. Unas fibras generadas por polimerización de actina se extienden en dirección del viaje y se adhiere al sustrato, mientras que la membrana plasmática al

lado contrario de la célula se retrae, causando que la célula vaya en un movimiento direccional. Si la célula se encuentra con otra célula, la polaridad se revierte, y el movimiento también se dirige en la dirección opuesta. La migración continúa en patrones determinados, hasta que las células alcancen la confluencia donde la migración cesa. El cese de la migración de las células, el cual es acompañado por una reducción de arrugamiento de la membrana plasmática es lo que se conoce como inhibición por contacto y dirige eventualmente a una disminución del ciclo celular (Freshney, 2005).

Los queratinocitos por otro lado, si no están diferenciados, no tienden a mostrar una migración al azar, y cuando se siembran en bajas densidades van a migrar manteniendo contacto unas con otras y la migración cesa, cuando se llega al punto de inhibición por contacto. El patrón de crecimiento de ellas es diferente, si necesitan un contacto más cercano con otras células y crecen en parches o sectores, hasta llegar a confluencia. Esto se evidencia claramente en la formación de las colonias de los queratinocitos (Freshney, 2005). En la herida o estría provocada, se muestran como puentes en los cuales las células van migrando poco a poco, además, no abarcan la zona de la herida como lo hacen los queratinocitos, sino que la línea de la herida va disminuyendo en grosor. A continuación se muestran los puentes formados por los queratinocitos.

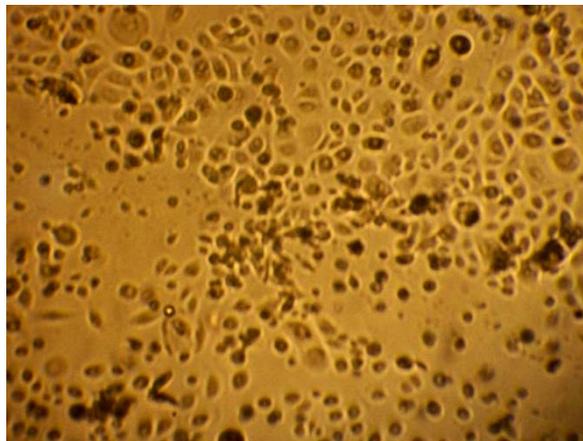


Figura 4.3. Puente formado a los 3 días por los queratinocitos sobre el sitio de la herida, 4x.

4.3 PRUEBAS CON MATRISTEM®

4.3.1 Análisis de la morfología celular por microscopia de fluorescencia

Las células inoculadas en la membrana o matriz sin tensar, presentaban señas de daño y apoptosis, sin embargo no se puede determinar dicha condición sin algún método adicional. Claramente se observa que las células cuentan con una organización citoesquelética además de que no están dispuestas alineadamente.

Como bien se observó, la tensión provocada en la membrana a través de las suturas realizadas provocó un ordenamiento y alineamiento de los fibroblastos de una forma más organizada y simulando a la vez a su disposición *in vivo*. Esta matriz tridimensional permite que las células logren penetrarse en su interior ya que según las imágenes las células se muestran en varios planos. Lo anterior sugiere que hay un aumento en el área de siembra, y además las células en cultivo organotípico van a tener una mayor disponibilidad para dividirse ya que poco a poco las células van a ir migrando hacia el interior de la membrana.

A su vez, cuando las células abarquen toda el área de siembra, éstas van a ir sintetizando la MEC, relleno los espacios intercelulares. Por otro lado aparte de rellenar, las células van a ir sintetizando factores que estimulen a las células adyacentes a proliferar causando una regeneración del tejido.

Según lo anterior se puede afirmar que MatriStem® al estar en condiciones de tensión, va a dar el soporte estructural para la adhesión, migración y proliferación celular, adecuados para que las células puedan llevar a cabo su función fisiológica normal y de esta manera sucede una neosíntesis del tejido a sustituir, contribuyendo así a la regeneración del tejido dañado y/o perdido.

5. CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado, pueden deducirse varios puntos claves que deberían ser tomados en cuenta para lograr los objetivos buscados:

1- Es fundamental que el procesamiento de la muestra sea realizado inmediatamente después de la extracción, para un mejor resultado en la viabilidad celular inicial, y el futuro cultivo.

2- Los procedimientos de aislamiento y siembra inicial de los fibroblastos y queratinocitos son clave para un buen desarrollo *in vitro*, por lo cual se debe de ser muy específico al brindarle las mejores condiciones respectivas, con el fin de lograr una buena adaptación de las células al cultivo *in vitro*.

3- Los queratinocitos, por su naturaleza, requieren de condiciones nutricionales de cultivo estrictas ya que son células más susceptibles a condiciones *in vitro*, requieren principalmente tener un contacto célula-célula (un inóculo de siembra alto), un sustrato adecuado, así como diversos factores de crecimiento para una buena adhesión, proliferación, migración y desarrollo *in vitro*.

4- Si bien los fibroblastos, como los queratinocitos, requieren un período de adaptación a las condiciones de cultivo (fase lag), una vez superado este período, su expansión y mantenimiento *in vitro* se hace de una manera fácil, sin grandes requerimientos y es posible lograr una buena amplificación de los mismos.

5- Las células que deben ser subcultivadas para su amplificación pueden ser despegadas del sustrato por métodos enzimáticos o con ayuda de un rastrillo estéril. Es recomendable que el uso del rastrillo, tanto para fibroblastos como queratinocitos, sea como complemento del método enzimático, debido a que este método deja acúmulos celulares más que células aisladas, lo cual puede producir errores importantes en el recuento celular. El rastrillado debe ser usado como único método, sin enzimas, cuando la

naturaleza del experimento así lo exija, como ser en determinación de proteínas de un cultivo celular.

6- Dada la dependencia de anclaje de las células usadas en este trabajo, muchas veces es necesario usar ciertas proteínas como cobertura de las superficies de cultivo, con el objeto de mejorar la adhesión y proliferación celular. En referencia a los distintos materiales utilizados, según los resultados obtenidos, el recubrimiento con AH 100 $\mu\text{g/ml}$, es ideal para la adhesión, migración y proliferación para los fibroblastos sembrados en inóculos pequeños. Debe tenerse en cuenta que los resultados dependerán además del número de veces que las células hayan sido subcultivadas. El crecimiento será más limitado cuanto mayor sea este número.

7- En cuanto a los queratinocitos, el recubrimiento de colágeno tipo I, el de AH 200 $\mu\text{g/ml}$ y el de AH 100 $\mu\text{g/ml}$, funcionan muy bien en cuanto al desarrollo y adhesión de estas células. La diferencia radica en el tiempo en llegar a confluencia, siendo el más rápido el primero y así sucesivamente.

8- Son necesarias al menos seis horas para que los fibroblastos logren estar adheridos a un sustrato sólido, después de este tiempo, las células que no se adhieran, probablemente no sobrevivirán.

9- Los fibroblastos migran más rápido en condiciones *in vitro* que los queratinocitos ambos en ausencia de SFB.

10- Las láminas de MatriStem® tensadas provocan un alineamiento tridimensional en las células similar al observado en el tejido cutáneo *in vivo*. Este andamio logra proveer las condiciones necesarias para la viabilidad de las células, por lo tanto se determina como una matriz apta para probar en ensayos clínicos con pacientes y con gran potencial para la regeneración de heridas.

6. RECOMENDACIONES

Es ideal tomar la muestra con dermatomo dado que de este modo se obtiene una muestra de espesor fijo en toda su extensión, lo cual facilita la penetración y acción de la enzima y por lo tanto la separación dermis-epidermis con lo que se inicia el trabajo de cultivo- Por otro lado, la toma de muestra con electrobisturí o cauterizador produce la muerte de las células a lo largo de todo el borde de la muestra, con la consiguiente pérdida de material.

En el momento de la separación de las capas de la piel es aconsejable no raspar para separarlas, dado que esto puede implicar la pérdida de los queratinocitos basales, que son los verdaderamente proliferativos.

No se pueden generalizar los resultados obtenidos a partir de las distintas muestras, ya que cada una es diferente debido a la variabilidad individual entre los pacientes. Se debe establecer un rango de trabajo, fijando cantidades mínimas estandarizadas en cuanto a inóculo, nutrientes, entre otros, teniendo en consideración esa variabilidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

ACELL. 2009. The Science of Tissue Engineering. Disponible en: http://www.acell.com/research_field.php. Consultado el: 27/01/09

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. 1994. Molecular Biology of the Cell, Tercera Ed.; New York: Garland Publishing. p 488-1168.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; Y WALTER, P. 2002. Molecular Biology of the Cell. Some Landmarks in the Development of Tissue and Cell Culture. Cuarta Edición. New York: Garland Publishing, p 548.

ARNAUD, F. 2005. Desarrollo de andamios porosos biodegradables 3D para la ingeniería de tejidos. Tesis de Maestría. Universitat Politècnica de Catalunya. Disponible en: <http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/3236/1/45068-1.pdf>. Consultado el: 25-06-09

ARVELO, F. 2007. Ingeniería de tejidos y producción de piel humana *in vitro*. Scielo 48 (3) 367-375 pp. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332007000300011&lng=es&nrm=iso. Consultado el: Miércoles 5 de mayo, 2009.

BADYLAK SF, VORP DA, SPIEVACK AR, SIMMONS-BYRD A, HANKE J, FREYTES DO, THAPA A, GILBERT TW, NIEPONICE A. 2005. Esophageal reconstruction with ECM and muscle tissue in a dog model. Journal of Surgical Research. El Sevier, Nueva York. 128 (1): 87-93.

BADYLAK SF, KOCHUPURA PV, COHEN IS, DORONIN SV, SALTMAN AE, GILBERT TW, KELLY DJ, IGNOTZ RA, GAUDETTE GR. 2006. The use of extracellular matrix as an inductive scaffold for the partial replacement of functional myocardium. Cell Transplant. Cognizant Communication Corporation 15 (1): 29-33

BADYLAK SF, GILBERT, TW. 2008. Immune response to biologic scaffold materials. Semin Immunol. 20 (2): 109-112

BEIER, J.; KLUMPP, D.; RUDISILE, M.; DERSCH, R.; WENDORFF, J.; BLEIZIFFER, O.; ARKUDAS, A.; POLYKANDRIOTIS, E.; HORCH, R. Y KNESER, U. 2009. Collagen matrices from sponge to nano: new perspectives for tissue engineering of skeletal muscle. BMC Biotechnology. 9 (34)1-3

BELL, E., IVARSSON, B., AND MERRIL, C. 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*, Cell Biology, 76 p.

BELLO, Y.; FALLABELLA, A.; EAGLSTEIN, W. 2001. Tissue Engineered Skin. American Journal Clinic Dermatology. Miami, Florida. 2 (5): 306-312

- BOYCE, S. 2004. Fabrication, quality assurance, and assessment of cultured skin substitutes for treatment of skin wounds. *Biochemical Engineering Journal*. Hospitals for Children, Cincinnati, OH, EEUU. 20: 107-108
- BRIGGAMAN, A.; ABELE, C.; HARRIS, A. Y WHEELER, E. 1967. Preparation and characterization of viable suspension of postembryonic human epidermal cells. *Journal of investigative dermatology*. Nature Publishing Group. 48 (2): 159-168
- BROWN B, LINDBERG K, REING J, STOLZ DB, BADYLAK SF. 2006. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng. Mary Ann Liebert*. Nueva York, EEUU. 12 (3): 519- 522
- BRYCHTA, R.; ADLER, J.; RIHOVD, R.; SUCHDNEK, V. Y KOMDRKOVD, J. 1994. Cultured skin cells for treatment of burns. *Ann. Medit. Burns Club*. 71 (4). 95-97.
- CHAUDHURI, J. Y AL-RUBEAI, M. 2005. *Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation*. Holanda, Springer. p. 1
- CHAUDRY, A. 2004. Cell Culture. The science cretive quarterly. Is. 3. Disponible en: <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>. Consultado el: Miércoles 6 de mayo del 2009.
- CHEVALLAY, B. Y HERBAGE, D. 2000. Cellular Engineering: Tissue Engineering and Biomaterials Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy *Med. Biol. Eng. Comput.* (38): 211-218
- CHUN, H. Y PARK, T. 2007. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Dvanced Drugs Delivery Reviews* 59: 249 – 262.
- CLARK, R. 1993. Mechanisms of Cutaneous Wound Repair. In *Dermatology in General Medicine*. Editor: Fitzpatrick, Thomas B. Cuarta Ed.; New York; McGraw-Hill. p 473-486
- CURTIS, H.; Y BARNES, S. 2001. *Biología*. Editoras: Scherk, A. y Flores, G. Sexta Ed.; Montevideo, Uruguay; Médica Panamericana. p 1045
- DAVIS J.M. 1994. *Basic Cell Culture. A Practical Approach*. Oxford University Press. p 210
- EHRMANN, E, Y GREY, G. 1956. The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen, *J. Natl. Cancer hist.*; 16 1375-1403.
- ESPINOZA, A. Y BARAHONA, M. 2003. Comportamiento de las quemaduras en Costa Rica 2000 – 2003. Ministerio de Salud. Disponible en: <http://desastres.cies.edu.ni/digitaliza/tesis/t275/seccionc2.pdf>. Consultado el: 17-06-09.

FREED, L.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; BIRON, R.; EAGLES, D.; LESNOY, D.; BARLOW, S. Y LANGER, R. 1994. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Nature Biotechnol. Reino Unido.* 12. 689-690.

FRESHNEY, I. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.* Quinta Ed. John Wiley & Sons. 217-236 p

FREYTES DO, STONER RM, BADYLAK SF. 2008. Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. *Journal Biomedical Material Research Wiley Co EEUU.* 84 (2): 408-414.

GALLICO G, O'CONNOR N, COMPTON C, KEHINDE O, GREEN H. 1984. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *New. England. Journal of. Medicine. Massachusetts Medical Society, Massachusetts, EEUU.* 311 (7): 448-451

GALLICO G, O'CONNOR N, COMTON C, KEHINDE O, GREEN H. 1989. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *Plastic and. Reconstructive. Surgery. American Society of Plastic Surgeons. EEUU. Illinois* 84 (1): 1-6

GARTNER LP, HIATT JL. 2002. *Texto Atlas de Histología.* 2da Ed. México D.F., México: Mc Graw Hill. Interamericana. p. 311-327

GASPAR, K.; ERDEI, I.; PETER, Z.; DEZSO, B.; HUNYADI, J.; JUHASZ, I. 2006. Role of acellular dermal matrix allograft in minimal invasive coverage of deep burn wound with bone exposed — case report and histological evaluation. *International Wound Journal.* 3. 51-54.

GENESER, F. 2000. *Histología.* Tercera Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires p.130-224

GILBERT T, NIEPONICE A, SPIEVACK A, HOLCOMB C, GILBERT S, BADYLAK S. 2008. Repair of the thoracic wall with an extracellular matrix scaffold in a canine model. *Journal of Surgery Research Association for Academic Surgery.* 147 (1): 61-65

GRAGNANI, A.; MORGAN, J.; FERREIRA, M. 2003. Experimental model of cultured keratinocytes. *Acta Cir Bras:* 18: 76-79

GREEN H, KEHINDE O, THOMAS J. 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceeding of the. National Academy of Sciences of. U.S.A.* 76 (11): 5665-5668

GRIFFITH, G. Y NAUGHTON, G .2002. Tissue engineering Current challenges and expanding opportunities. *Science. Nueva York.* 295 (5557):1009-1011

GUANTER, R. 2005. Estudio de un factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFC) y del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFFC) en la patología benigna y maligna de la próstata. Universitat de Valencia. Servei de Publicacions. Valencia, España. p. 32-34

HADDOW, D.; MACNEIL, S.; SHORT, R. 2006. A Cell Therapy for Chronic Wounds Based Upon a Plasma Polymer Delivery Surface. *Plasma Process. Polym.* (3): p 419-430.

HOU, Q.; GRIJPMMA, W. Y FEIJEN, J. 2003. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials*. Elsevier. Amsterdam, Netherlands. 24 (11): 1937-1943.

HUTMACHER, D. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21(24). 2529-2535.

IKADA, Y. 2006. *Tissue Engineering: fundamentals and applications*. Volume 8 Elsevier. Amsterdam, Netherlands. p. 4-49

INFANTE, R.; CEBRIÁN A. Y VARA, A. SF. Los polímeros en la medicina. Universidad de Valladolid, España. sp. Disponible en: <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/principal.htm>. Consultado el: 7-07-09.

INGBER, D. 1997. Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual Review of Physiology*. California, EEUU. 59: 575-583.

KARASEK, A Y CHARLTON, E. 1971 Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *Journal of investigative dermatology*. Society for Investigative Dermatology. Ohio, EEUU. 56 (3): 205-210

KHADEMHOSEINI, A.; SUH, Y.; YANG, J.; ENG, G.; YEH, J.; LEVENBERG, S.; LANGER, R. 2004. Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-l-lysine for patterned cell co-cultures. *Biomaterials* 25: 1-5.

KOCHUPURA, P.; AZELOGLU, E.; KELLY, D.; DORONIN, S.; BADYLAK, S.; KRUKENKAMP, I.; COHEN, I.; GAUDETTE, G. 2005. Tissue-Engineered Myocardial Patch Derived From Extracellular Matrix Provides Regional Mechanical Function. *Circulation*. American Heart Association. Texas, EEUU. 112 (1): 144-145

LANGER, R. Y VACANTI, J. 1993. *Tissue Engineering*. Science. Nueva York, EEUU. 260 (5110). 920-924.

LAURENT, C.; FRASER, R. 1986. The properties and turnover of hyaluronan. In *Function of the Proteoglycans*; Ciba Foundation Symposium 124; Wiley: Chichester. 9-29.

- LI, W.; FAN, J.; CHEN, M.; GUAN, S.; SAWCER, D.; BOKOCH, G. Y WOODLEY D. 2004. Mechanism of Human Dermal Fibroblast Migration Driven by Type I Collagen and Platelet-derived Growth Factor-BB. *Molecular Biology of the Cell*. 15: 294-296.
- LI, Y. Y YANG, S. 2001. Effects of three-dimensional scaffolds on cell organization and tissue development. *Biotechnol. Bioprocess Engineering*. 6 (2): 311-320.
- LORENTI, A.; ARGIBAY, P. Y GADANO, A. 2005. Combinando biomateriales y células: El hígado Bioartificial en: *Medicina Regenerativa y Stem Cells*. Copilador: Argibay, P. Buenos Aires: Universidad de Quilmes. p. 178
- MACKNEIL, S. 2007. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*. 445 (22): 874-879.
- MACRI, L. Y CLARK, R. 2009. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds: Selecting the Proper Time and Space for Growth Factors, Cells and the Extracellular Matrix. *Skin Pharmacol Physiol* (22): 83-93
- MINUTH, W.; STREHL, R. Y SCHUMACHER, K. 2005. Tissue engineering: Essential for Daily Laboratory Work. Cap 4. Tissue Engineering. Traducido por: Fitz, R.; Heath, N. y Herbs, M. Regensburg, Germany. Wiley. p. 113-115
- MAST, A. 1992. The Skin. In *Wound Healing: Biochemical & Clinical Aspects*. Capítulo 22. Filadelfia, Saunders. 344-355 p.
- MORGAN, J. 2006. Enhancing Tissue-Engineered. Skin by Genetic Modification. *Tissue engineering*. 9(6). 305- 307
- NAVSARIA H, SEXTON C, BOUVARD V, LEIGH I.1994. Growth of keratinocytes with a 3T3 feeder layer: basic techniques. *Keratinocyte Methods*. Cambridge University Press. 2-12 p.
- PARKISON Y YEUDALL. 2002. Culture of epithelial cells. Capítulo 3: La epidermis. Segunda Edición. Ed Wiley-Liss. p 65-94
- PERRONI C, RODRÍGUEZ A, ROSSET D, BARBA L, VESPESIANI R, GUZZETTI R, LORENTI A, CAVALIERI H, BUSTOS N, BENAİM F.1996. Uso de tratamiento combinado de epidermis cultivada con homodermis irradiada como base, en un paciente quemado crítico. *Revista Argentina de Quemaduras*: 11(1-4): 24-28
- PERRONI C, RODRÍGUEZ A, ROSSET D, BARBA L, VESPESIANI R, GUZZETTI R, LORENTI A, CAVALIERI H, BUSTOS N, BENAİM F. 1996. Uso de tratamiento combinado de epidermis cultivada con homodermis irradiada como base, en un paciente quemado crítico. *Revista Argentina de Quemaduras* 1996; 11(1-4): 24-28.

PITTELKOW, R. Y SHIPLEY, G. 1989. Serum free culture of normal human melanocytes: growth kinetics and growth factor requirements. *Journal Cell Physiol.* 140: 565–576

RAMIREZ, C. 2005. *Medicina Regenerativa y Stem Cells: Cap. 6. Matrices y Biomateriales de en la Ingeniería de Tejidos.* Copilador Argibay, P. Buenos Aires, Universidad Nacional de Quilmes. p. 141-161

RATANAVARAPORN, J.; DAMRONGAKKUL, S.; SANCHAVANAKIT, N.; BANAPRASERTT, T.; Y KANOKPANONT, S. 2006. Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture. *Journal of Metals, Materials and Minerals.* 16 (1): 31-36.

REIGOSA, M. Y RODRIGUEZ, A. 1999. Historia del cultivo celular. *Ciencia Hoy.* 9 (52). Disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy52/cultivos.htm>. Consultado el: 24-05-09.

RHEINWALD, J. Y GREEN, H. 1975. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a clone cell line derived from teratoma. *The Cell.* 6. 317-330.

RHEINWALD, J.; Y GREEN, H. 1977. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature.* 265: 421-424

ROBIN-SEURIG, A. 1999. Development of dermal acellular matrix and acellular matrixhyaluronan constructs for chromc skin wound applications. Tesis para el grado de Master of Applied Science. Universidad de Toronto. 1-173.

ROBBINS Y COTRAN. 2005. *Patología Estructural y Funcional.* Capítulo 3: Renovación celular y reparación celular. 7 Edición: Saunders. 97- 110 p

ROBINSON K.; LI J.; MATHISON M.; REDKAR A.; CUI J.; CHRONOS N.; MATHENY R. y BADYLAK S.; 2005. Extracellular matrix scaffold for cardiac repair. *Circulation.* 112(9): 135-141.

ROJAS, M., ALVARENGA, S. Y GUERRERO, M. 2005. Implementación de un sistema de producción de piel humana in vitro para mejorar la recuperación de pacientes con afecciones epidérmicas en Costa Rica. ITCR. Cartago, Costa Rica.

SÁNCHEZ, A.; GUERRERO, M.; ROJAS, M.; MADRIGAL, S. 2007. Hidrogeles de quitosano obtenidos a partir de camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) para el crecimiento de fibroblastos humanos como sustituto biológico en Ingeniería de Tejidos. PoliUNA-ITCR. Costa Rica.

SIBAJA, M., MADRIGAL, S.; VEGA, J.; SANCHEZ, A.; ZAMORA, V.; ALVARENGA, S.; ROJAS, M. 2007. Diseño de materiales compuestos a partir de colágeno y quitosano de desechos de camarón como biomateriales potenciales de aplicación en Ingeniería de Tejidos. Proyecto interinstitucional UNA, TEC, CCSS. Costa Rica.

- SILBERT, E. 1983. Proteoglycans and Glycosaminoglycans. In *Biochemistry and Physiology of the Skin*; New York, Goldsmith, Lowe1 A Ed. 448-461 p.
- SIPE, D. 2002. Tissue engineering and reparative medicine. *Annual New York Academy of Science*. 9(61): 1-5.
- TRYGGVASON, K. 1995. Molecular properties and diseases of collagens. *Kidney Int.* 47(9): 24-28.
- TURKSEN, K. 2005. *Methods in Molecular Biology: Epidermal Cells*. Humana Press. Clifton, Nueva Jersey. p 21-23.
- UENO, N.; CHAKRABARTI, B.; GARG, H. 1992. Hyaluronic Acid of Human Skin and Post-Burn Scar: Heterogeneity in Primary Structure and Molecular Weight. *Biochem, Int.* 26(5): 787-795
- VACANTI, J.; CAO, Y.; PAIGE, K.; UPTON, J. Y VACANTI, C. 1997. Transplantation of chondrocytes utilizing a polimer cell construct to produce tissue-engineered cartilage in shape of human ear. *Plast Reconstruct Surg.* Lippincott Williams & Wilkins, Hagerstown, EEUU. 100 (2): 297-300
- VAISSIERE, C.; CHEVALLAY, B; HERBAGE, C; DAMOUR, G. 2000. Comparative analysis of different collagen-based biomaterials as scaffolds for long-term culture of human fibroblasts. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 38: 205-210.
- VOET, D. Y VOET, J. 1990. *Biochemistry*. New York, Wiley 258-259 p.
- WEIGEL, P.; FULLER, G.; LEBOEUF; ROBERT D. 1986. A Model for the Role of Hyaluronic Acid and Fibrin in the early events during the inflammatory response and wound healing. *Journal of Theor- Biol.* 54 (119): 219-230.
- WOOD, J.; SIMMONS-BYRD, A.; SPIEVACK, A., BADYLAK, S. 2005 Use of a particulate extracellular matrix bioscaffold for treatment of acquired urinary incontinence in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 226 (7): 1095-1097.
- YUSPA, S.; MORGAN, D.; WALKER, R.; BATES, R. 1970. The growth of fetal mouse skin in cell culture and transplantation to F1 mice. *Journal Investigation Dermatology* 20 (55): 379-385

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Diversos tipos de coberturas epidérmicas, dérmicas o equivalentes cutáneos que han sido utilizados en la regeneración de piel.

Cultured Epidermal Autografts

Epicel™, 1988 basado en los principios y metodologías de Rheinwald y Green. Entre sus desventajas están que se ocupan 3 semanas para cultivar las células, la ausencia de un estrato dermal, se usa en combinaciones con dermis cadavérica. Tuvo un éxito parcial pero no fue el sustituto ideal de piel. Comercialmente disponible con alto costo por cm².

Cultured Epidermal Allograft

Se obtiene de prepucio de neonato, promueve la granulación y estimula la epitelización de las heridas. No está comercialmente disponible en EEUU. La ventaja es la disponibilidad inmediata del aloinjerto, la desventaja es que no sobrevive permanentemente en la herida y hay posibilidad de transmisión de enfermedades, se usa aparte para epidermolisis bullosa, se pueden criopreservar.

Nonliving Allogeneic Acellular Dermal Matrix

Alloderm® es una matriz acelular, procesada a partir de piel cadavérica, con membrana basal intacta. Se usa en quemaduras desde 1992. Puede ser criopreservada o liofilizada. Entre sus ventajas están que, dado que es acelular, es inmunológicamente inerte, provee una estructura dermal natural, permite el uso en conjunto con autoinjertos delgados. La desventaja es que debe ser removido, porque es cobertura sólo transitoria, aunque existen algunos ejemplos de uso como cobertura definitiva (Cuono, 1987; Perroni *et al* 1996).

Nonliving ECM of Collagen and Chondroitin-6-Sulfate

Integra®, desarrollado por Burke y Yannas, es una dermis artificial con una lámina de silicona como sustituto epidérmico, que es después removida. De las ventajas es que permite el desarrollo de una neodermis. La desventaja es que es susceptible a infecciones y no tiene una epidermis real.

Cultured Skin Substitute

Colágeno más GAG y fibroblastos autólogos como dermis fueron estudiados como sustrato para queratinocitos autólogos epidérmicos humanos. Se reportó la formación de proteínas de la membrana basal (laminina y colágeno tipo IV), sin embargo debido a proteasas del ambiente no tuvo un éxito significativo como reemplazo de piel. La desventaja es que se ocupan de 3-4 semanas para la producción del mismo. Además Boyce y colaboradores en 1993, agregaron melanocitos y lograron la restauración de la pigmentación de la piel en el sitio de la herida y la inhibición de la contracción de la herida en estudios con ratones.

Living Allogeneic Dermal Fibroblasts

Dermagraft®, se obtiene del cultivo de fibroblastos de prepucio de neonato (homólogo) sobre una malla de poliglicol. Los fibroblastos sembrados empiezan a secretar colágenos y FC que cubren la malla y forman un tejido sólido. Este material es biodegradable y desaparece después de 3-4 semanas. Esta matriz se usa sola o como base para autoinjerto de cultivos epidérmicos. No se reportan rechazos, tiene buena resistencia es fácil de manejar y provee buenos resultados

ECM of Allogeneic Human Dermal Fibroblasts

Transcyte™, se produce similar al anterior, pero sobre fibras de nylon, la diferencia es que después de la síntesis de varios componentes de la MEC, los fibroblastos son inactivados o matados

después por congelamiento. Dentro de las ventajas están la disponibilidad inmediata y fácil almacenamiento

Living Allogeneic Bilayered Skin Construct

Apligraf® es una estructura de dos capas compuestas de fibroblastos y queratinocitos alogénicos derivados de prepucio de neonato. Los fibroblastos se combinan con colágeno bovino tipo I, luego los queratinocitos se colocan sobre ellos en una interfase aire-líquido para promover la diferenciación. Se observa la producción de la matriz, FC e induce a la regeneración. Son necesarias varias aplicaciones a la herida. Es de fácil manejo, es tolerado como un autoinjerto, no se ocupa un procedimiento quirúrgico. Las desventajas es que es caro, y tiene una vida corta de 5 días.

Orcel™, consiste en fibroblastos y queratinocitos sembrados opuestamente sobre una membrana de colágeno bovino entrecruzado. La ventaja es la disponibilidad inmediata y la desventaja es los pocos datos clínicos que respaldan el uso de esta.

Materiales derivados de cerdos

Submucosa del intestino delgado porcino Oasis™, consisten en una MEC tridimensional de colágeno, que parece ser un reservorio de citocinas y moléculas de adhesión, que provee un andamio para el crecimiento celular. Se remueve el musculo liso, la serosa y la mucosa, para producir una matriz acelular. Cuenta con colágeno tipo I, III y IV, FC como TFC- , FFC-2. Las ventajas son la disponibilidad inmediata y una larga duración de vida

Acellular Xenogenic Collagen Matrix o E-Z-Derm™, consta de colágeno entrecruzado con aldeído, que lo unen a una gasa que se descarta después de la aplicación. Las ventajas son disponibilidad inmediata y larga duración. Dentro de las desventajas están la posibilidad de transmisión de enfermedades, cantidad de exudado y la cicatrización, pero hay tolerancia y efectividad.

Otros

Un equivalente epidérmico generado in vitro del folículo piloso del paciente ha sido injertado exitosamente. Las ventajas son que hay células precursoras de queratinocitos, con una alta capacidad proliferativa, se vende como EpiDex™

Fuente: Bello et al, 2001; Mackneil, 2007

Apéndice 2. Imágenes de algunas de las muestras procesadas



Figura 8.1. Muestra P00509, antes del procesamiento



Figura 8.2. Muestra P00509, después limpiada



Figura 8.3. Muestra P00509, después del tercer lavado con PBS y antibiótico

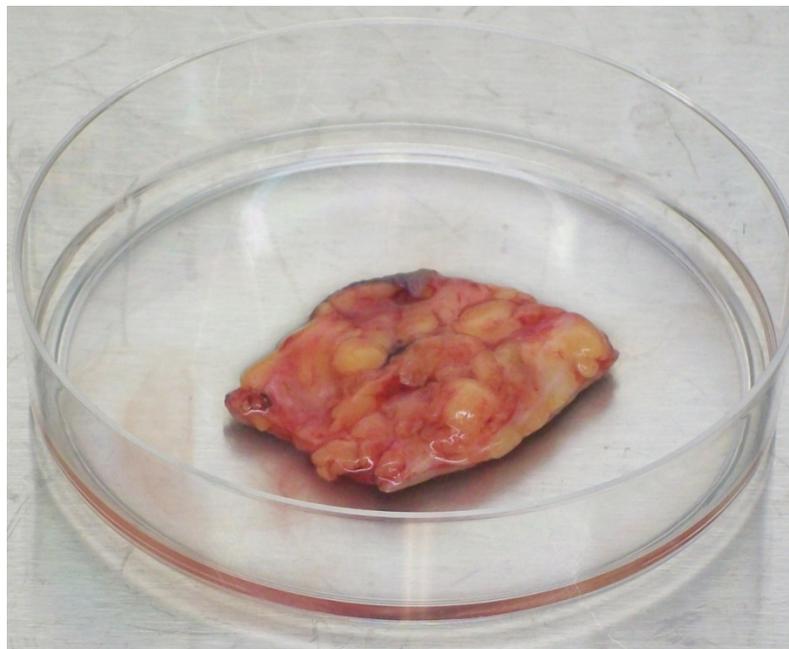


Figura 8.4. Muestra P00609, antes de ser procesada

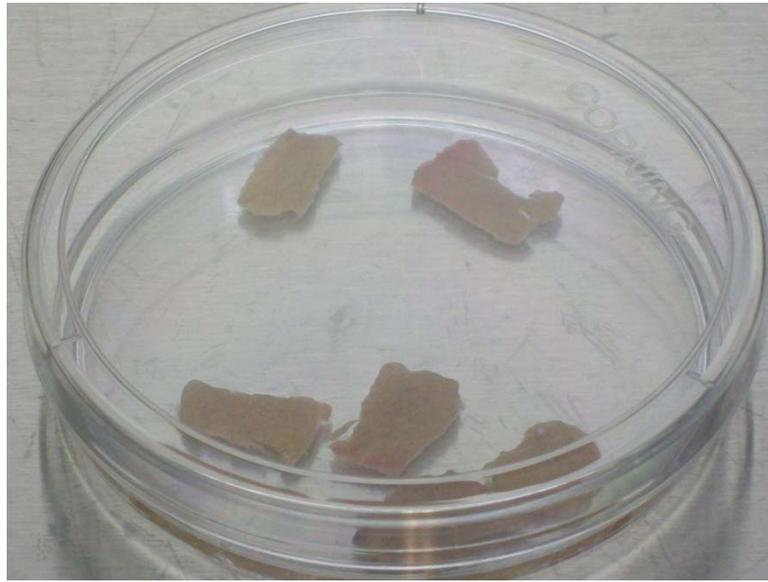


Figura 8.5. Muestra P00609, después del tercer lavado



Figura 8.6. Muestra P00709, antes del procesamiento



Figura 8.7. Muestra P00809, antes del procesamiento

Apéndice 3. Diagrama del ensayo de determinación del número mínimo a sembrar de células por cm^2 .

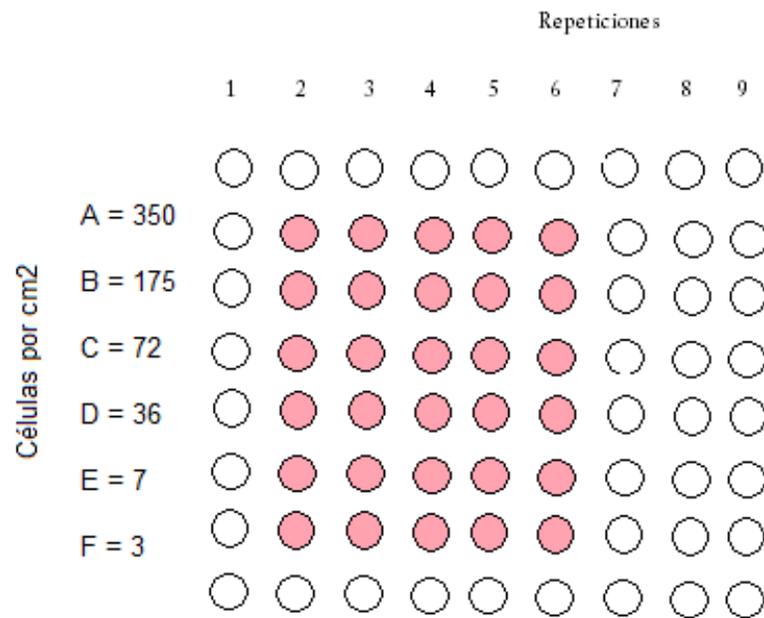


Figura 8.8. Fibroblastos pasaje 4 y 14

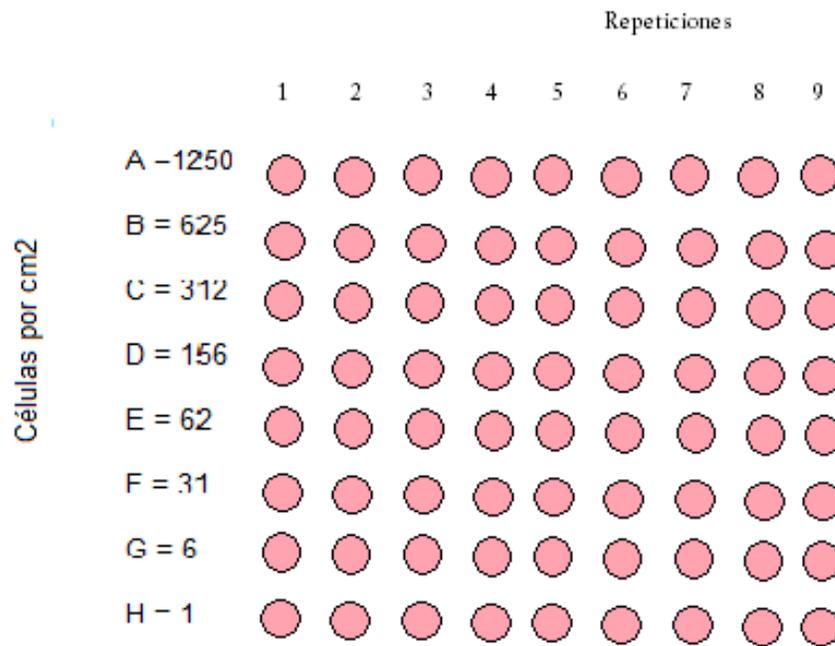


Figura 8.9. Fibroblastos pasaje 8

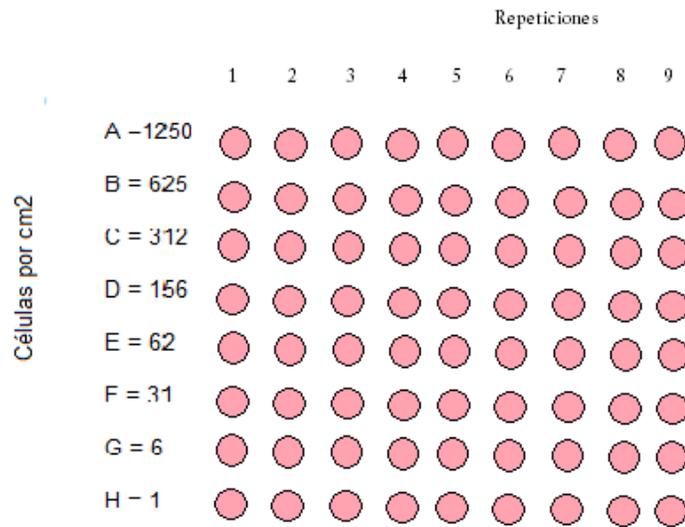


Figura 8. 10. Queratinocitos pasaje 3

Apéndice 4. Diagrama del ensayo de comportamiento de fibroblastos con diferentes recubrimientos.

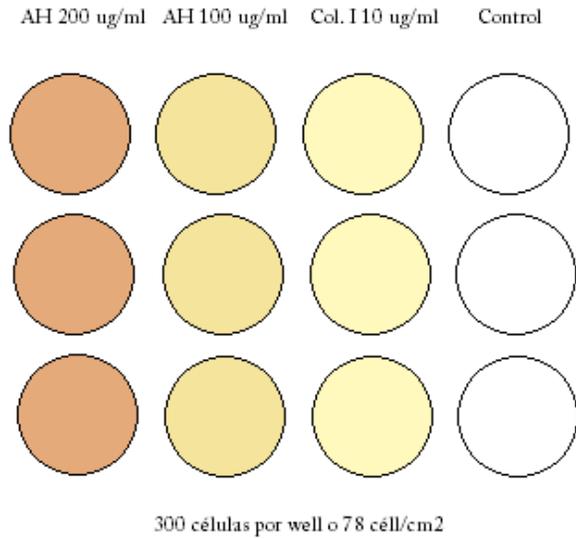


Figura 8.11. Fibroblastos pasaje 1

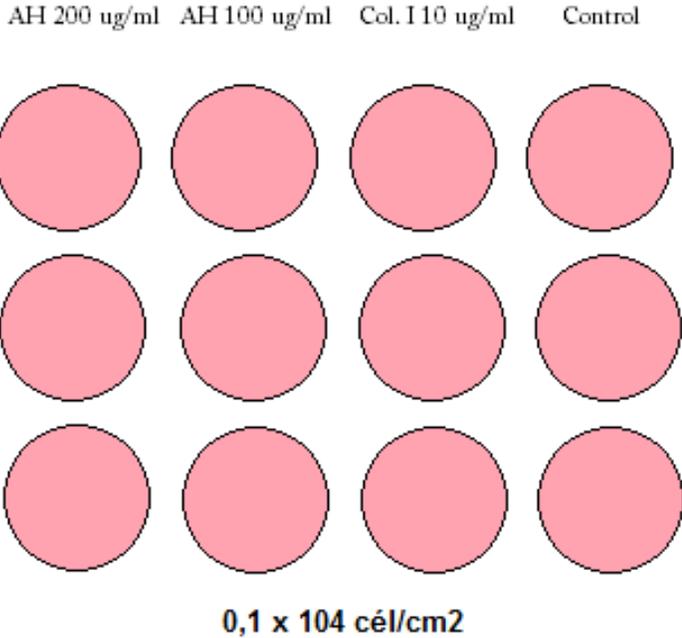


Figura 8.12. Fibroblastos pasaje 16

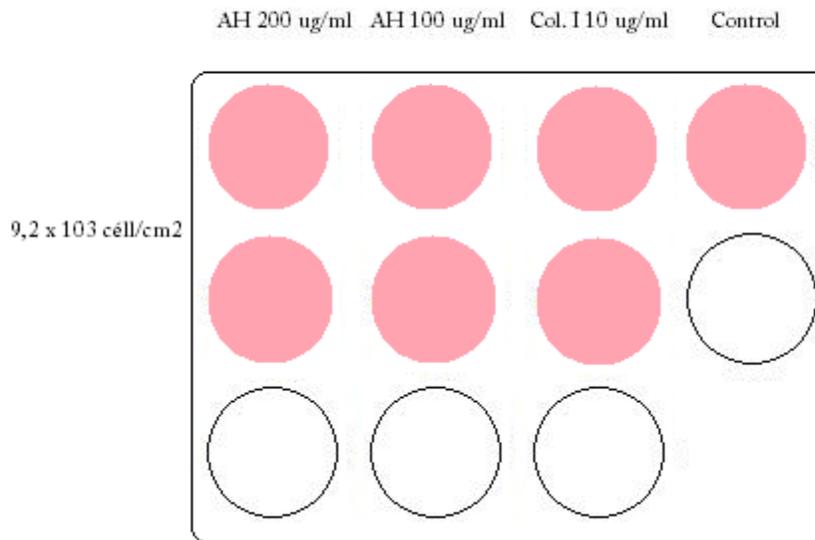


Figura 8.13. Queratinocitos P1.

Apéndice 5. Diagrama del ensayo de eficiencia de sembrado de fibroblastos. Nótese que la hora indicada al lado izquierda indica la hora a la que fueron levantados después de su siembra

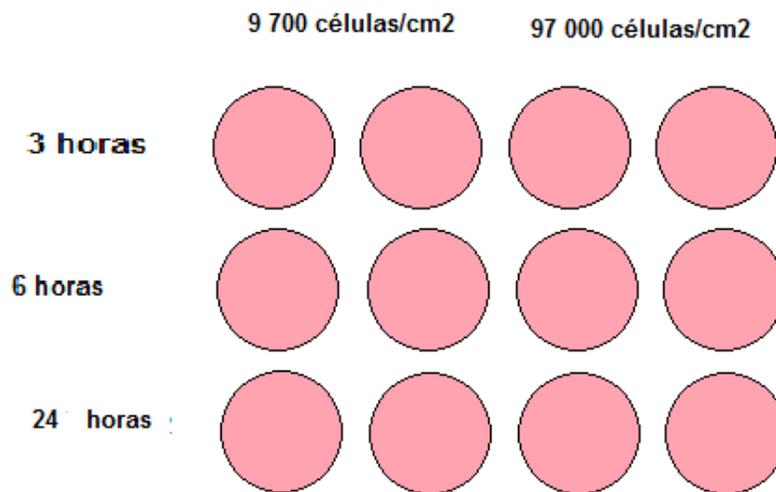


Figura 8.14. Eficiencia de sembrado de los fibroblastos

Apéndice 6. Imágenes del Biorreactor tensando y sin tensar respectivamente.

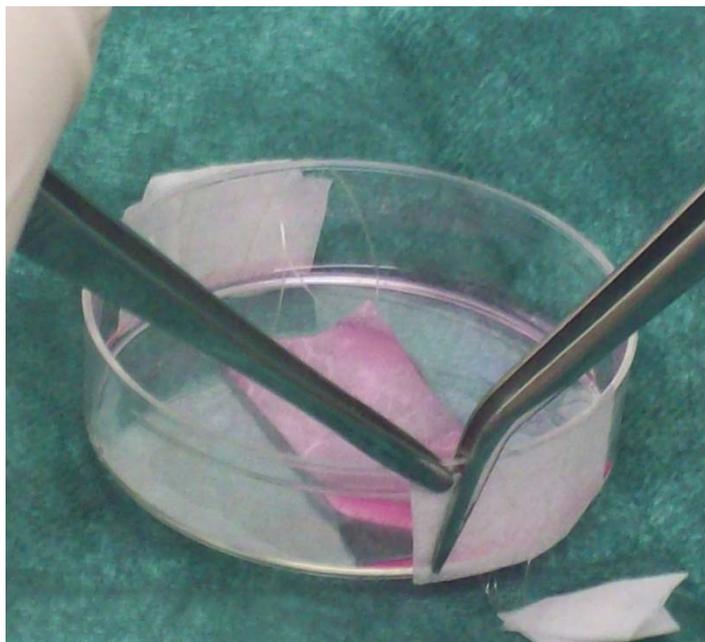


Figura 8.15. Imagen del “Biorreactor”



Figura 8.16. Sembrado de células sobre el “Biorreactor”

9. ANEXOS

Tabla 5. Historia y evolución del cultivo celular. Fuente: Alberts *et al*, 2002

1885	Roux muestra que células embrionarias de pollo pueden ser mantenidas vivas en solución salina fuera del cuerpo del animal.
1907	Harrison cultiva medula espinal amfibio, demostrando que los axones son producidos como extensiones de las células nerviosas.
1910	Rous induce un tumor usando un extracto de pollo filtrado de células de tumor de ratón, posteriormente demostró que contenían ARN de ratón (Virus sarcoma de Rous).
1913	Carrel muestra que las células pueden crecer por largos periodos en cultivo previendo nutrientes y condiciones asépticas.
1948	Earle y colegas aislaron células individuales de la línea L y mostraron que podían hacer clones en cultivo.
1952	Grey y colegas establecen una línea celular continua de carcinoma cervical humano, que después pasan a ser como la conocida línea celular HeLa.
1954	Levi-Montalcini y asociados mostraron que el factor de crecimiento de nervio (NFC) estimula el crecimiento de los axones en cultivo.
1955	Eagle hace la primera investigación sistémica para los requerimientos nutricionales esenciales y encuentra que las células animales se pueden propagar en una mezcla definida de pequeñas moléculas suplementadas con una pequeña porción de proteínas de suero.
1956	Puck y asociados seleccionan mutantes con requerimientos alterados de crecimiento de cultivos de células HeLa.
1958	Temin y Rubin desarrollan un ensayo cuantitativo para la infección de células de pollo en cultivo con el virus sarcoma de Rous. En la siguiente década las características de estas transformaciones virales son establecidas por Stoker, Dulbecco, Green, y otros virólogos.
1961	Hayflick y Moorhead mostraron que los fibroblastos humanos mueren después de un número definido de divisiones.
1964	Littlefield introduce el medio HAT para el crecimiento selectivo de células somáticas híbridas. Junto con la técnica de fusión celular, hace un avance en la genética.
	Kato y Takeuchi obtiene una planta de zanahoria completa de unas células de raíz de zanahoria en cultivo.
1965	Ham introduce un medio definido libre de suero para soportar el crecimiento clonal de células en cultivo de mamíferos.
	Harris y Watkins producen el primer heterocarión de células mamíferas por una fusión inducida por virus de células humanas y de ratón.
1968	Augusti-Tocco y Sato adaptan unas células de tumor de ratón (neuroblastoma) a cultivo y aíslan clones que son eléctricamente excitados y se extiende a procesos nerviosos. Un número de otras líneas celulares diferenciadas son aisladas de otras incluyendo células del músculo esquelético y del hígado.
1975	Köhler y Milstein producen el primer anticuerpo monoclonal de líneas celulares de hibridoma
1976	Sato y asociados publican el primer de una serie de artículos que muestran las diferencias entre las líneas celulares y sus requerimientos nutricionales de hormonas y factores de crecimiento en un medio libre de suero.
1977	Wigler, Axel y sus asociados desarrollan un método eficiente para introducir una copia de genes mamíferos en células en cultivo.
1986	Martin, Evans y colegas aíslan y cultivan células madre embrionarias pluripotentes de ratón.
1998	Thomson, Gearhart y asociados aislaron células madre embrionarias humanas.