

TRABAJO DE INVESTIGACION

CARÁCTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE PIEL CULTIVADA IN VITRO

HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SKIN CULTURE IN VITRO

M L ARANGO *, C I CHAMORRO **, L M RESTREPO ***, L A CORREA **** y J HENAO *****

SUMMARY In vitro skin culture have been used in the regeneration of skin wound (chronic ulcers and burns), and for genodermatosis treatment. In our country there is a high patient number with chronic ulcers and 2319 burned in a period of 10 years. Conventional treatment generates long hospitalization stays and high costs. We established culture conditions of keratinocytes and fibroblasts expansion, to generate a cutaneous substitute in order to offer other treatment options. Skin cells were obtained from organs donors and surgical surpluses procedures. Major success was achieved in primary cultures obtained from 40-year-old younger donors samples (65%), compared with older donors (33%). In one cutaneous substitute produced with these cells, was demonstrated that keratinocytes and fibroblasts, presented functional, structural and morphologic characteristics similar to normal skin. Cutaneous substitute besides preserve normal skin functional and structural characteristic, compared with other similar imported products, our cutaneous substitute, showed many advantages in terms of costs, manipulation and stability.

KEY WORDS: skin substitute, keratinocytes, fibroblasts, cell culture, regenerative medicine.

Rev Argent Dermatol 2009; 90: 190-200

INTRODUCCIÓN

En las últimas tres décadas el cultivo y proliferación de queratinocitos humanos ha emergido como una herramienta poderosa,

para la expansión celular y la formación de epitelio estratificado y queratinizado ¹, contribuyendo al desarrollo de nuevas tecnologías como la ingeniería de tejidos y la terapia génica ²⁻⁴. El potencial terapéutico de los queratinocitos, actualmente se enfoca en la producción de equivalentes cutáneos, para el tratamiento no sólo de pacientes con grandes quemaduras ^{5,6}, sino también con otras patologías como las úlceras cutáneas crónicas ⁷⁻⁹ y algunas genodermatosis ¹⁰. Sin embargo, uno de los mayores problemas en la producción de equivalentes cutáneos, está relacionado con la fragilidad de las láminas de queratinocitos en ausencia del componente dérmico, lo que ocasiona dificultades para su aplicación e incorporación ^{11,12}. Se han realizado esfuerzos para desarrollar equivalentes cutáneos con un componente dérmico, que soporte a las células basales de los queratinocitos, permita su proliferación, expansión, diferenciación y síntesis de la unión dermo-epidérmica tras el implante y funcione como una auténtica piel humana ¹³. Las superficies utilizadas con

* Martha Ligia Arango Rodríguez. Docente Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Investigadora del Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares (GITTC).

** Clara Ibel Chamorro. Estudiante de Doctorado. Dermatology and Venereology Unit. Department of Medicine. Karolinska Institutet. Stockholm. Sweden.

*** Luz Marina Restrepo. Directora Instituto Investigaciones Médicas. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia.

**** Luis Alfonso Correa. Médico Dermatólogo. Departamento de Dermatología. Hospital Universitario San Vicente de Paul.

***** Julieta Henao. Docente Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia y Coordinadora del GITTC.

Grupo Ingeniería de Tejidos y Terapias Celulares (GITTC). Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia.
Carrera 51 D No. 62-29 ofc 231 - lab 308.
Medellín. Colombia.
e-mail: grupoitcc@yahoo.com.

mayor frecuencia son el colágeno bovino tipo I, proteoglicanos como el condroitin-6-sulfato y glicosaminoglicanos entre otros ^{14,15}. En la última década ha surgido gran interés en producir pseudodermis, que contenga elementos estructurales y celulares como los fibroblastos, células fundamentales para el rápido crecimiento de los queratinocitos ¹⁶, que conforman la dermis y están involucrados en la formación de la matriz extracelular. Se ha demostrado que los geles fabricados con estos dos elementos, sintetizan factores de crecimiento similares a los secretados in vivo y sirven como reservorio a la infiltración de células inflamatorias y tejido de granulación en el sitio de la lesión, favoreciendo su cicatrización y cierre ¹⁶. En este trabajo se realizó la adaptación tecnológica ¹⁷ de un equivalente cutáneo, compuesto por un elemento dérmico de plasma y fibroblastos y un componente epidérmico con queratinocitos. Se evaluaron sus características funcionales, estructurales e histológicas, para determinar la semejanza con la piel intacta y proponer su utilización en la clínica.

OBJETIVOS

Establecer las condiciones para el cultivo y expansión de queratinocitos y fibroblastos humanos.

Evaluar las características histológicas del equivalente cutáneo, compuesto por un elemento dérmico de plasma y fibroblastos y un componente epidérmico con queratinocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

En este estudio se procesaron muestras provenientes de piel de donantes de órganos para trasplantes y sobrantes de procedimientos quirúrgicos como circuncisiones, mastoplastias y rinoplastias. El rango de edad de los donantes de las muestras osciló entre 1-80 años.

La obtención de las muestras se realizó bajo la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia.

Obtención de queratinocitos y fibroblastos

Los queratinocitos y los fibroblastos se aislaron de fragmentos de piel de 1-4 cm². Las muestras se recolectaron en tubos de 15 mL (Falcon) con medio de cultivo estéril DMEM (Gibco) y fueron tratadas con Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 µg/mL (Gibco), durante 30 minutos, luego la biopsia se lavó con Tripsina/EDTA (T/E) ICN 0.025%, se eliminó el tejido graso subcutáneo y se fragmentó con tijeras. Se hizo digestión enzimática en solución T/E durante 30 minutos a 37°C, para la obtención de células individuales. Transcurrido este tiempo se inactivó la T/E con medio de cultivo suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco). El botón de células obtenido tras la centrifugación se resuspendió en 2 mL de medio de cultivo (DMEM suplementado con 10% SBF, Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 µg/mL (Gibco), L-Glutamina 2 mM), se determinó la viabilidad y el número de células con Azul de Tripiano (Sigma).

Cultivo primario de queratinocitos

Se estandarizaron dos sistemas de cultivo primario. En el primero se utilizaron medios libres de suero KGM (Clonetics) suplementado con 52 µg/mL de extracto de pituitaria (Clonetics) o medio SFM (Gibco) suplementado con 10 ng/mL factor de crecimiento epidérmico (Austral Biologicals). Se sembraron 1.5-2x10⁶ células obtenidas de la biopsia, en frascos de 25 cm² (Falcon). El otro sistema de cultivo consistió en crecer las células obtenidas, a partir de la biopsia en presencia de 7x10⁶ células de la línea celular murina 3T3-Swiss-donación del Dr. Álvaro Meana del Centro de Transfusión del Principado de Asturias, irradiadas, con una dosis de 6000 rads (fuente de Cobalto) durante 38 minutos, sembrada en frascos de 75 cm². En este sistema, el medio de cultivo consistió en DMEM (Gibco) y Ham's-F12 (Sigma) 2:1, suplementado con 10% SBF (Gibco), Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 µg/mL (Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco), Adenina 24 µg/mL, Insulina 5 µg/mL, Toxina de Cólera 8 ng/mL, Triiodotironina 1.3 ng/mL, Hidrocortisona 0.4 µg/mL (Todos de Sigma) y Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) 10 ng/mL (Austral Biologicals).

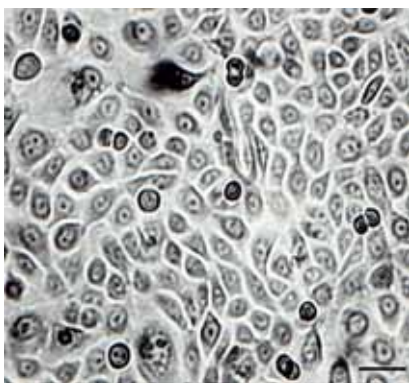


Fig 1: microfotografía representativa de monocapa de queratinocitos cultivados en los medios comerciales KGM o SFM. *n* = 59. Barra de calibración = 100 μ m.



Fig 2: población celular con características fenotípicas semejantes a melanocitos en el cultivo primario. Células con prolongaciones citoplasmáticas cuya morfología es compatible con melanocitos, amplificación 10X (a) y 40X (b). En círculo se observa una célula con proyecciones dendríticas sobre una monocapa de queratinocitos (c). *n* = 50. Barra de calibración = 100 μ m.



Fig 3: crecimiento de queratinocitos en la capa alimentadora de fibroblastos 3T3 Swiss-albino. La microfotografía (a) corresponde a un cultivo de queratinocitos en el primer día de siembra. A los cuatro días post-siembra se observaron colonias de queratinocitos con crecimiento excéntrico (b). Entre los días 7-11 se observó una monocapa de queratinocitos con una confluencia del 100% (c). *n* = 14.

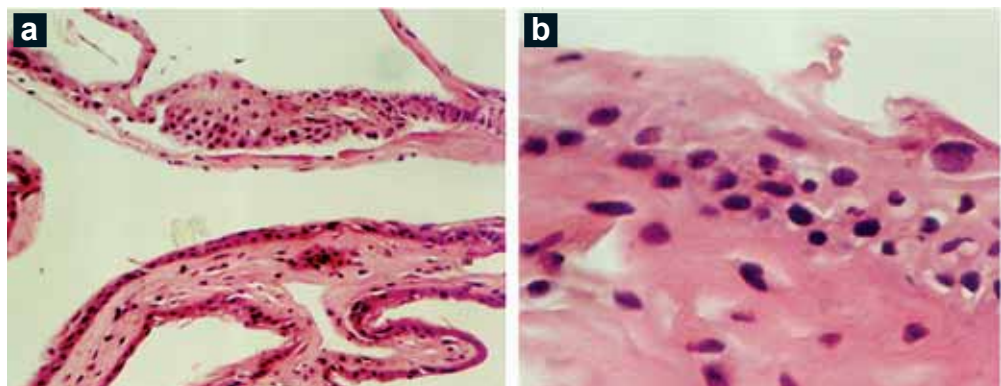


Fig 4: microfotografía de la apariencia histológica del sustituto cutáneo. La tinción con Hematoxilina-Eosina demostró un epitelio parcialmente estratificado. Amplificación 10 X (a) y 40 X (b). *n* = 14.

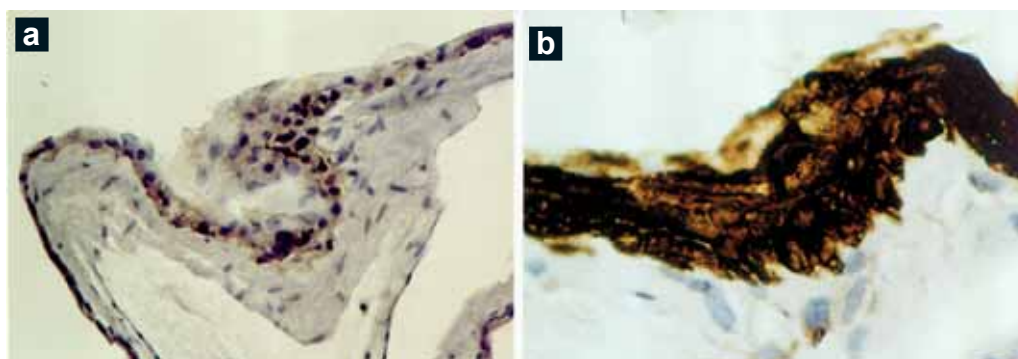


Fig 5: inmunohistoquímica del grupo de Citoqueratinas AE1/AE3 detectadas en el sustituto cutáneo. Se observan células positivas para los marcadores utilizados, que muestran un epitelio queratinizado con estratificación parcial. Amplificación 10 X (a). Formación de crestas epidérmicas sobre el estroma colagenizado de los fibroblastos, amplificación 40 X (b). $n = 14$.

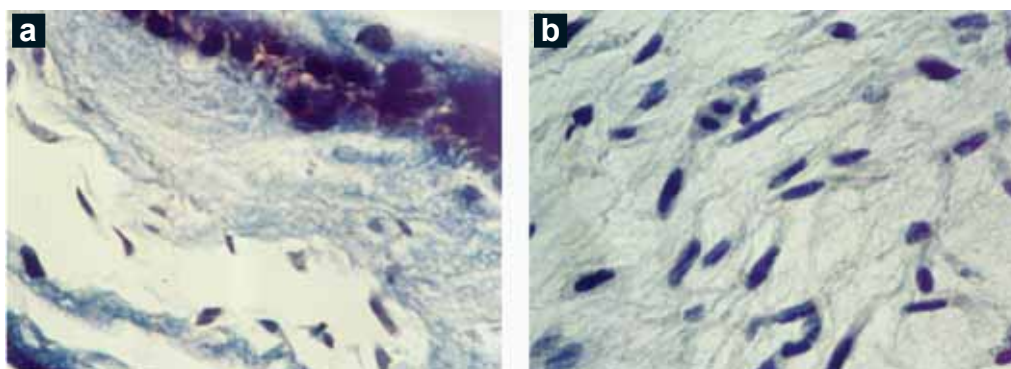


Fig 6: tinción de Tricrómico de Masson. Matriz dérmica que sintetiza fibras de colágeno de diámetro variable y distribuidas en distintas direcciones (a). Presencia de fibroblastos fusiformes que adquieren una coloración azul oscura, de aspecto normal, inmersos en el tejido colágeno laxo (b). $n = 14$

Cultivo primario de fibroblastos humanos

Se tomaron 7×10^6 de células obtenidas del procesamiento de la biopsia y se sembraron en frascos de 75 cm^2 (Falcon) con medio DMEM, SBF 10%, Penicilina 100 U/mL, Estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y L-glutamina 2 mM.

Preparación del equivalente cutáneo

Cultivo secundario de queratinocitos sobre dermis artificial de plasma y fibroblastos

Los queratinocitos que crecieron en la capa alimentadora de fibroblastos 3T3 fueron tratados con T/E cuando llegaron al 100% de confluencia, para ser utilizados en el cultivo secundario sobre la dermis artificial de plasma y fibroblastos.

El equivalente dérmico se realizó con plasma AB obtenido de banco de sangre; se midió la concentración de fibrinógeno disuelto con un método comercial cualitativo, turbimétrico (Panferjev). Sólo se utilizó en los experimentos plasma con una concentración entre 4-9 mg/mL de fibrinógeno.

El gel de plasma y fibroblastos se preparó con los siguientes componentes: 5 mL de plasma, 1 mL de suspensión de fibroblastos humanos el cual contenía $6-7.5 \times 10^4$ células, que correspondían a 800-1000 fibroblastos/ cm^2 . Se utilizó como agente coagulante 1 mL de CaCl_2 (Sigma) al 1% y como agente antifibrinolítico 100 μL de ácido tranexámico (Amcha Fibrin 500 mg FIDES-ROTTAPHARM S.A); el volumen final (15 mL) se completó con 8 mL de solución salina fisiológica. Se dejó en la

incubadora a 37°C, 5% de CO₂ durante dos horas para su gelificación. Se adicionaron 10 mL de medio para queratinocitos y 24 horas más tarde, se sembraron los queratinocitos obtenidos a partir del cultivo primario confluyente, obteniendo así la superficie de cultivo deseada. El seguimiento de los cultivos se realizó mediante observación visual en un microscopio invertido (Leitz).

Pruebas histológicas en el equivalente cutáneo

Cuando el cultivo secundario de los queratinocitos llegó a confluencia, se separó la lámina de la base del frasco de cultivo para realizar los estudios histológicos.

La estructura histológica del cultivo de queratinocitos sobre el gel de plasma y fibroblastos, se determinó a los 14 días de iniciado el cultivo, tomando 2 cm² de la lámina. Se fijó con formaldehído al 10%, se incluyó en parafina. Se realizaron cortes histológicos para tinción con Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson. Se utilizó el marcador celular CD68 dirigido contra macrófagos y los anticuerpos monoclonales AE1 (DAKO), que reconoce queratinas de la subfamilia ácida (56.5, 50, 50', 48 y 40 KD) y AE3 (DAKO), que reacciona con queratinas básicas (65-67, 64, 59, 58, 56 y 52 KD). Las tinciones e inmunohistoquímica se realizaron de acuerdo con los protocolos establecidos en el laboratorio de Patología de la Universidad de Antioquia.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Chi Cuadrado de independencia, para la comparación del porcentaje de cultivos primarios entre las metodologías de cultivo estandarizadas. El análisis de datos se realizó con el programa Epi-Info 6.04, y valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Obtención de células epiteliales

Del total de 86 muestras procesadas para la obtención de células epiteliales (queratinocitos), 15 correspondían a donantes de órganos (17%) con una eficiencia en la obtención de cultivos primarios de 20%. Debido a este

bajo rendimiento, se trabajó posteriormente con 71 muestras de sobrantes de procedimientos quirúrgicos (83%). En este grupo se logró un mayor éxito en la obtención de cultivos primarios de queratinocitos; un 65% a partir de las muestras provenientes de donantes menores de 40 años y un 33% de pacientes con edades superiores (Tabla I).

Cultivos primarios de queratinocitos

Los cultivos de queratinocitos en los medios comerciales KGM o SFM formaron monocapas. Se obtuvieron cultivos confluentes (frascos de 25 cm²) entre los 9-13 días de iniciado el cultivo, cuando las células provenían de donantes menores de 40 años, mientras que los de donantes mayores presentaron confluencia entre los 21-23 días de iniciado el cultivo.

El sistema de cultivo en ausencia de capa alimentadora, permitió obtener monocapas de queratinocitos (Fig 1), pero este sistema no fue útil en la elaboración del equivalente cutáneo, ya que no permitió la expansión óptima de los cultivos y su grado de estratificación fue limitado. Sin embargo, permitió la modificación genética de los queratinocitos mediante un vector retroviral¹⁸.

Bajo estas condiciones de cultivo se observaron células con prolongaciones dendríticas, morfología compatible con melanocitos (Fig 2); sin embargo esta población disminuyó con el tiempo de cultivo (9-13 días).

Con la segunda metodología de cultivo en la que se emplearon los fibroblastos 3T3 Swiss-albino como capa alimentadora, se logró un mayor porcentaje en la obtención de cultivos primarios, una mayor expansión celular (frascos de 75 cm²) en un tiempo más corto de 7 a 11 días, presentándose una diferencia estadísticamente significativa ($\chi = 6.25$; 1 gl; $p = 0.0124$) entre el porcentaje de los cultivos obtenidos a partir de circuncisiones mayores de 40 años, en el sistema de medio libre de suero KGM o SFM Vs capa alimentadora 3T3 Swiss albino, mientras que los cultivos de las circuncisiones de donantes menores de 40 años crecidos en medio libre de suero Vs capa alimentadora, no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($\chi = 2.16$; 1 gl; $p = 0.144$), al igual que los cultivos en medio libre de suero de circuncisiones

TABLA I

**CULTIVOS PRIMARIOS GENERADOS
A PARTIR DE LAS MUESTRAS PROCESADAS.**

| TIPO DE MUESTRA | TOTAL | PORCENTAJE DE OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS |
|---------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------|
| Donante de órganos | 15 muestras | 20% |
| Circuncisiones donantes menores de 40 años | 55 muestras | 65% |
| Circuncisiones donantes mayores de 40 años | 11 muestras | 33% |
| Sobrantes de procedimientos quirúrgicos diferentes a circuncisiones | 5 muestras | 60% |

TABLA II

**COMPARACIÓN DE LAS DOS METODOLOGÍAS DE CULTIVO ESTANDARIZADAS
PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS PRIMARIOS DE QUERATINOCITOS.**

| TIPO DE CULTIVO | TIPO MUESTRA | NÚMERO DE MUESTRAS PROCESADAS | PORCENTAJE CULTIVOS PRIMARIOS | TAMAÑO FRASCO DE CULTIVO | DÍAS DE CONFLUENCIA |
|------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|
| Medio libre suero (KGM o SFM) | Circuncisiones donantes menores de 40 años | 55 | 65 | 25 cm ² | 9-13 |
| Medio libre suero (KGM o SFM) | Circuncisiones donantes mayores de 40 años | 11 | 33 | 25 cm ² | 21-23 |
| Capa alimentadora 3T3 Swiss-albino | Circuncisiones donantes menores de 40 años | 14 | 86 | 75 cm ² | 7-11 |

mayores de 40 años Vs cultivos en medio libre de suero de circuncisiones menores de 40 años ($\chi = 3.25$; 1 gl; $p = 0.074$) (Tabla II).

Con este sistema se cultivaron 14 muestras provenientes de donantes menores de 40 años (Tabla II). En el 86% de las muestras, se observó que los queratinocitos formaban pequeñas colonias con crecimiento excéntrico, desplazando a las células 3T3 hasta llegar al 100% de confluencia, aproximadamente entre el día 7-11 de iniciado el cultivo (Fig 3).

Estudios histológicos

La tinción con Hematoxilina-Eosina realizada al equivalente cutáneo basado en plasma y fibroblastos, demostró una piel artificial

con un epitelio estratificado parcialmente diferenciado. No se observó diferenciación completa del estrato córneo, a pesar de prolongar los días de cultivo (Fig 4).

Se observó que los queratinocitos estaban restringidos a la superficie externa del gel, mientras que los fibroblastos permanecían dentro del mismo (Fig 4a). Se evidenció que el equivalente es un material compuesto que semeja y mantiene las características de la piel normal, observándose que el borde entre la epidermis y la dermis es irregular, a causa de las papilas dérmicas cónicas que se proyectan hacia arriba (Fig 4a). A su vez, se pudo apreciar la unión dermo-epidérmica, en la que las células de la capa basal se disponen en

forma empalizada formando una sola hoja o capa; las células son cilíndricas y se ubican con su eje mayor perpendicular a la línea dermo-epidérmica (Fig 4b).

En el equivalente cutáneo se observó que la división celular predominó en la capa basal, de forma similar a lo que ocurre en la epidermis humana (Fig 4b).

La inmunohistoquímica para citoqueratinas humanas (AE1/AE3), evidenció que las células que crecieron sobre el equivalente dérmico correspondían a queratinocitos (Fig 5).

La positividad de los marcadores del grupo de citoqueratinas DAKO AE1/AE3 observada en el equivalente cutáneo, confirmó que el cultivo obtenido correspondió a un epitelio queratinizado, con un grado de estratificación parcial (Fig 4). A su vez, en este corte histológico se logró apreciar de forma más notable, la formación de crestas epidérmicas sobre el estroma colagenizado de los fibroblastos (Fig 4b).

La tinción Tricrómica de Masson confirmó que el plasma y los fibroblastos del equivalente cutáneo semejan a una matriz dérmica, en la que se sintetizan componentes biológicos como son las fibras de colágeno (Fig 6). Se observaron fibras de diámetro muy variable dispuestas como una trama delicada o en haces gruesos. La red sutil de fibras de colágeno se pudo observar localizada en la dermis papilar, las fibras se extendieron en distintas direcciones con un trayecto horizontal (Fig 6a). Se observó la presencia de fibroblastos fusiformes de aspecto normal, inmersos en el tejido colágeno laxo y actividad metabólica y síntesis de colágeno demostrada por la coloración azul oscura (Fig 6b). Estos hallazgos demuestran la gran diferenciación estructural de este equivalente cutáneo de plasma y fibroblastos.

DISCUSIÓN

En las dos últimas décadas, los extraordinarios avances en la biología celular y molecular han permitido el entendimiento de los procesos biológicos básicos, involucrados en la cicatrización¹⁹. Lo anterior ha llevado a la experimentación y producción de nuevos

equivalentes cutáneos con compuestos, que semejan la piel para el tratamiento y reparación de las lesiones, procurando una cicatrización más estética y funcional²⁰. A pesar de las diferentes condiciones establecidas para el cultivo y proliferación de los queratinocitos humanos, es necesario contar con una fuente idónea de tejido para la obtención exitosa de células epiteliales. Las muestras de donantes de órganos son una fuente potencial de queratinocitos, pero es probable que las condiciones de estrés bajo las cuales son mantenidos los donantes y el exceso de tejido graso de las muestras que hace difícil su manipulación, lleven a baja calidad de las células, limitándose así la obtención de cultivos primarios exitosos; a diferencia de otro tipo de muestras como los sobrantes de procedimientos quirúrgicos (circuncisiones, mamoplastias y rinoplastias). Otro factor determinante para lograr cultivos primarios exitosos y en corto tiempo, es la edad del paciente de quien proviene la muestra. En este estudio se logró una mayor obtención de cultivos primarios, con muestras procedentes de donantes menores de 40 años, que coincide con lo reportado en la literatura, en donde se plantea que la eficiencia en la formación de colonias de los queratinocitos derivados de biopsias de donantes mayores de 40 años, es muy baja y la obtención de cultivos primarios a partir de estas células es menos exitosa²¹. Este hecho se ha atribuido a los procesos de acortamiento de los telómeros, que ocurre en cada una de las duplicaciones celulares en cultivo y que finalmente conduce a la detención del ciclo celular^{22,23}.

Con el sistema de cultivo basado en medios comerciales libres de suero (KGM o SFM), se obtuvieron monocapas de queratinocitos y crecimiento de células cuya morfología es compatible con melanocitos y que además estaban en contacto con los queratinocitos (Fig 2c). Esta característica ha sido demostrada en cultivos celulares^{24,25} y está relacionada con el mecanismo utilizado normalmente por los melanocitos, para transferir los melanosomas a los queratinocitos epidérmicos²⁶. Sin embargo, este sistema de cultivo no permitió obtener monocapas para realizar cultivos secundarios en equivalentes cutáneos, ya que el gra-

do de expansión celular y de diferenciación morfológica de los queratinocitos, cuando crecen bajo estas condiciones es más limitado. Por otro lado, el sistema de cultivo en el que crecen los queratinocitos sobre una capa alimentadora de células embrionarias de fibroblastos murinos 3T3-Swiss albino irradiados, permitió obtener monocapas de cultivo primario que llegaron a una densidad clonal alta, debido a los factores de crecimiento que proporciona. A su vez, inhibió el desarrollo de los fibroblastos humanos provenientes de la dermis y presentes en el cultivo, seleccionando solo el crecimiento de las células de origen epitelial^{11,27,28}. De esta manera fue posible obtener cultivos primarios de queratinocitos confluentes entre los 7-11 días. Aunque este sistema de crecimiento en capa alimentadora da una mayor diferenciación de los queratinocitos, se ha buscado lograr una mayor estratificación de los mismos mediante sustratos que semejen la dermis, que pueden estar basados en matrices sintéticas o biológicas como el colágeno, proteoglicanos o fibrina²⁹. Estos sustratos dérmicos pueden contener o no un componente celular como los fibroblastos.

El equivalente cutáneo que se estableció en este trabajo, consiste en una lámina de plasma, fibroblastos y queratinocitos, que comparado con otros cultivos tradicionales presenta las siguientes ventajas: fácil monitoreo en el crecimiento de los queratinocitos y fibroblastos, rápida expansión y fácil manipulación (las láminas son desadheridas manualmente de la superficie del frasco de cultivo), conservando tanto la continuidad de la capa de queratinocitos como la integridad de su capa basal. No ocurre pérdida de la superficie, como se presenta cuando las capas de epitelio son desadheridas por acción enzimática con dispasa II³⁰ o por contracción de la lámina, como ocurre cuando se utilizan matrices dérmicas a base de colágeno, proteoglicanos como el condroitin sulfato y silicona³¹. La presencia de fibroblastos humanos en el equivalente cutáneo permite la diferenciación, expansión y rápido crecimiento clonal de los queratinocitos. En esta lámina de plasma y fibroblastos el cultivo de queratinocitos semejó funcional, estructural y morfológicamente a la piel humana, como fue

demostrado por los estudios histológicos realizados. Se evidenció que se desarrolla un epitelio con un grado de estratificación similar al normal, aunque no se logra una diferenciación completa del estrato córneo. Se demostró un proceso de queratinización que comienza en la capa basal de la epidermis y a partir de ahí, se multiplica en su ascenso hacia la capa córnea. La finalidad de este proceso de queratinización de las células epidérmicas, es formar queratinas que se expresan de forma diferente de un estrato a otro. Es muy probable que con este sistema, se logre conservar las células basales que poseen alta capacidad de proliferación, puesto que en los múltiples subcultivos se conserva la capacidad proliferativa de los queratinocitos y la generación de nuevas monocapas.

Las fibras de colágeno, cuya función básica es el soporte, es uno de los elementos que se encuentra con mayor frecuencia en el tejido conjuntivo y fue otro de los componentes presentes en el equivalente. Se demostró su síntesis por los fibroblastos, componente celular fundamental en la parte dérmica del equivalente cutáneo estandarizado.

Se ha demostrado que en condiciones fisiológicas los fibroblastos dérmicos sintetizan fibras reticulares y elásticas^{29,32}. Es muy probable que en el sistema de cultivo establecido, estas proteínas también hayan sido sintetizadas, como ocurre en otros equivalentes cutáneos semejantes^{32,33}.

La ausencia del marcador de macrófagos CD68 en el equivalente, es una de sus principales ventajas, puesto que lo hace poco inmunogénico al no contar con células profesionales para la presentación de antígenos. Lo anterior es de gran utilidad para su empleo como injertos alogénicos⁵.

Diversos grupos han logrado una aplicación clínica exitosa de equivalentes cutáneos, para el tratamiento de diferentes patologías en humanos^{34,35,36}. El efecto de los equivalentes cutáneos en el lugar de la lesión se atribuye a sus componentes, que normalmente están involucrados en el proceso de reparación del tejido, como la producción y regulación de las proteínas de la matriz extracelular y la síntesis de factores de crecimiento^{17,37,38}, que tienen influencia activa sobre la migración,

proliferación, diferenciación y adherencia de las células epiteliales, contribuyendo significativamente a la regeneración celular.

La utilidad de estos equivalentes no solo se enfoca al uso clínico, sino también a su utilización en modelos animales, para la investigación básica en áreas prometedoras como la terapia génica, que busca la modificación genética de estas células, con factores de crecimiento para potenciar aún más la eficiencia en la reparación del tejido³⁹⁻⁴². En biofarmacéutica, como sistemas de evaluación de efectos tóxicos e irritantes de productos cosméticos⁴³ o como modelos para estudios de farmacotoxicología⁴⁴⁻⁴⁶. Con el sistema de cultivo estandarizado, se logró la obtención de un equivalente cutáneo con características morfológicas e histológicas semejantes a la piel normal, que además, produce los componentes estructurales necesarios para cumplir un papel fisiológico. De ahí que se pueda sugerir como una terapia alternativa para defectos cutáneos. Para el sistema de salud en Colombia representaría no solo los beneficios por la recuperación de los pacientes, sino además la reducción en los costos hospitalarios.

RESUMEN

Los injertos de piel cultivados *in vitro* han sido utilizados tanto en la regeneración de tejidos de áreas cruentas de la piel (úlceras crónicas y quemaduras de diversos grados), como para el tratamiento de genodermatosis. En nuestro medio existe un alto índice de pacientes con úlceras crónicas y un total de 2319 pacientes quemados, en un período de 10 años. El tratamiento convencional de estos pacientes genera estadías de hospitalización prolongadas y costos hospitalarios muy elevados. En este trabajo se establecieron las condiciones para el cultivo y expansión de queratinocitos y fibroblastos humanos, con el propósito de generar un equivalente cutáneo. A su vez, se evaluaron sus características histológicas con el objeto de ofrecer otras opciones de tratamiento. Las células se obtuvieron a partir de piel proveniente de donantes de órganos y de sobrantes de procedimientos quirúrgicos. Se logró un mayor éxito en la obtención de cultivos primarios, con muestras

provenientes de donantes menores de 40 años (65%), comparado con los obtenidos de mayores (33%). En el equivalente cutáneo producido con estas células se demostró que los queratinocitos y los fibroblastos, presentan características funcionales, estructurales y morfológicas semejantes a la piel intacta. El equivalente cutáneo además de conservar las características funcionales y estructurales de la piel intacta, presenta otras ventajas en términos de costos, manipulación y estabilidad frente a otros productos similares importados.

PALABRAS CLAVE

Equivalente cutáneo, queratinocitos, fibroblastos, cultivo celular, medicina regenerativa.

AGRADECIMIENTOS

Al Comité para el desarrollo de proyectos de investigación de la Universidad de Antioquia (CODI), por su aporte económico para la financiación del proyecto. Al Doctor Álvaro Meana Infiesta por sus enseñanzas y por el suministro de las células 3T3 Swiss albino. A Daniel Camilo Aguirre por el análisis estadístico.

REFERENCIAS

- 1) Inoue H, Oshima H, Matsuzaki K y Kumagai N. Application for regenerative medicine of epithelial cell culture-vistas of cultured epithelium. *Congenit Anom (Kyoto)* 2006; 46 (3): 129-134.
- 2) Jensen TG. Cutaneous gene therapy. *Ann Med* 2007; 39 (2): 108-115.
- 3) Bello YM, Falabella AF y Eaglstein WH. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2 (5): 305-313.
- 4) Muhart M, McFalls S, Kirsner R, Kerdel F y Eaglstein WH. Bioengineered skin. *Lancet* 1997; 350 (9085): 1142.
- 5) Matouskova E, Broz L, Stolbova V, Klein L, Konigova R y Vesely P. Human allogeneic keratinocytes cultured on acellular xenodermis: the use in healing of burns

- and other skin defects. *Biomed Mater Eng* 2006; 16 (4): S63-S71.
- 6) Gallico GG, III, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O y Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311 (7): 448-451.
 - 7) Hu S, Kirsner RS, Falanga V, Phillips T y Eaglstein WH. Evaluation of Apligraf persistence and basement membrane restoration in donor site wounds: a pilot study. *Wound Repair Regen* 2006; 14 (4): 427-433.
 - 8) Johnsen S, Ermuth T, Tanczos E y col. Treatment of therapy-refractive ulcera cruris of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant. *Vasa* 2005; 34 (1): 25-29.
 - 9) Kirsner RS, Fastenau J, Falabella A, Valencia I, Long R y Eaglstein WH. Clinical and economic outcomes with graftskin for hard-to-heal venous leg ulcers: a single-center experience. *Dermatol Surg* 2002; 28 (1): 81-82.
 - 10) Falabella AF, Schachner LA, Valencia IC y Eaglstein WH. The use of tissue-engineered skin (Apligraf) to treat a newborn with epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol* 1999; 135 (10): 1219-1222.
 - 11) Rheinwald JG y Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6 (3): 331-343.
 - 12) Compton CC, Hickerson W, Nadire K y Press W. Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. *J Burn Care Rehabil* 1993; 14 (6): 653-662.
 - 13) Breitskreutz D, Mirancea N y Nischt R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol* 2009; 132 (1): 1-10.
 - 14) Butler CE, Orgill DP, Yannas IV y Compton CC. Effect of keratinocyte seeding of collagen-glycosaminoglycan membranes on the regeneration of skin in a porcine model. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101 (6): 1572-1579.
 - 15) Butler CE, Yannas IV, Compton CC, Correia CA y Orgill DP. Comparison of cultured and uncultured keratinocytes seeded into a collagen-GAG matrix for skin replacements. *Br J Plast Surg* 1999; 52 (2): 127-132.
 - 16) El Ghalbzouri A, Commandeur S, Rietveld MH, Mulder AA y Willemze R. Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products. *Biomaterials* 2008.
 - 17) Meana A, Iglesias J, Del Rio M y col. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 1998; 24 (7): 621-630.
 - 18) Arango M, Chamorro C, Cohen-Haguenauer O, Rojas M y Restrepo LM. Human skin keratinocytes modified by a Friend-derived retroviral vector: a functional approach. *Dermatol Online J* 2005; 11 (2): 2.
 - 19) Wang JF, Olson ME, Reno CR, Wright JB y Hart DA. The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process. *Comp Med* 2001; 51 (4): 341-348.
 - 20) Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J y Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* 2005; 9 (3): 592-608.
 - 21) Gilchrist BA. In vitro assessment of keratinocyte aging. *J Invest Dermatol* 1983; 81 (1): 184s-189s.
 - 22) Jeyapalan JC y Sedivy JM. Cellular senescence and organismal aging. *Mech Ageing Dev* 2008; 129 (7-8): 467-474.
 - 23) Martin GM, Sprague CA y Epstein CJ. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest* 1970; 23 (1): 86-92.
 - 24) Nakazawa K, Kalassy M, Sahuc F, Collombel C y Damour O. Pigmented human skin equivalent—as a model of the mechanisms of control of cell-cell and cell-matrix interactions. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36 (6): 813-820.
 - 25) Compton CC, Warland G y Kratz G. Melanocytes in cultured epithelial grafts are depleted with serial subcultivation and cryopreservation: implications for clinical outcome. *J Burn Care Rehabil* 1998; 19 (4): 330-336.

- 26) Limat A, Salomon D, Carraux P, Saurat JH y Hunziker T. Human melanocytes grown in epidermal equivalents transfer their melanin to follicular outer root sheath keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1999; 291 (6): 325-332.
- 27) Rheinwald JG y Green H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* 1975; 6 (3): 317-330.
- 28) Rheinwald JG. Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods Cell Biol* 1980; 21A: 229-254.
- 29) Black AF, Bouez C, Perrier E, Schlotmann K, Chapuis F y Damour O. Optimization and characterization of an engineered human skin equivalent. *Tissue Eng* 2005; 11 (5-6): 723-733.
- 30) Horch RE, Debus M, Wagner G y Stark GB. Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tissue Eng* 2000; 6 (1): 53-67.
- 31) Ho G, Barbenel J y Grant MH. Effect of low-level laser treatment of tissue-engineered skin substitutes: contraction of collagen lattices. *J Biomed Opt* 2009; 14 (3): 034002.
- 32) Casasco M, Casasco A, Icaro CA, Farina A y Calligaro A. Differential distribution of elastic tissue in human natural skin and tissue-engineered skin. *J Mol Histol* 2004; 35 (4): 421-428.
- 33) Escobar-Franco M, Henao J, Wolff M, Estrada S y Restrepo L. Tratamiento de las úlceras crónicas en los miembros inferiores con un equivalente cutáneo autólogo y desbridación con larvas de *Lucilia* sp. (Diptera: Calliphoridae). Reporte de un caso. *Iatreia* 2007; 20 (4): 397-406.
- 34) Siwy BK y Compton CC. Cultured epidermis: Indiana University Medical Center's experience. *J Burn Care Rehabil* 1992; 13 (1): 130-137.
- 35) Eaglstein WH, Iriondo M y Laszlo K. A composite skin substitute (graftskin) for surgical wounds. A clinical experience. *Dermatol Surg* 1995; 21 (10): 839-843.
- 36) Herson CA, Dawson RA, Freedlander E y col. Clinical experience using cultured epithelial autografts leads to an alternative methodology for transferring skin cells from the laboratory to the patient. *Regen Med* 2006; 1 (6): 809-821.
- 37) Llamas SG, Del Rio M, Larcher F y col. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004; 77 (3): 350-355.
- 38) Llamas S, Garcia E, Garcia V y col. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank* 2006; 7 (1): 47-53.
- 39) Rio MD, Larcher F, Meana A, Segovia J, Alvarez A y Jorcano J. Nonviral transfer of genes to pig primary keratinocytes. Induction of angiogenesis by composite grafts of modified keratinocytes overexpressing VEGF driven by a keratin promoter. *Gene Ther* 1999; 6 (10): 1734-1741.
- 40) Larcher F, Del Rio M, Serrano F y col. A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine *ob/ob* phenotype using leptin-targeted keratinocyte grafts. *FASEB J* 2001; 15 (9): 1529-1538.
- 41) Escamez MJ, Garcia M, Larcher F y col. An in vivo model of wound healing in genetically modified skin-humanized mice. *J Invest Dermatol* 2004; 123 (6): 1182-1191.
- 42) Del Río M, Larcher F, Serrano F y col. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Genet Ther* 2002; 13 (8): 959-968.
- 43) Faller C, Bracher M, Dami N y Roguet R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol In Vitro* 2002; 16 (5): 557-572.
- 44) Frei V, Perrier E, Orly I, Huc A, Augustin C y Damour O. Activation of fibroblast metabolism in a dermal and skin equivalent model: a screening test for activity of peptides. *Int J Cosmet Sci* 1998; 20 (3): 159-173.
- 45) Damour O, Augustin C y Black AF. Applications of reconstructed skin models in pharmaco-toxicological trials. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36 (6): 825-832.
- 46) Roguet R. The use of standardized human skin models for cutaneous pharmacotoxicology studies. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15 (1): 1-3.