

# **DOCUMENTO II**

**INSTITUTO TECNÓLOGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Centro de Investigación en Biotecnología  
Laboratorio de Ingeniería de Tejidos

# **INFORME FINAL**

## **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Consolidación de un sistema de producción *in vitro* de piel humana para pacientes con diversas afecciones epidérmicas**

*Rojas M, Guerrero M, Alvarenga S, Sancho M, Siri C, Prada J, Hidalgo B, Reyna G, Venegas P, Rodríguez M, Recinos H, Fonseca G.*

Setiembre, 2009

**TABLA DE CONTENIDOS**

	<b>Pág.</b>
<b>1. Datos generales</b> .....	3
<b>2. Cumplimiento de objetivos</b> .....	4
<b>3. Aportes y alcances</b> .....	5
3.1. Beneficios obtenidos y futuros del proyecto.....	5
3.2. Difusión y divulgación.....	6
3.3. Actividades complementarias.....	7
<b>4. Limitaciones y problemas encontrados</b> .....	8
<b>5. Observaciones generales y recomendaciones</b> .....	11

## **1. DATOS GENERALES**

### **Nombre del proyecto**

Consolidación de un sistema de producción *in vitro* de piel humana para pacientes con diversas afecciones epidérmicas

### **Escuela responsable**

Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica

### **Otras instituciones participantes**

Hospital Nacional de Niños  
Hospital San Juan de Dios  
Hospital México

### **Investigador coordinador**

Dr. Miguel Rojas Chaves, Ph.D.

### **Investigadores colaboradores**

M.Sc. Silvana Alvarenga Venutolo  
M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes  
Dr. Mario Sancho Torres  
Dra. Patricia Venegas Barrantes  
Dr. Carlos Antonio Siri Adema  
Dr. Hugo Recinos Pineda  
M.Sc. Marvin Rodríguez González  
Dra. Yaneth Prada Castellanos  
Dr. Gilberto Reyna Waldron  
Dr. Benjamín Hidalgo-Matlock  
Dra. Gisella Fonseca Portilla

### **Período de ejecución**

Enero 2007 – Diciembre 2008

## 2. CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS

Objetivos Propuestos	Alcance	Productos Esperados	Alcance	Actividades Propuestas	Alcance
Ampliación, montaje y puesta en funcionamiento del laboratorio de cultivo de células epidérmicas en el ITCR.	80%	Laboratorio con el equipo instalado y en funcionamiento.	<ul style="list-style-type: none"> <li>3 equipos fuera de funcionamiento.</li> <li>Aún se debe amueblar la nueva área de laboratorio.</li> <li>Aún se deben comprar nuevos equipos.</li> </ul>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Adquisición e instalación de equipos de laboratorio.</li> <li>Adquisición de materiales y suministros.</li> </ol>	Se adquirieron los equipos necesarios mínimos para establecer un laboratorio de cultivo celular e ingeniería de tejidos acorde con los objetivos.
Consolidación del sistema de producción de queratinocitos para trasplante autólogo.	20%	<p>Protocolo de cultivo y producción de queratinocitos para trasplante autólogo establecido.</p> <p>Protocolo de cultivo <i>in vitro</i> con el empleo de biorreactores, establecido .</p>	Se practicó el protocolo de cultivo de queratinocitos. Sin embargo, el CENDEISSS prohibió realizar ensayos de irradiación, lo que impide contar con fibroblastos irradiados para el <i>feeder-layer</i> necesario para crecer los queratinocitos. Se crecieron estas células usando medios definidos, pero esto no es viable al largo plazo y se debe esperar a la aprobación del CENDEISSS para continuar con este protocolo.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Visita científica a un centro de trasplantes epidérmicos.</li> <li>Capacitación para evaluar y comparar sistemas de preservación de láminas epidérmicas.</li> <li>Determinación de parámetros de producción de fibroblastos en biorreactores (pH, Temperatura, CO2 DO2).</li> <li>Visita científica de validación de métodos de producción de láminas de piel.</li> <li>Capacitación en trasplante de láminas epidérmicas en pacientes.</li> </ol>	Las investigadoras M.Sc. Maritza Guerrero y M.Sc. Silvana Alvarenga atendieron incapacidades durante el período de este proyecto, lo cual atrasó las capacitaciones programadas, las cuales deberán realizarse durante el próximo período (2009-2011).
Consolidación del protocolo de irradiación de fibroblastos.	20%	Protocolo de irradiación en funcionamiento.	Se practicó el protocolo de irradiación de fibroblastos 3T3. Sin embargo, el CENDEISSS prohibió realizar ensayos de irradiación hasta aprobar el proyecto, por lo que se abocó tiempo y esfuerzos para conseguir este permiso.	<ol style="list-style-type: none"> <li>Visita científica a un laboratorio de irradiación de células epidérmicas.</li> <li>Validación del protocolo de irradiación.</li> <li>Elaboración de un informe de avance.</li> </ol>	<p>Se elaboró y entregó el informe de avance.</p> <p>La visita a un centro de irradiación debía realizarla el Dr. Recinos (HSJD), pero sus obligaciones con la CCSS impidieron la disponibilidad de tiempo durante este período.</p>
Establecimiento del protocolo de crioconservación de células epidérmicas <i>in vitro</i>	80%	Protocolo de crioconservación establecido y en aplicación.	Se estableció el protocolo de crioconservación empleando fibroblastos murinos 3T3. Sin embargo, se deberá validar el protocolo evaluando la	<ol style="list-style-type: none"> <li>Visita científica a un laboratorio de cultivo <i>in vitro</i> y crioconservación de células epidérmicas.</li> </ol>	Las investigadoras M.Sc. Maritza Guerrero y M.Sc. Silvana Alvarenga atendieron incapacidades durante el período de este proyecto, lo

			sobreviviencia y proliferación de las células congeladas.	<p>2. Desarrollo de ensayos de laboratorio para ajustar el protocolo y obtener tasas de viabilidad aceptables</p> <p>3. Crioconservación de células epidérmicas de pacientes y de líneas celulares 3T3</p>	<p>cual atrasó las capacitaciones programadas, las cuales deberán realizarse durante el próximo período (2009-2011).</p> <p>Aún se debe ajustar el protocolo para asegurar la viabilidad de las células crioconservadas.</p> <p>Se crioconservaron numerosas células 3T3 y fibroblastos de pacientes.</p>
Establecimiento del protocolo de trasplante de láminas epidérmicas	40%	Protocolo clínico de trasplante de láminas de piel establecido	Se realizó un ensayo en el que se trató a una paciente adulta con fibroblastos autólogos cultivados mediante ingeniería de tejidos en el ITCR. Este procedimiento se realizó exclusivamente por razones humanitarias.	<p>1. Capacitación en tratamientos clínicos de trasplante</p> <p>2. Visita científica a un centro de trasplantes epidérmicos</p> <p>3. Visita de experto en trasplante de láminas epidérmicas.</p> <p>4. Visita de experto para el análisis de resultados del proyecto</p> <p>5. Elaboración del informe final.</p>	<p>La visita científica y capacitaciones debían ser realizadas por médicos del a CCSS, pero sus obligaciones laborales impidieron la disponibilidad de tiempo durante este período.</p> <p>La visita de experto programada se encuentra aún en trámite y deberá ser ejecutada durante el próximo período (2009-2011).</p> <p>Se inició la elaboración del informe final y se completó durante el 2009.</p>

### 3. APORTES Y ALCANCES

#### 3.1. Beneficios obtenidos y futuros del proyecto

- El presente proyecto, así como su antecesor, han permitido que en la actualidad Costa Rica disponga de un laboratorio especializado en el cultivo de células epidérmicas único en el área centroamericana, con capacidad de suministrar en el corto plazo material para los pacientes que sufren afecciones de la piel.
- Los protocolos establecidos en el LAINTEC han permitido nutrir el conocimiento en las técnicas de cultivo *in vitro* de células de la piel gracias al entrenamiento y capacitación técnica, profesional y académica de los investigadores, personal médico, docentes y estudiantes involucrados en el proyecto.
- El potencial de producción de piel mediante ingeniería de tejidos y el tratamiento de afecciones epidérmicas en pacientes humanos es ahora una realidad en el corto plazo para suplir las necesidades de los centros hospitalarios públicos del Área Metropolitana, y se abre la posibilidad de ofertar estos servicios al sector médico privado.
- La aplicación de los protocolos del LAINTEC en el tratamiento de pacientes con afecciones epidérmicas en Costa Rica potencialmente disminuirá el riesgo de infecciones pos-tratamiento y producirá una verdadera reepitelización, con una más rápida y efectiva recuperación. Esto incidirá en el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes, potencialmente reduciendo el tiempo de reincorporación a su vida cotidiana.
- El desarrollo de esta propuesta ha tenido un impacto tecnológico importante en Costa Rica, dado que ha abierto el interés por el desarrollo de la Ingeniería de Tejidos en el país, lo cual se ve reflejado en el establecimiento de otros proyectos relacionados en el ITCR, tal como lo es el desarrollo de apósitos biológicos a partir del colágeno y el quitosano de especies marinas como soportes para el cultivo y trasplante de células. Se espera que otros proyectos relacionados con esta área se sigan desarrollando en el país.
- La transferencia de conocimiento y tecnología a través de la capacitación a los profesionales de diferentes especialidades ha sido iniciada con las iniciativas del LAINTEC, permitiendo que estudiantes egresados de Biotecnología que colaboraron como asistentes del LAINTEC hayan participado profesional y académicamente en diversas actividades de capacitación, laborales y de prácticas de especialidad relacionadas con el área a nivel nacional e internacional.

- Se espera que se incremente el desarrollo de la tecnología de trasplante de piel en el país con miras a otras aplicaciones como la cirugía plástica y odontología. Además, se espera que Costa Rica disponga de otros servicios como la posible exportación de piel a otros países de la región Centroamericana y del Caribe.
- Posibilidad de disminución de índices de mortalidad de personas tratadas y mejoramiento en la calidad de los tratamientos de afecciones de la piel.
- Enriquecimiento curricular de la carrera de Ingeniería en Biotecnología que se imparte en el ITCR.

### **3.2. Difusión y divulgación**

El proyecto ha sido ampliamente difundido en los medios de comunicación colectiva mediante notas informativas en los medios de prensa nacionales, presentaciones en seminarios, charlas en instituciones educativas de secundaria a universitarias. Sin embargo, se ha tratado una divulgación responsable y de perfil bajo, debido a las expectativas que se puedan generar en los posibles pacientes, además por el hecho que se está a la espera de la aprobación del Comité de Bioética del CENDEISSS. Se ha participado también en ferias de comunicación de proyectos, presentando panfletos y pósteres. A continuación se incluyen algunas de dichas actividades.

- En el informe a la VIE del proyecto antecesor (2005-2006) se mencionó una nota que realizó durante Noviembre del 2007 Teletica Canal 7 en el programa “7 Días”. Este reportaje fue retransmitido durante el 2007 en la misma televisora durante notas informativas y también fue transmitido por la cadena internacional CNN.
- En Mayo del 2008 el proyecto fue incluido en el suplemento especial de los domingos Proa del periódico La Nación, dentro de un documento especial llamado “100 ideas por Costa Rica”, como una de las ideas más innovadoras y potencialmente beneficiosas del país.
- En el 2008 se participó en la Feria de la Salud organizada por el Centro Médico del ITCR, donde se presentó un póster (Fig. 11) y se atendió al público.





Figura 11. Póster presentado durante la Feria de la Salud, ITCR, 2008.

### 3.3. Actividades complementarias

Del 29 de Enero al 02 de Febrero del 2007 se recibió la visita de la Dra. Alicia Lorenti del Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires. Esta visita correspondía al proyecto 2005-2006, por lo que se incluyó en el informe presentado a la VIE respectivo.

Como aportes adicionales, se incluyen las siguientes actividades:

- Un estudiante asistente del LAINTEC, Alejandro Hidalgo, se encuentran en Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Queensland, Australia, realizando su trabajo de graduación en un tema relacionado con el área de Ingeniería de Tejidos.

- Una estudiante asistente del LAINTEC, Silvia Castro, ganó un premio del Instituto Científico Pfizer (6.000 dólares) para realizar su trabajo de graduación en un tema relacionado con el área de Ingeniería de Tejidos durante el 2008 en el Hospital Austral, Buenos Aires, Argentina.
- Gracias a financiamiento aportado por la VIESA y el CONICIT, seis estudiantes asistentes del LAINTEC (Silvia Castro, Adriana Saborío, Jonathan Quesada, Diego Brenes, Stephanie Alvarado y María Laura Madrigal) asistieron al Curso de Ingeniería de Tejidos del Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME), Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina durante el 2007.
- Una estudiante asistente del LAINTEC, Stephanie Alvarado, desarrolla actualmente su trabajo de graduación en el LAINTEC (una investigación con células madre) en conjunto con un acuerdo con la CCSS.

El LAINTEC recibió durante el 2008 el premio a la Investigación Científica del Instituto Científico Pfizer (20.000 dólares) para financiar un nuevo proyecto de investigación relacionado titulado “Validación mediante métodos moleculares del cultivo de queratinocitos para optimizar su producción *in vitro* con fines terapéuticos en Costa Rica”.

#### **4. LIMITACIONES Y PROBLEMAS ENCONTRADOS**

##### *Dificultades con trámites administrativos*

La preparación de los documentos necesarios para obtener el permiso del Comité de Bioética de la CCSS para la aplicación de los protocolos del ITCR en pacientes humanos ha significado un enorme esfuerzo humano. Esta documentación incluye: la revisión bibliográfica necesaria y redacción de diversos documentos; la recopilación y preparación de protocolos de atención a los pacientes (ver Anexo 6, Documento I, Informe Final 2007-2008) por parte de los centros médicos; la recolección de las firmas de todos los participantes y sus superiores inmediatos; y la aprobación del documento final por todas las instituciones, investigadores y médicos participantes.

Dado que el personal médico trabaja bajo horarios usualmente poco convencionales y está sujeto a los requerimientos de su profesión, esto tiende a dificultar la fluidez en la preparación de este tipo de documentos. Sin embargo, la buena disposición y dedicación de todo el personal médico permitió la preparación de la documentación de manera satisfactoria, aunque con algunos atrasos de tiempo.

Aunque la documentación se preparó a la mayor brevedad posible, ésta no pudo ser entregada al CENDEISSS para revisión hasta finales del 2008, lo que implica

una espera de alrededor de 6 meses para conocer su resolución, y la única eventualidad que se podría presentar serían correcciones de alguno de los apartados. Sin embargo, el tiempo necesario designado para esta actividad fue superior al previamente calculado, debido a que este tipo de procedimiento biomédico, a pesar de utilizarse desde hace décadas en otros países, es novedoso también para el Comité de Bioética, dado que el biomaterial (células de los pacientes) que se desea obtener, no corresponde a las características de un medicamento clásico (identificación de un principio activo, dosis-respuesta o acción farmacológica específica). En este sentido, esto es un aporte del proyecto para ayudar a ampliar las perspectivas de quienes aprueban los protocolos de investigación biomédica en el país. De ahí la inversión tan cuantiosa de tiempo en esta parte del proyecto.

En términos prácticos, la falta de la aprobación del CENDEISSS para este proyecto implica además que durante este período no se autorizó al personal del ITCR para realizar ensayos de irradiación y trasplante de células cultivadas mediante ingeniería de tejidos. Esto implica que no se pudo continuar con los ensayos de irradiación de los fibroblastos 3T3, lo cual no podrá ser reanudado hasta obtener el permiso del CENDEISSS.

Sin embargo, no se prohibió la recepción de muestras de piel de biopsias de pacientes y de otras fuentes de descarte, lo cual permitió practicar los protocolos de cultivo primario y secundario de fibroblastos autólogos. No obstante, el impedimento para realizar ensayos de irradiación de fibroblastos implicó que no se pudo contar con la base de fibroblastos 3T3 irradiados necesarios para el cultivo de queratinocitos. El protocolo de establecimiento primario de estas células es complicado y detallado, y aunque el uso de medios definidos permite obviar la deficiencia mencionada, esta práctica no es una solución, ya que destruye potencialmente la capacidad regenerativa de las células madre de los queratinocitos, la cual es necesaria para el éxito del trasplante. Debido a ello, no se pudo practicar los protocolos para el cultivo de queratinocitos.

Como nota final de este apartado, se indica que la M.Sc. Maritza Guerrero mantuvo una incapacidad desde el 15 Febrero al 28 de marzo del 2008 debido a un problema de salud, mientras que la M.Sc. Silvana Alvarenga mantuvo una incapacidad desde el 7 de Julio al 29 de Noviembre del 2008 debido a una fractura. La incapacidad de la M.Sc. Alvarenga fue suplida mediante la contratación temporal de la Ing. Laura Calvo. Sin embargo, la incapacidad de la M.Sc. Guerrero no pudo ser suplida lo que implicó la falta de personal durante el mencionado período. Además, la M.Sc. Guerrero renunció a su cargo profesional en el presente proyecto el 8 de Agosto del 2008, de manera que esta renuncia fue suplida durante el resto del 2008 con la contratación de la M.Sc. Catalina Ulloa. Esto implica la necesidad de la contratación para el próximo año de personal profesional a cargo de las 10 horas que deja disponible la M.Sc. Guerrero.

Se concluye que existe una limitación de personal, dado que la carga de trabajo esperada, que incluye no sólo las horas efectivas tanto en los laboratorios del

ITCR, como en el sector hospitalario, sino también los complicados procedimientos administrativos institucionales, y la continua elaboración de documentación técnica y administrativa, tanto nacional como internacional. A pesar de estos inconvenientes es necesario recalcar, tal y como lo han manifestado varios de los expertos internacionales relacionados con este proyecto, que es un esfuerzo pionero en el área centroamericana en el cual nuestro país tiene los elementos para realizarlo y que las dificultades son más administrativas y organizacionales que científico-tecnológicas.

### *Problemas técnicos*

Una serie de sobrecargas eléctricas en la red del Centro de Investigación en Biotecnología ocasionó picos de voltaje que provocaron desperfectos eléctricos en algunos equipos críticos del laboratorio. Particularmente, la cámara de flujo laminar, el autoclave y una incubadora de CO<sub>2</sub> quedaron fuera de funcionamiento debido a este problema. Aunque el servicio de autoclave ha sido provisto en sustitución por el CIB, no existe otra cámara de flujo ni otra incubadora con las características mínimas para el cultivo celular en el ITCR, mientras que la cámara del flujo con la inicialmente se trabajó en el HNN también se encontraba fuera de funcionamiento.

La cámara de flujo laminar es esencial para mantener las condiciones de esterilidad de los cultivos, asegurando que no se presentará ninguna contaminación en los mismos. Esto es de vital importancia considerando que estos materiales producidos en el ITCR serían potencialmente trasplantados a pacientes humanos que padecen ya por sí mismos de heridas o lesiones. Por otro lado, la incubadora de CO<sub>2</sub> es totalmente indispensable para el crecimiento y proliferación de las células.

La revisión del sistema eléctrico por parte del personal del Departamento de Mantenimiento del ITCR ha sido extensiva, quienes recomendaron la instalación de un sistema para evitar dichas fluctuaciones de voltaje. Sin embargo, la carga eléctrica que este aparato debe soportar es muy alta, de manera que a la fecha no se ha podido resolver el problema, aunque sí se ha observado una reducción de dichas sobrecargas. No obstante, sí se recomienda que este aspecto sea una prioridad para evitar nuevos daños a los equipos, lo que también podría ser resuelto comprando UPS especiales para cada aparato. Sin embargo, el costo resultaría muy elevado, superior a la instalación de un solo sistema regulador unido a la red eléctrica completa del CIB.

La no disponibilidad de estos equipos también bloqueó la continuidad del proyecto, ya que, dado que se trata de equipos donados por el OIEA y de origen europeo, los repuestos no estaban disponibles en el país; por ejemplo, la autoclave no cuenta en Costa Rica con ningún centro de atención técnica. Debido a esto, la espera para la reparación de la cámara de flujo laminar fue de casi un año; el repuesto para la incubadora se espera que sea entregado al país durante los

primeros meses del 2008 y para el autoclave se debe comprar un chip eléctrico que debe ser comprado en Alemania, para lo cual se está buscando el trámite más viable.

## **5. OBSERVACIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES**

- De no poder contar con procedimientos administrativos más ágiles en el ITCR, por ejemplo para la adquisición de bienes, servicios y materiales, sería deseable el contar con personal dedicado esta tramitación, con el fin de que las horas asignadas a los investigadores sean invertidas principalmente en el laboratorio.
- Contemplar a mediano plazo la posibilidad de ofrecer los servicios de cultivo de células (específicamente fibroblastos) con los protocolos optimizados por el LAINTEC a hospitales privados para el tratamiento de pacientes con afecciones de la piel y a centros de cirugía reconstructiva. Esto sin que signifique un menoscabo de los objetivos planteados en este proyecto.
- Ampliar las áreas de investigación y docencia, por medio de la opción de estudios e investigación biomédica en el ITCR.