

Revista trimestral

# TECNOLOGÍA

*en marcha*

ISSN 0379-3982 Edición especial Ingeniería de Tejidos

## Contenido

Cultivo de células de piel humana sobre un soporte polimérico artificial y un soporte acelular derivado de vejiga porcina

Culture of human skin cells on both artificial polymeric and porcine-urinary-bladder-derived acellular scaffolds

*Alejandro Astúa, Alicia Lorenti*.....5

Irradiación subletal de fibroblastos murinos 3T3 con rayos X para su utilización como capa celular alimentadora

X-ray subletal irradiation of murine 3T3 fibroblasts for feeder-layer

*Andrea Ramírez-Telléz, Carolina Centeno-Cerdas, Mario A. Conejo-Solís, Laura A. Calvo-Castro* ..... 15

Cultivo *in vitro* de células de piel canina para su aplicación en tratamientos veterinarios

Culture of canine epithelial cells for veterinarian therapy

*Irene Gómez-Murillo, Maritza Guerrero-Barrantes, Laura A. Calvo-Castro, Carolina Centeno-Cerdas, Miguel Rojas-Chaves* .....27

Cultivo *in vitro* de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel

*In vitro* culture of epithelial autografts for treating skin ailments

*Laura A. Calvo-Castro, Maritza Guerrero-Barrantes, Carolina Centeno-Cerdas, María Inés Chaves-Rodríguez, Nefertiti Chaves-Solano, Miguel Rojas-Chaves* .....33

Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos

Skin grafts and substitutes developed by Tissue Engineering

*María Inés Chaves-Rodríguez, Laura A. Calvo-Castro, Ricardo Alvarado-Meza, Olman Madrigal-Monge, Andrea Ulloa-Fernández, Carolina Centeno-Cerdas..... 46*

Membranas de colágeno y quitosano de fuentes alternativas: evaluación para su uso potencial en ingeniería de tejidos

Collagen and chitosan membranes from alternative sources: evaluation of their potential for Tissue Engineering applications

*Silvia E. Castro-Piedra, Laura A. Calvo-Castro, Silvana Alvarenga-Venutolo, Carolina Centeno-Cerdas, Maikol Ramos-Madrigal, José Vega-Baudrit, Vanessa Zamora-Mora, Miguel Rojas-Chaves..... 58*

Evaluación de técnicas de procesamiento y almacenamiento de piel cadavérica para bancos de tejidos

Evaluation of skin procurement and storage techniques for Tissue Banking

*Laura A. Calvo-Castro, Maritza Guerrero-Barrantes, Andrea Ulloa-Fernández, Rafael Portuguez-Barboza, Carolina Centeno-Cerdas, Miguel Rojas Chaves ..... 69*

## Presentación

La Ingeniería de Tejidos consiste en la reconstrucción de la estructura tridimensional y funcional de órganos y tejidos, utilizando materiales naturales o sintéticos. De forma general, las estrategias desarrolladas por Ingeniería de Tejidos involucran dos ejes centrales: la obtención y reproducción de la población de células nativas en el tejido original y la recreación del andamio de soporte en el cual se encuentran naturalmente embebidas estas células.

En las últimas cuatro décadas, el cultivo de células animales ha evolucionado desde simplemente mantener las células en cultivo *in vitro*, hasta alcanzar la capacidad de modificar con detalle su bioquímica e incluso de recrear estructuras histológicas funcionales *in vitro*. Estos avances no sólo representan el potencial desarrollo de prometedoras aplicaciones clínicas, sino que también proveen modelos de estudio que permiten conocer más a profundidad la morfología, estructura, bioquímica, función e interacciones de múltiples tipos celulares en diferentes estados de desarrollo, bajo diferentes condiciones y ante múltiples variables, por lo que las opciones de estudio son casi vastas.

Los biomateriales a su vez, tanto naturales como sintéticos, juegan un papel crucial en las estrategias actuales de reemplazo y restauración de tejidos, debido a que proveen de las condiciones físicas y bioquímicas necesarias para dirigir el comportamiento y desarrollo celular. Además, los biomateriales aportan propiedades mecánicas que los habilitan como dispositivos temporales o permanentes para la aplicación de células, ya sean de origen autólogo (del mismo paciente), heterólogo (de un donador), o incluso xenoinjertos (de origen animal). Debido a lo anterior, la posibilidad de diseñar o manipular los biomateriales, principalmente hidrogeles, ha generado nuevas oportunidades ante los desafíos de la Ingeniería de Tejidos y la práctica clínica para inducir regeneración y, con ello, restaurar la función de órganos y tejidos.

Las estructuras reconstruidas mediante Ingeniería de Tejidos ofrecen soluciones innovadoras para el tratamiento de numerosos padecimientos que aún carecen de opciones terapéuticas satisfactorias, con alternativas costo-efectivas y que, a diferencia de los tratamientos tradicionales, permiten la regeneración real de las lesiones, logrando el restablecimiento de la funcionalidad del tejido u órgano afectado. La presente edición de Tecnología en Marcha está dedicada a la Ingeniería de Tejidos de piel humana, el primer tejido humano en ser exitosamente cultivado *in vitro* y, aún más relevante, el primer tejido humano en ser trasladado con éxito a la práctica clínica. Además, los modelos de cultivos celulares epiteliales están siendo cada vez más utilizados en diversos campos de investigación que incluyen farmacología, toxicología, biología celular y nutrición, entre otros. El empleo de estos modelos en dichos campos ha permitido validar resultados obtenidos *in vitro*, facilitando el paso a la investigación en modelos animales o incluso a la práctica clínica humana.

Consciente de la importancia y potencial de la Ingeniería de Tejidos para la medicina actual, el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB, adscrito a la Escuela de Biología) del Tecnológico de Costa Rica (TEC) se ha avocado al desarrollo e implementación de diferentes tecnologías dentro de la “BioIngeniería” como una alternativa novedosa y efectiva para mejorar

la calidad de vida de las personas, poniendo particular atención al cultivo de células de piel humana. La serie de proyectos de investigación relacionados al cultivo de células de piel en el TEC nació en el año 2004, gracias a la iniciativa de un grupo de investigadores de la Escuela de Biología, con el apoyo del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), y de médicos del Hospital Nacional de Niños, el Hospital San Juan de Dios y el Hospital México. Este grupo multidisciplinario no sólo logró el establecimiento del primer laboratorio dedicado a la Ingeniería de Tejidos en Centroamérica y el Caribe, sino que también promovió el desarrollo de la Biomedicina como una prominente área de investigación en el TEC.

A la fecha, se han realizado 10 proyectos de investigación en el CIB relacionados con el cultivo y producción *in vitro* de piel humana, la cual ha sido trasladada con gran éxito a la práctica clínica en Costa Rica. Estos estudios también han explorado el uso de biomateriales como base para el cultivo de células epiteliales, y se han desarrollado modelos celulares y tisulares para evaluar las propiedades bioactivas de diversos compuestos naturales de origen vegetal con fines medicinales. Además, el TEC apoyó el establecimiento de Bancos de Tejidos en Costa Rica, en el marco de un proyecto regional Latinoamericano. Por otro lado, a partir del trabajo de este grupo de investigación del CIB, se firmaron convenios con centros médicos públicos y privados para garantizar el acceso de los pacientes a la terapia celular que permite el tratamiento de lesiones en la piel. A su vez, se han impartido talleres y charlas con participación de expertos internacionales; se habilitaron laboratorios altamente especializados para investigación y docencia; y se ha permitido la capacitación de nuevos profesionales en el área de Bioingeniería. Adicionalmente, se gestó la creación del Programa de Investigación en Bioingeniería adscrito a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC, con el fin de promover aún más el desarrollo científico y tecnológico interdisciplinario en el país, con el beneficio directo para la sociedad.

Alusivo a todo lo anterior, y en conmemoración del cumplimiento de una década del inicio de esta travesía llena de desafíos técnicos, administrativos y económicos, presentamos este número especial, que recopila algunos de los aportes más importantes que ha hecho mediante su labor investigativa este grupo de trabajo del CIB, que se ha denominado “Laboratorio de Ingeniería de Tejidos y Biología Celular”, orgullosamente pionero de la Ingeniería de Tejidos y Terapia Celular en Centroamérica, y fuertes colaboradores de la bioprospección en el país gracias al apoyo de la Vicerrectoría de investigación y Extensión del TEC, al OIEA y otros socios estratégicos.

Laboratorio de Ingeniería de Tejidos y Biología Celular

Centro de Investigación en Biotecnología

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Dr. Miguel Rojas Chaves, Ph.D.

Ing. M.Sc. Laura A. Calvo Castro

Ing. M.Sc. Carolina Centeno Cerdas

M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes

M.Sc. Silvana Alvarenga Venutolo

Ing. Silvia E. Castro Piedra

Ing. María Inés Chaves Rodríguez

Ing. Andrea Ulloa Fernández

# Cultivo de células de piel humana sobre un soporte polimérico artificial y un soporte acelular derivado de vejiga porcina

Culture of human skin cells on both artificial polymeric and porcine-urinary-bladder-derived acellular scaffolds

Alejandro Astúa<sup>1</sup> , Alicia Lorenti<sup>2</sup>

---

*Fecha de recepción: 11 de febrero del 2014*

*Fecha de aprobación: 3 de mayo del 2014*

Astúa, A; Lorenti, A. Cultivo de células de piel humana sobre un soporte polimérico artificial y un soporte acelular derivado de vejiga porcina. *Tecnología en Marcha*. Edición especial Ingeniería de Tejidos. Pág 5-14.

1 Costarricense. Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. (506) 2550-2474. [aaastua@outlook.com](mailto:aaastua@outlook.com).

2 Ph.D, TBS. Unidad de Traducción Clínica, Hospital Universitario Austral, Buenos Aires, Argentina. Teléfono: (+54 911) 4444 4010. Correo electrónico: [alicia.lorenti@gmail.com](mailto:alicia.lorenti@gmail.com).

## Palabras clave

Queratinocitos; fibroblastos; soporte termosensible; membrana acelular; diferenciación.

## Resumen

La ingeniería de tejidos aplicada a lesiones de la piel propone constantemente métodos innovadores con el propósito de mejorar la calidad de vida de las personas con estas patologías. El objetivo de este estudio fue cultivar fibroblastos y queratinocitos humanos sobre soportes artificiales poliméricos termosensibles y membranas acelulares derivadas de vejiga porcina. Se establecieron cultivos primarios y subcultivos y, subsecuentemente, se obtuvieron epidermis diferenciadas y estratificadas a partir de queratinocitos que crecieron en cocultivo con una capa alimentadora (*feeder layer*) de fibroblastos dérmicos humanos. Mediante microscopía óptica, se efectuaron observaciones relacionadas con el crecimiento y la diferenciación de ambos tipos celulares. Se encontró que las células epiteliales cultivadas sobre soportes termosensibles produjeron láminas epidérmicas bastante semejantes a una epidermis natural, mientras que la membrana acelular derivada de vejiga porcina resultó menos exitosa para el desarrollo de queratinocitos.

## Keywords

Keratinocytes; fibroblasts; thermosensitive scaffold; acellular membrane; differentiation.

## Abstract

Innovative methods are constantly proposed by tissue engineering in order to improve the quality of life of people affected by skin injuries. The aim of this study was the *in vitro* culture of human fibroblasts and keratinocytes on both artificial polymeric thermosensitive and porcine-urinary-bladder-derived acellular scaffolds. Primary cultures and subcultures were established and, subsequently, differentiated and stratified epidermises were obtained from keratinocytes co-cultured with a human dermal fibroblast *feeder layer*. Observations on both structure and differentiation of keratinocytes and fibroblasts were performed by optical microscopy. It was observed that epithelial cells cultivated on thermosensitive scaffolds were able to produce epidermal sheets similar to normal epidermis, whereas keratinocyte development was less successful on the porcine-urinary-bladder-derived acellular membrane.

## Introducción

Una de las ramas de la investigación en ingeniería de tejidos consiste en la búsqueda, caracterización y análisis de la interacción que presentan los cultivos celulares con distintos biomateriales, los cuales funcionan como guía o soporte para una adecuada adhesión, migración, crecimiento y desarrollo de los sustitutos tisulares que se desean producir (Hutmacher, 2000).

Estos biomateriales pueden estar compuestos por una o varias sustancias, naturales o sintéticas. Comenzaron a utilizarse a inicios del siglo XX, cuando se usaron placas metálicas para insertarlas en huesos rotos o fracturados (Johnen et al., 2008). Después de la segunda guerra mundial, y a raíz de las investigaciones en Química, se disponía de novedosos polímeros, algunos de ellos empleados actualmente como biomateriales (Castro, 2009).

Las células de los tejidos suelen presentar un alto grado de organización y una interacción considerable con su matriz extracelular. Si un biomaterial permitiese que ambas circunstancias

se recreasen en condiciones in vitro, entonces el resultado serían células que forman tejidos complejos y bastante parecidos a los naturales. De esta forma, el soporte o andamio tiene como función primaria ofrecer un espacio tridimensional de configuración para las células (Ohashi et al., 2007).

Un soporte ideal para el cultivo celular debe contener poros que aumenten el área de exposición y contacto con las células, permitiendo la migración celular. Además, debe presentar una composición y estructura que facilite la adhesión de las células para que ocurran los procesos de su proliferación y diferenciación. Otras propiedades de trascendencia a considerar son: la capacidad de promover o permitir eventuales procesos de vascularización, una nula toxicidad y reactividad con otros tejidos, una tasa de degradación que ocurra conforme se da la regeneración del tejido sustituto (en el caso de materiales biodegradables), una disposición que permita el crecimiento de células según la estructura tridimensional original, propiedades biomecánicas similares a las del sitio original en donde se ubicaría el tejido y, finalmente, que su utilización sea económicamente viable (Ikada, 2006).

De esta forma, se pretende que los biomateriales actuales constituyan elementos que guíen a las células que contienen para modelar y restituir un tejido específico. Algunos biomateriales pueden ser permanentes, principalmente en casos en que su remoción comprometa nuevamente la integridad y funcionalidad del tejido repuesto (Ohashi et al., 2007).

### Matrices termosensibles

Uno de los aportes más importantes que ha puesto a disposición la ingeniería de materiales son los novedosos compuestos químicos que varían estructuralmente en función de las condiciones físicas a las que sean sometidos. Tal es el caso del polímero poli(N-isopropilacrilamida) – conocido como PIPAAm– cuya estructura se modifica en función de la temperatura. A 37 °C, el PIPAAm es ligeramente hidrofóbico, permitiendo a las células adherirse a su superficie y crecer normalmente. Sin embargo, al disminuir la temperatura por debajo de los 32 °C, el polímero se hidrata, ocasionando la liberación espontánea de las células en forma de una lámina uniforme e íntegra. Dado que el polímero se encuentra covalentemente inmovilizado a la placa de cultivo, el PIPAAm se mantiene unido luego de haber recolectado las láminas de células (Ohashi et al., 2007).

El uso de estas matrices termosensibles ha permitido la obtención de láminas tisulares íntegras, en donde las células mantienen las uniones que establecen entre sí y conservan la matriz extracelular, dado que no se emplean enzimas proteolíticas ni se ejecutan procesos mecánicos para la recolección de los tejidos. Además, al obtener láminas con estas características, es posible el diseño de tejidos tridimensionales sin recurrir a andamios entrelazados en las células (Harimoto et al., 2002; Kanzaki et al., 2006; Ohashi et al., 2007).

### Membranas acelulares

Las membranas acelulares son membranas obtenidas de diversos tejidos, que son expuestas a varios procesos para la eliminación completa de sus células. Estas membranas biológicas presentan dos caras: por un lado, la membrana basal de aspecto brillante y cuya superficie permite la adhesión de células epiteliales y endoteliales; la cara opuesta, de apariencia opaca, es una túnica propia, constituida por tejido conectivo. Esta área es ideal para el contacto con el lecho de la lesión (Freytes, Stoner y Badylak, 2008).

Desde el punto de vista morfológico, las membranas acelulares poseen una serie de proteínas estructurales y funcionales organizadas tridimensionalmente. Están constituidas primordialmente

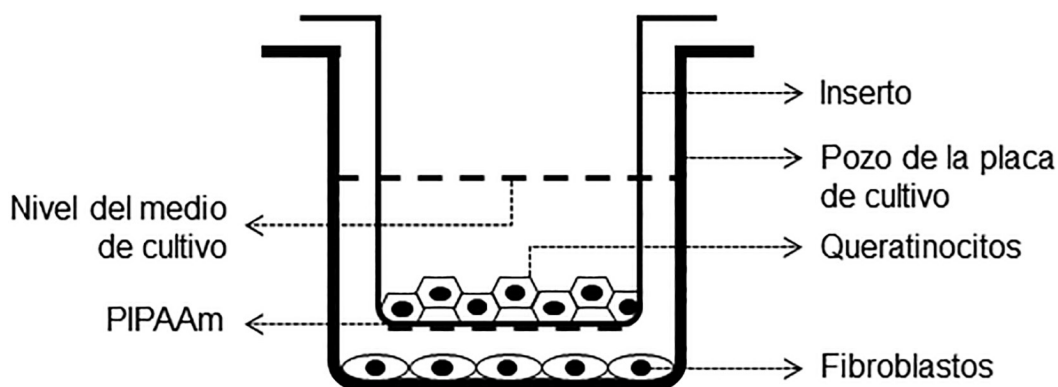
por proteínas propias de la matriz extracelular de la dermis, es decir, colágeno tipo I, II, III, IV y VI, glucosaminoglicanos, sulfato de heparina, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, fibronectina, lamininas y factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , PDGF, FGF- $\beta$  y VEGF (Brown, Lindberg, Reing, Stolz y Badylak, 2006). Mecánicamente, son membranas muy fuertes, de fácil manipulación, capaces de atravesar suturas y actuar contra agentes bacterianos.

Ante la necesidad de brindar una mejor calidad de vida a aquellas personas con afecciones severas en la piel, el presente estudio se llevó a cabo con el fin de identificar la influencia de dos tipos de andamios en la creación de tejidos in vitro de epitelio humano.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Unidad de Traducción Clínica del Hospital Universitario Austral en Buenos Aires, Argentina. Se establecieron cultivos primarios y subcultivos de queratinocitos y fibroblastos humanos a partir de muestras de piel del área de la cara, la espalda o el abdomen y, para ello, se aplicó la metodología establecida por Lorenti (2009). Las células se cultivaron a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y en un ambiente de alta humedad. El medio de cultivo para los queratinocitos (Epilife® Cascade Biologics, EE. UU.) se suplementó con rh-EGF y extracto de pituitaria bovina, pero sin suero fetal bovino (SFB). Los fibroblastos se cultivaron en el medio DMEM, con SFB, penicilina, estreptomycinina y L-glutamina.

Para los ensayos de cultivo sobre un soporte artificial termosensible (UpCell, Japón) se emplearon placas multipozo, sobre las cuales se colocaron insertos que contenían en su base el polímero PIPAAm (figura 1). Sobre esta superficie se sembraron queratinocitos provenientes tanto de aislamientos primarios como de subcultivos. En la superficie de la placa multipozo (la cual no tiene contacto físico con el inserto), se sembró una capa alimentadora constituida por fibroblastos humanos; en algunas muestras no se hizo el cocultivo y se emplearon como control. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que las aplicadas para el establecimiento de los cultivos primarios y subcultivos de queratinocitos y fibroblastos.



**Figura 1.** Modelo experimental empleado para el cultivo celular sobre un soporte artificial termosensible. Se puede apreciar la separación física entre los fibroblastos y los queratinocitos, así como la ubicación de la membrana polimérica artificial.

Finalmente, para los ensayos de cultivo sobre membranas acelulares (ACell, EE. UU.) se sembraron, de forma separada, queratinocitos y fibroblastos provenientes tanto de aislamientos primarios como de subcultivos. Los queratinocitos se colocaron sobre la lámina basal y los

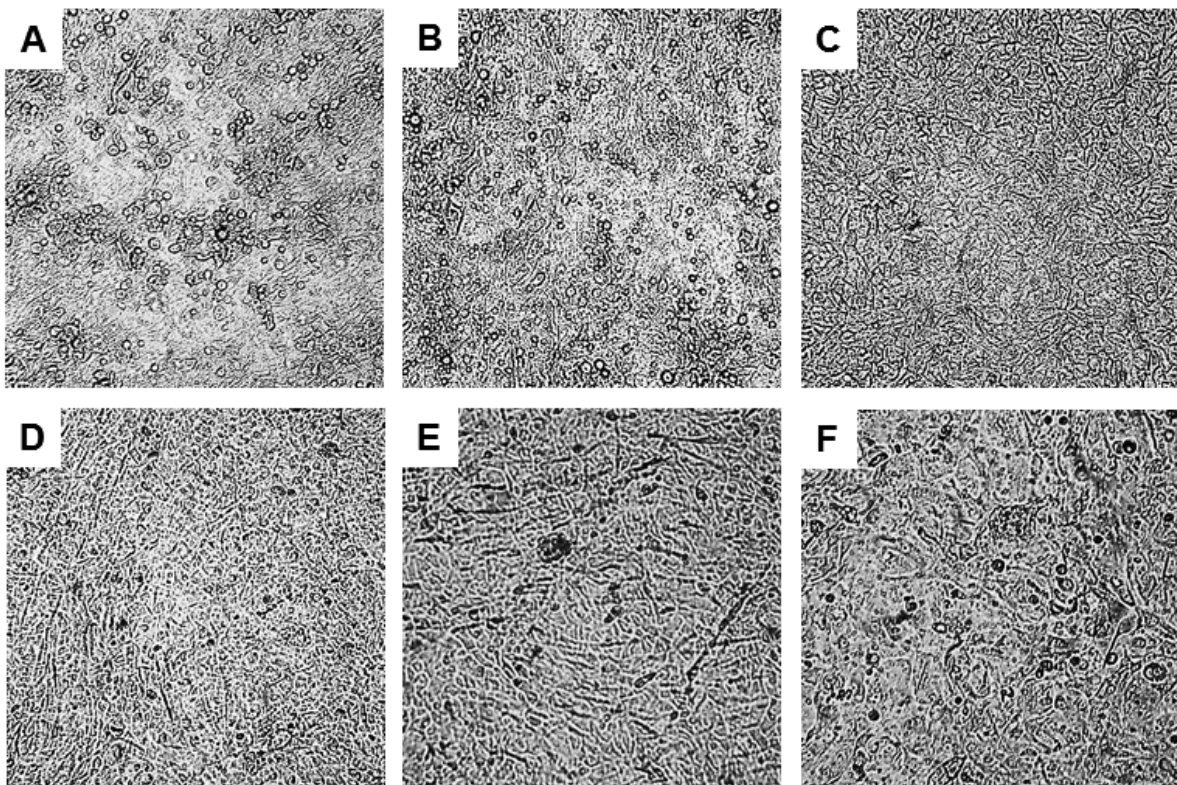


fibroblastos sobre la túnica propia. Además, se realizó un cultivo organotípico, para lo cual se sembraron fibroblastos sobre la túnica propia durante quince días, y luego se inocularon queratinocitos sobre la lámina basal de esta misma membrana durante siete días más. Las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas para los otros ensayos.

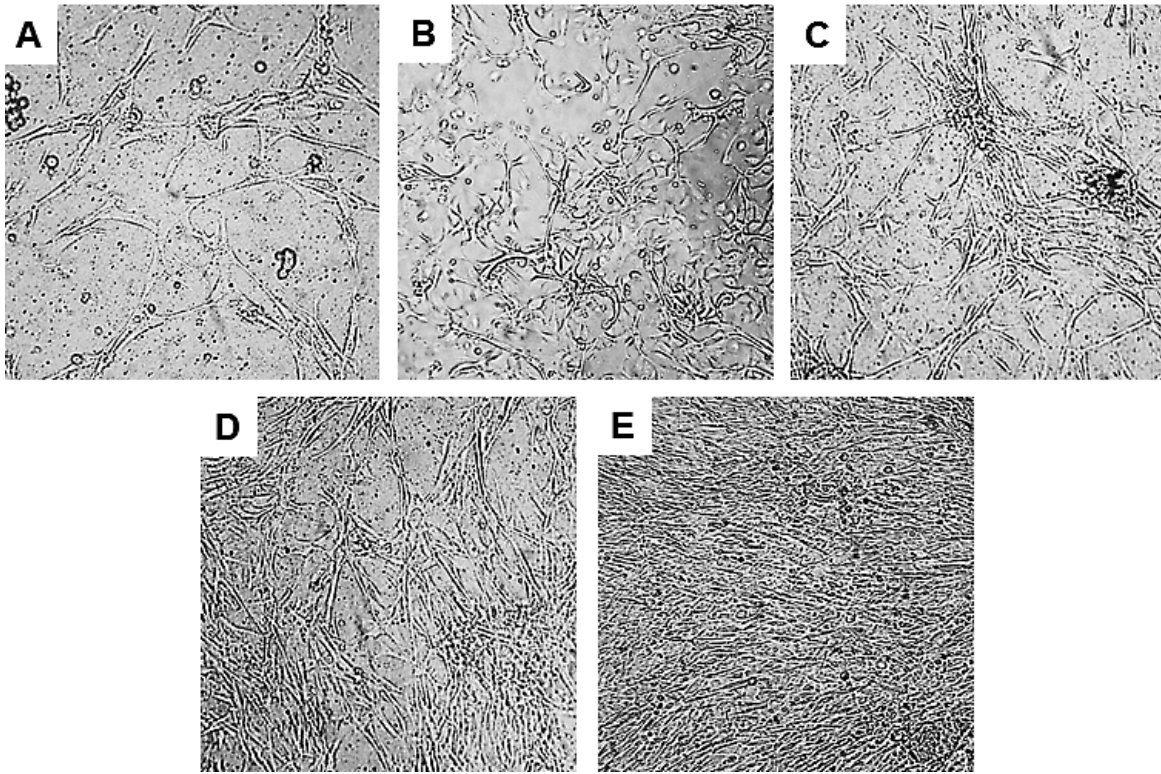
## Resultados

### Desarrollo de un epitelio sobre un soporte artificial termosensible.

Se utilizaron queratinocitos humanos cultivados con y sin capa alimentadora. En el cultivo con capa alimentadora, las células comenzaron a anclarse a la placa a partir del segundo día de siembra y presentaron una morfología típica de células epiteliales. Posteriormente, cerca del día 10, las células cambiaron hasta presentar una morfología poligonal, característica de las células epiteliales en diferenciación, estimuladas por la alta confluencia. Al día 12 dio inicio la estratificación y para el día 21 el epitelio in vitro fue desprendido mediante la disminución de la temperatura (figura 2). De forma general, el cultivo presentó características normales, aunque se observó proliferación y diferenciación irregular en algunas zonas, con conjuntos de células aglomeradas y desprendimiento y retracción de fragmentos del epitelio en áreas confluentes. Por otro lado, en los cultivos de queratinocitos sin capa alimentadora, sus células presentaron una morfología estrellada y alargada, de tipo fibroblastoide, a partir del tercer día y hasta el final del tiempo de incubación (figura 3).

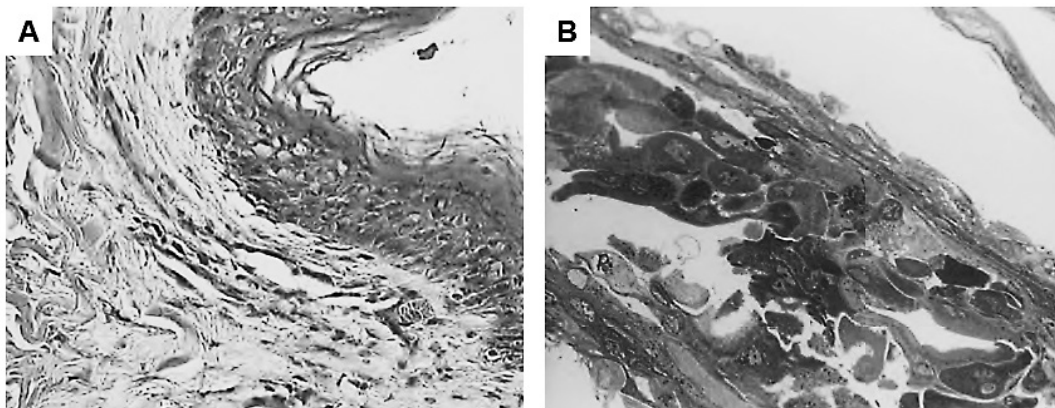


**Figura 2.** Cultivo de queratinocitos con capa alimentadora sobre un soporte artificial termosensible (PIPAAm). Se muestran las células a los 6 (A), 9 (B), 12 (C), 15 (D), 18 (E) y 21 (F) días de incubación. Nótese la morfología poligonal típica de las células epiteliales, así como la formación de un epitelio estratificado a partir del día 12.



**Figura 3.** Cultivo de queratinocitos sin capa alimentadora sobre un soporte artificial termosensible (PIPAAm). Se muestran las células a los 3 (A), 6 (B), 9 (C), 12 (D) y 15 (E) días de incubación. Se observa una predominancia de células de morfología alargada y estrellada tipo fibroblastoide.

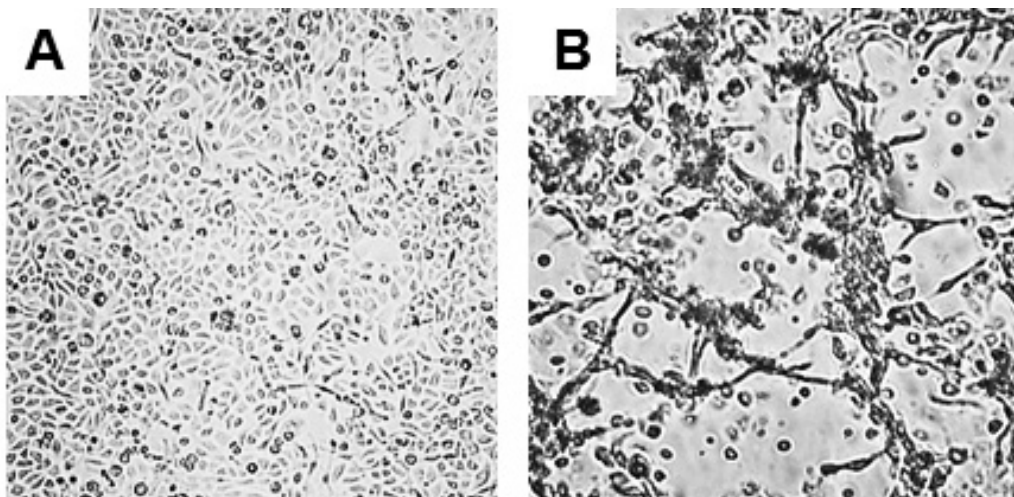
Los epitelios obtenidos de los cultivos en el soporte termosensible presentaron una morfología similar a la epidermis de una piel normal (figura 4), donde fue posible observar una hilera de células de tamaño grande, de forma esférica y con un núcleo grande, posiblemente correspondientes al estrato basal. Asimismo, se visualizaron, en promedio, de tres a cuatro capas de células con formas más alargadas y de tamaño reducido y, finalmente, se observó una capa superior donde hubo excreción de queratina, posiblemente análoga al estrato córneo.



**Figura 4.** Tinción con hematoxilina-eosina de una muestra de piel normal (A, 400x) y una muestra de epitelio cultivado sobre el soporte artificial termosensible (PIPAAm) (B, 800x).

### Desarrollo de un epitelio sobre una membrana acelular

La membrana acelular derivada de vejiga porcina sembrada con queratinocitos mostró que estos se desarrollaron sobre la lámina basal de la membrana hasta alcanzar una alta confluencia a los nueve días de incubación, presentando una morfología epitelioide o poligonal (figura 5A). Además, en el cultivo organotípico, en el cual se sembraron los queratinocitos sobre la lámina basal de una membrana acelular previamente inoculada con fibroblastos (sobre la túnica propia) con 15 días de antelación, el crecimiento de los queratinocitos no presentó una confluencia mayor al 80% y la morfología celular no fue la usual, sino que se formaron aglomerados (figura 5B).



**Figura 5.** Cultivo de queratinocitos sobre una membrana acelular derivada de vejiga porcina. Se muestran las células cultivadas en ausencia de fibroblastos (A) y en cultivo organotípico (B). En este último, los fibroblastos se cultivaron sobre el lado opuesto de la membrana 15 días antes de agregar los queratinocitos.

## Discusión

### Desarrollo de un epitelio sobre un soporte artificial termosensible

Los queratinocitos son células dependientes de anclaje, lo que conlleva la necesidad de establecer una conexión con el soporte sobre el que potencialmente proliferarán. No todas las superficies son adecuadas para establecer esta interacción *in vitro*, dado que no siempre pueden generarse hemidesmosomas, que son los responsables del anclaje (Nerem, 1991).

La adhesión celular fue exitosa (aunque limitada) en ambos tipos de soportes evaluados; sin embargo, se observó mayor sobrevivencia y proliferación de los queratinocitos cultivados sobre el soporte polimérico artificial (figura 2) en comparación con la matriz acelular porcina (figura 5). Además, se obtuvieron mejores resultados cuando se utilizó capa alimentadora con respecto a los experimentos en los cuales los queratinocitos se cultivaron solos (figuras 2 y 3).

En este sentido, el polímero empleado (PIPAAm) no solo tiene la particularidad de ser termosensible, sino que también es semipermeable (Ohashi et al., 2007), permitiendo el intercambio de sustancias en el recipiente de cultivo celular. Así, aunque los fibroblastos de la capa alimentadora se encuentran físicamente separados de los queratinocitos (figuras 1),

sin contacto directo entre ambos tipos celulares, los primeros aportan sustancias al medio de cultivo que podrían haber favorecido la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de los queratinocitos, así como la formación de un epitelio estratificado. Este resultado está en concordancia con la interacción demostrada en numerosos trabajos científicos (Rheinwald y Green, 1975; Arvelo, Pérez y Cotte, 2004; Arvelo, 2007 y Arango, Chamorro, Restrepo, Correa y Henao, 2009)

Además, la separación física entre los dos tipos celulares permite a los queratinocitos proliferar sin ser afectados por el crecimiento de los fibroblastos, lo cual normalmente ocurre cuando se cultivan ambos tipos celulares en conjunto. Esto implica que no es necesario tratar física ni químicamente las células que componen la capa alimentadora para controlar su proliferación. Por ello, se pueden utilizar fibroblastos autólogos, evitándose el uso de células genéticamente transformadas, usualmente provenientes de animales, como es el caso de los fibroblastos murinos 3T3, que son las que habitualmente se usan para preparar la capa alimentadora.

Los resultados obtenidos en el ensayo testigo (figura 3) avalan estas observaciones, ya que se demostró que la ausencia de capa alimentadora derivó en la obtención de cultivos celulares menos confluentes y con una morfología fibroblastoide. Estas células podrían ser queratinocitos anormales o bien fibroblastos que permanecieron en estado quiescente al realizar el aislamiento primario y que, a causa del cambio de las condiciones al trasladar el cultivo a la membrana termosensible, hayan proliferado y anulado el desarrollo de los queratinocitos. En suma, estos resultados sugieren que, para el cultivo de células sobre el soporte artificial termosensible utilizado (PIPAAm), es necesario el uso de una capa alimentadora a fin de lograr buen anclaje inicial y el desarrollo y posterior estratificación de los queratinocitos. Esto sustenta la noción de que un óptimo desarrollo de los queratinocitos in vitro está basado en una combinación cruzada de tres factores: tipo de superficie, medio de cultivo y la presencia de una capa alimentadora.

Por otro lado, los cultivos celulares realizados sobre el soporte artificial termosensible (PIPAAm) que llegaron hasta los 21 días de incubación presentaron un buen desprendimiento; es decir, no fue necesario el uso de métodos mecánicos ni enzimáticos para desprender el tejido del frasco de cultivo. Esto podría prevenir daños a la integridad del epitelio, protegiendo especialmente las interconexiones entre las células y la matriz extracelular.

También se observó que, a partir del día 24 de siembra, la lámina inicia un proceso de autodesprendimiento. No es ideal que esto ocurra, puesto que la separación puede darse de forma dispareja, llegando a afectar la integridad de la membrana, lo que dificultaría la manipulación y aplicación del tejido en los pacientes. Debido a esto, se sugiere que el tiempo de cultivo y la decisión del momento del desprendimiento de las láminas deben ser estimados y programados para evitar que el tejido se separe espontáneamente.

### Desarrollo de un epitelio sobre una membrana acelular derivada de vejiga porcina

El empleo de una membrana acelular al efectuar cultivos de tejido epidérmico podría facilitar su manipulación, e incluso permitir el desarrollo de láminas de cultivo organotípico, donde tanto queratinocitos como fibroblastos podrían ser aplicados al paciente en una organización semejante a la que existe en la piel normalmente.

En el presente trabajo, los queratinocitos primarios cultivados independientemente sobre la membrana (en ausencia de fibroblastos) tuvieron un crecimiento normal, aunque no se observó un proceso de diferenciación evidente (figura 4A). De igual forma, el desarrollo de un cultivo organotípico empleando la membrana acelular como soporte demostró que, aunque se alcanzó la confluencia, tampoco hubo diferenciación observable de los queratinocitos. En suma, en ninguno de los ensayos en los que se utilizó la matriz acelular se logró alcanzar el desarrollo de un epitelio estratificado exitoso. No obstante, esto no necesariamente es desfavorable, dado

que los queratinocitos podrían completar su desarrollo y estratificación in vivo. Aun cuando un cultivo organotípico pueda demorar tiempo en desarrollarse, el hecho de que la membrana contenga tanto queratinocitos como fibroblastos, incluso cultivados diacrónicamente, muestra que este tipo de cultivos puede ser muy útil para fines terapéuticos, sobre todo cuando el tiempo es un factor determinante en la recuperación del paciente.

## Conclusiones

El éxito de los cultivos celulares en el inserto polimérico termosensible fue determinado por la presencia de una capa alimentadora (*feeder layer*), evidenciando la importancia de las interacciones paracrina célula-célula necesarias para que los queratinocitos se desarrollen. Por su parte, la membrana acelular derivada de vejiga porcina no resultó tan exitosa para el desarrollo de queratinocitos; sin embargo, se requerirá continuar en el desarrollo de cultivos organotípicos exitosos que permitan reproducir más exactamente la estructura natural de la piel.

## Agradecimientos

Los autores desean constatar su agradecimiento al Ministerio de Ciencia y Tecnología y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica, así como a la Vicerrectoría de Vida Estudiantil y Servicios Académicos del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Asimismo, al personal en general del Hospital Universitario Austral y del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

## Bibliografía

- Arango, C., Chamorro, I., Restrepo, L., Correa, L. & Henao, J. (2009). Características histológicas de piel cultivada *in vitro*. *Rev. Argentina de Dermatología*, 90(4), 190-200.
- Arvelo, F., Pérez, P. & Cotte, C. (2004). Obtención de láminas de piel humana mediante ingeniería de tejidos. *ACV*, 55(1), 74-82.
- Arvelo, F. (2007). Ingeniería de tejidos y producción de piel humana *in vitro*. *Investigación Clínica*, 48(3), 367-375.
- Brown, B., Lindberg, K., Reing, J., Stolz, D. & Badylak, S. (2006). *The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix*. *Tissue Engineering*, 12(3), 519-522.
- Castro, S. (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*. Tesina para optar al título de bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Freytes, D., Stoner, R. & Badylak, S. (2008). Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 84(2), 408-414.
- Harimoto, M., Yamato, M., Hirose, M., Takahashi, C., Isoi, Y., Kikuchi, A. & Okano, T. (2002). Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62, 464-470.
- Hutmacher, D. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), 2529-2535.
- Ikada, Y. (2006). *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*. Ámsterdam: Elsevier.
- Johnen, C., Steffen, I., Bräutigam, K., Witascheck, T., Toman, N., Moser, V., Ottomann, C., Hartmann, B. & Gerlach, J. (2008). Culture of subconfluent human fibroblasts and keratinocytes using biodegradable transfer membranes. *Burns*, 34(5), 655-663.
- Kanzaki, M., Yamato, M., Hatakeyama, H., Kohno, C., Yang, J., Umemoto, T., Kikuchi, A., Okano, T. & Onuki, T. (2006). Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea. *Tissue Engineering*, 12, 1275-1283.

- Lorenti, A. (2009). *Protocolo para el establecimiento de cultivos primarios y subcultivos de queratinocitos y fibroblastos humanos*. Unidad de Traducción Clínica, Hospital Universitario Austral. Buenos Aires.
- Nerem, R. (1991). Cellular Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 19, 529-545.
- Ohashi, K., Yokoyama, T., Yamato, M., Kuge, H., Kanehiro, H., Tsutsumi, M., Amanuma, T., Iwata, H., Yang, J., Okano, T. & Nakajima, Y. (2007). Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nature Medicine*, 13, 880-885.
- Rheinwald, J. & Green, H. (1975). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from teratoma. *Cell*, 6, 317-330.

# Irradiación subletal de fibroblastos murinos 3T3 con rayos X para su utilización como capa celular alimentadora

## X-ray subletal irradiation of murine 3T3 fibroblasts for feeder-layer

Andrea Ramírez-Téllez<sup>1</sup>, Carolina Centeno-Cerdas<sup>2</sup>, Mario A. Conejo-Solís<sup>3</sup>, Laura A. Calvo-Castro<sup>4</sup>

---

*Fecha de recepción: 11 de febrero del 2014*  
*Fecha de aprobación: 18 de mayo del 2014*

Ramírez-Telléz, A; Centeno-Cerdas, C; Conejo-Solís, M; Calvo-Castro, L. A. Irradiación subletal de fibroblastos murinos 3T3 con rayos X para su utilización como capa celular alimentadora. *Tecnología en Marcha*. Edición especial Ingeniería de Tejidos. Pág 15-26.

- 1 Ingeniera en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: andrert89@hotmail.com.
- 2 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Ciencias Biomédicas. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ccenteno@itcr.ac.cr.
- 3 Ingeniero Metalúrgico. Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-2213. Correo electrónico: mconejo@itcr.ac.cr.
- 4 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Microbiología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9027. Correo electrónico: ancalvo@itcr.ac.cr.

## Palabras clave

Capa alimentadora; rayos X; queratinocitos; MTT; migración celular.

## Resumen

Los queratinocitos, las principales células de la epidermis, requieren una capa alimentadora de células viables mitóticamente inactivadas para su supervivencia y proliferación *in vitro*. Para la producción de capas alimentadoras a partir de fibroblastos murinos 3T3, se evaluaron cuatro dosis de radiación con rayos X. Los efectos de las dosis se evaluaron mediante recuentos celulares y determinación de la viabilidad (MTT), adhesión (eficiencia de plating) y migración celular (*scratch wound healing*). Además, se encontraron evidencias que sugieren el arresto mitótico mediante una tinción nuclear (GIEMSA). Se observó que una dosis de radiación correspondiente a 80 Gy generó daños suficientes en la línea celular para causar el arresto mitótico, manteniendo a la vez la actividad metabólica basal durante 25 días.

## Keywords

Feeder-layer; X-rays; keratinocytes; MTT; cell migration.

## Abstract

Keratinocytes, the main cells of the epidermis, require mitotically inactive but live feeder-layer cells for their survival and proliferation. We evaluated four X-ray irradiation doses on 3T3 murine fibroblasts for feeder-layer production. Each dose effect was evaluated by cell counting and cellular viability determination (MTT), cell adhesion (plating efficiency) and cell migration (*scratch wound healing*). Mitotic arrest was suggested by nuclear staining (GIEMSA). We determined that an 80 Gy X-ray dose generated enough cell damage to cause mitotic arrest yet keeping metabolically active cells up to 25 days.

## Introducción

Durante los últimos cinco años, el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) se ha dedicado a la implementación, establecimiento y optimización de protocolos y estrategias para el cultivo *in vitro* de células de la piel con fines terapéuticos. Mediante técnicas de ingeniería de tejidos es posible reconstruir *in vitro* epitelios autólogos o alogénicos para tratar lesiones y afecciones en la piel.

Los queratinocitos son las principales células constituyentes de la epidermis, la capa más externa de la piel. El cultivo *in vitro* de estas células ha permitido la formación de epitelio estratificado y queratinizado para utilizarlo con fines terapéuticos en quemaduras y úlceras crónicas (Arango, Chamorro, Restrepo, Correa y Henao, 2009; Gil, 2011), campo en el que más de 30 años de experiencias clínicas a nivel internacional han demostrado resultados satisfactorios (Atiyeh y Costagliola, 2007).

Sin embargo, los queratinocitos presentan gran dificultad para crecer *in vitro*, ya que carecen de la producción de una serie de sustancias necesarias para su adhesión y proliferación (Arango *et al.*, 2009 y Gil, 2011). Se ha demostrado que el desarrollo *in vivo* de las células epiteliales depende de complejas interacciones y diferentes estímulos procedentes de los fibroblastos (Arvelo, 2007), que son las principales células constituyentes de la dermis. Los fibroblastos



participan activamente en la formación de la matriz extracelular, que es fundamental para el crecimiento de los queratinocitos (Arango *et al.*, 2009). En suma, en ausencia del componente dérmico, los queratinocitos presentan deficiente organización, proliferación, expansión, diferenciación y síntesis de proteínas de la unión dermoepidérmica (membrana o lámina basal) (Arango *et al.*, 2009 e Ikada, 2006).

Para solucionar esta situación, los queratinocitos aislados del tejido se inoculan sobre una capa de células alimentadoras (como, por ejemplo, de líneas celulares murinas tales como 3T3-J2 o 3T3-152), cuya mitosis ha sido inhibida por radiación u otros métodos. Sin embargo, estas células mantienen su actividad metabólica, produciendo los factores de crecimiento requeridos por los queratinocitos. Así, la función de esta capa alimentadora es actuar como una matriz mesenquimal *in vitro* (Atiyeh y Costagliola, 2007).

Las células vivas de la capa alimentadora (*feeder layer*) tienen la capacidad de promover la adhesión, crecimiento y diferenciación *in vitro* de las células epiteliales, secretan factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular e inhiben el sobrecrecimiento de los fibroblastos dérmicos (Arvelo, Pérez y Cotte, 2004; Freshney, 2010; De Diego *et al.*, 2006; Arvelo, 2007; Castro, 2009 y Arango *et al.*, 2009).

La preparación de capas de células alimentadoras puede realizarse a partir de cultivos celulares subconfluentes mediante irradiación con rayos X o rayos  $\gamma$  a diferentes dosis. De manera alternativa, se pueden aplicar tratamientos químicos con mitomicina C (100 $\mu$ g/L) (Freshney, 2010). Ambos métodos generan células no proliferativas, mitóticamente inactivadas, que se mantienen viables hasta por tres semanas con su actividad metabólica inalterada (Castro, 2009 y Freshney, 2010). Aunque la irradiación causa un descenso en el número de células funcionales, éstas pueden seguir sintetizando moléculas específicas (Jessop y Hay, 1979).

Debido a que el ITCR no cuenta con instalaciones de irradiación gamma, se implementó un protocolo para la producción de capas alimentadoras mediante rayos X con un generador de rayos X (TOSHIBA, EX 250G) de la Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales de la institución.

## Materiales y métodos

### Condiciones generales de cultivo

Como materia prima para la preparación de las capas alimentadoras, se utilizó la línea celular de fibroblastos murinos 3T3-Swiss albino (ATCC, CCL-92), a partir de pasaje 10. Se utilizó el medio de cultivo DMEM (4,5 g/L glucosa, GIBCO) suplementado con 7-10% de SFB (SIGMA), 2% glutamina (4mM, GIBCO), 1% penicilina-estreptomicina (10 000 u/ml penicilina G, 10 000  $\mu$ g/ml de sulfato de estreptomicina; GIBCO) y 1% piruvato de sodio (0.11mg/ml, SIGMA), con un pH final de 7,5-7,7. Las células se mantuvieron en frascos de cultivo celular con un área de superficie de 25 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup>, en un ambiente al 5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C y alta humedad. Se realizaron cambios de medio de cultivo cada 2-4 días, dependiendo de la confluencia. Los subcultivos se realizaron al alcanzar 70-90% de confluencia, mediante el método enzimático con tripsina 0,05% y EDTA 0,02% (Freshney, 2010).

### Establecimiento de la dosis de rayos X

Las células se cultivaron hasta alcanzar 70-90% de confluencia en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 4 ml de medio de cultivo. El día de la irradiación, se cambió el medio de cultivo con 4 ml de medio fresco y se colocó el frasco de cultivo dentro de una bolsa regular de plástico sellada herméticamente. Las células fueron irradiadas con diferentes dosis (30, 60, 70 y 80 Gy),

ajustando el equipo a 250 kV, 5mA y a una distancia de 20 cm de la fuente, con las botellas de cultivo en posición horizontal. La dosis de irradiación fue determinada por el tiempo de exposición de las células a estas condiciones, correspondiendo a 12 min para 30 Gy, 24 min para 60 Gy, 28 min para 70 Gy y 32 min para 80 Gy. Luego de la irradiación, se suspendieron las células por el método de tripsina-EDTA y se inoculó 1 ml a una concentración de 50.000 células/ml por pozo en placas de 24 pozos. Cada dos o tres días se resuspendieron las células de tres pozos al azar, donde se determinó la concentración celular por conteo al hematocitómetro y la viabilidad celular mediante MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bromuro de difeniltetrazolio). En todos los casos (menos con la dosis de 30 Gy) se hicieron controles de células no irradiadas, mantenidas durante el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de cultivo. Se realizó una repetición de tres réplicas para las dosis de 60 y 70 Gy, y tres repeticiones de tres réplicas cada una para la dosis de 80 Gy.

### Concentración celular

Se resuspendieron las células mediante el método de tripsina-EDTA y se tiñeron con azul tripán (0,4%, SIGMA) en una proporción 1:2. Se realizaron dos conteos por muestra de células vivas (incoloras, refringentes) y células muertas (azules) en una cámara de Neubauer (Freshney, 2010). Los porcentajes de viabilidad y mortalidad celular se obtuvieron comparando la concentración de células vivas y muertas con la concentración celular total.

### Viabilidad celular por MTT

La viabilidad celular se calculó mediante el método descrito por Freshney (2010) con algunas modificaciones. En resumen: las células se incubaron durante 3 a 6 horas con MTT (0.5 mg/ml, SIGMA) disuelto en el medio de cultivo, el cual se retiró para disolver las sales de formazán en etanol 95% filtrado (0.22  $\mu$ m). El producto de la reacción fue cuantificado mediante espectrofotometría (OD 570 nm) y se reporta como el porcentaje de viabilidad en comparación con el control de células no irradiadas.

### Eficiencia de plating

Se utilizó el procedimiento descrito por Freshney (2001) y Franken, Rodermond, Stap, Haveman y Van Breel (2006). Se resuspendieron las células mediante el método de tripsina-EDTA y se inocularon en placas multipozo a concentraciones crecientes pero en baja densidad. Luego de aproximadamente dos semanas, se fijaron las células con metanol y se tiñeron con cristal violeta. Para establecer la mínima concentración necesaria para obtener colonias en la línea 3T3, se utilizaron inóculos de 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pozos con 600  $\mu$ l de medio de cultivo, en tres repeticiones con células en el mismo pasaje. A partir de estos datos, se utilizaron inóculos de 400 y 800 células/cm<sup>2</sup>, por triplicado, para evaluar el efecto de los tratamientos de irradiación.

### Migración celular (*scratch wound healing*)

Se incubaron las células hasta alcanzar el 90-100% de confluencia. Utilizando una punta de micropipeta estéril, se trazaron estrías sobre la superficie del cultivo y se monitoreó periódicamente al microscopio la migración y proliferación celular hasta el cierre de la estría (o hasta el cierre de la estría en el tratamiento control) (Ho, Mou, Chiang, Weng y Chow, 2005 y Rodríguez, Wu y Guan, 2005).

## Tinción de ADN

Se cultivaron las células hasta un 60-70% de confluencia en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. El día antes de la extracción, se agregaron 4 ml de medio de cultivo fresco (para favorecer la mitosis). Se agregaron 400 µl de colchicina (0,01g/L en PBS) y se incubó bajo condiciones normales por 45 min. Se cosecharon las células por el método de tripsina-EDTA, se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min y se resuspendió el precipitado en 0,5 ml de PBS, al cual se le añadieron 2 ml de solución hipotónica (KCl 0,075M) y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Se fijó la muestra con 2 ml de una solución fijadora de metanol y ácido acético (3:1 v/v, 4°C) y se centrifugó a 1200 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 3 ml de solución fijadora (4 °C). Se colocó una gota de la preparación sobre un portaobjetos precalentado a 37 °C y se dejó secar al aire. Se le agregó una gota de GIEMSA y se observó al microscopio (Multani *et al.*, 1999 y Freshney, 2010); la resolución del método permite únicamente diferenciar entre presencia y ausencia de cromosomas en la muestra.

## Análisis estadístico

Cuando fue pertinente, se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de varianza de los tratamientos, los cuales se compararon mediante una ANOVA de un factor o una prueba T-student, para  $\alpha = 0,05$ . Todos los análisis se realizaron con el programa Microsoft Excel.

## Resultados y discusión

Las radiaciones ionizantes generan radicales libres e intermediarios reactivos de oxígeno, los cuales causan graves lesiones en las estructuras celulares, resultando en la incapacidad metabólica de la célula. El daño más crítico se produce al haber ruptura del ADN, lo cual induce a la muerte celular. Esta puede ocurrir por apoptosis (muerte celular programada) o necrosis (Arias, Aller, Arias y Lorente, 2001).

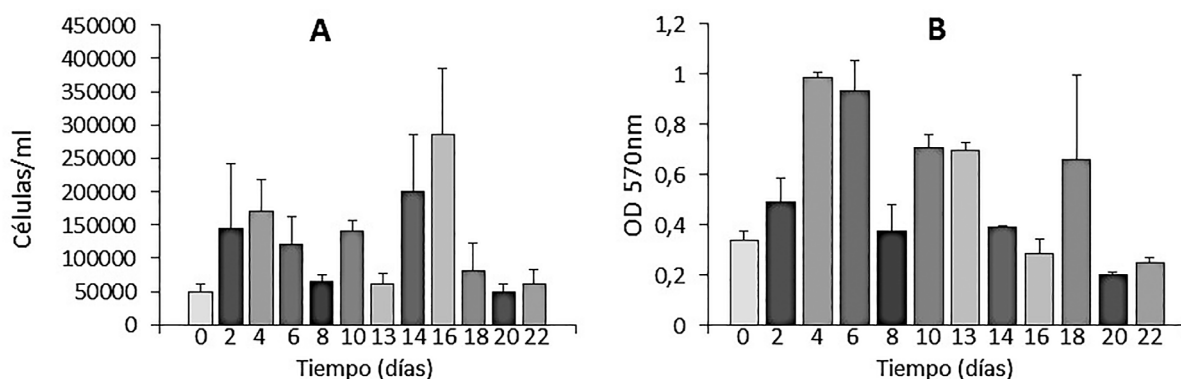
La respuesta celular a las radiaciones puede ser de cuatro tipos, incluyendo: (a) *muerte en interfase*, cuando ocurre el cese de las funciones metabólicas; (b) *retraso mitótico*, cuando se da un bloqueo temporal de las células dentro del ciclo mitótico; (c) *fallo reproductivo* o *muerte diferida*, lo cual ocasiona que las células irradiadas efectúen pocos ciclos antes de morir; y (d) *modificación celular*, cuando se da una transformación de la célula, la cual puede conservar su capacidad reproductiva y dar lugar a una neoplasia maligna (carcinogénesis) (Cura, Pedraza y Gayete, 2009). Para la obtención de una capa alimentadora es necesario que las células detengan su ciclo celular y mueran en un período relativamente corto de tiempo, aunque manteniendo sus funciones metabólicas y sin transformarse. Debido a ello, la muerte celular en interfase y la modificación celular son indeseables, siendo que la respuesta ideal esperada es la inactivación mitótica; sin embargo, el fallo reproductivo o muerte diferida podría ser una variante aceptable.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de cuatro dosis de irradiación con rayos X (30, 60, 70 y 80 Gy) sobre fibroblastos murinos 3T3. Para determinar el efecto de estas dosis sobre la viabilidad celular, se utilizó la prueba de viabilidad por MTT, la cual se basa en la propiedad de esta sustancia de ser reducida a cristales de formazán (insolubles en agua) por los mecanismos de oxidación-reducción en la mitocondria de las células metabólicamente activas, generando un cambio de color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de células viables presentes en la muestra (Freshney, 2010 y Montuenga, Ruiz y Calvo, 2009). Por otro lado, se emplearon ensayos de eficiencia de plating y migración celular para determinar la capacidad de adhesión y supervivencia de las células, así como su capacidad de migración en el cultivo, respectivamente.

Dado que las células 3T3 son adherentes, su adhesión al recipiente de cultivo es indispensable para su supervivencia y eventual proliferación, mientras que su capacidad de migración es un indicador del mantenimiento de sus funciones diferenciadas *in vitro*. Los resultados obtenidos mostraron que las dosis de 60, 70 y 80 Gy permitieron generar células mitóticamente inactivas, con resultados óptimos obtenidos con la dosis de 80 Gy.

### Dosis de irradiación: 30 Gy

Para la dosis de 30 Gy, se evaluó la concentración y viabilidad celular a lo largo de 22 días desde la irradiación. Se observó un crecimiento desordenado de las células y, lo más importante, la concentración celular se triplicó al segundo día de la irradiación, aunque decreció progresivamente con el tiempo (figura 1), lo que sugiere una respuesta del tipo fallo reproductivo o muerte diferida. Aunque tanto la concentración como la viabilidad celular mostraron una tendencia a decrecer progresivamente, a los 22 días de la irradiación todavía parecía existir actividad mitótica y metabólica, lo cual es indeseable para los requerimientos de nuestro laboratorio, ya que se busca que las células a utilizar como capas alimentadoras carezcan completamente de actividad mitótica y estén completamente ausentes al finalizar el período de 22 días.



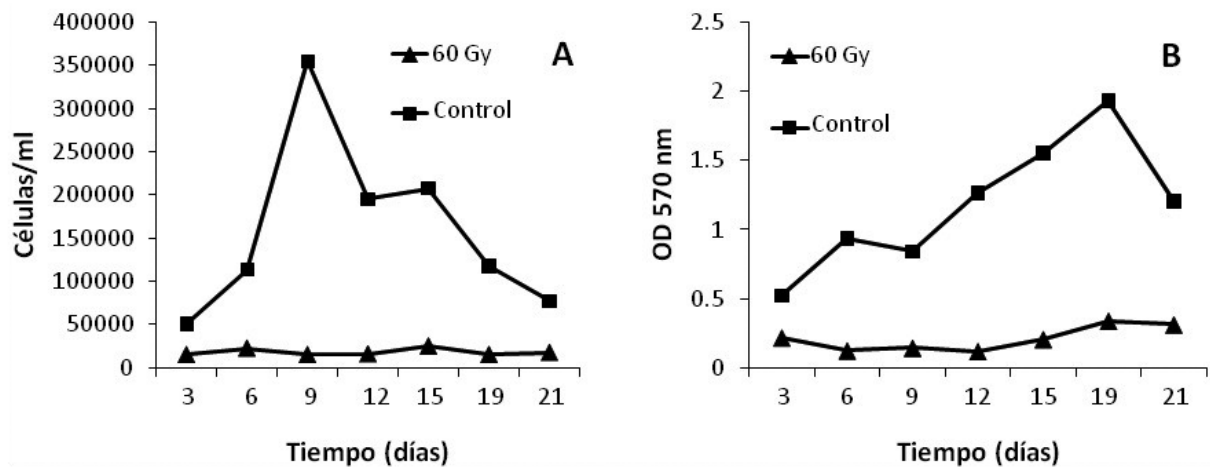
**Figura 1.** Concentración (A) y viabilidad celular (B) de fibroblastos 3T3 irradiados con una dosis de 30 Gy (rayos X). La viabilidad celular se determinó mediante MTT, donde la absorbancia a 570 nm es proporcional a la cantidad de células viables (B), mientras que la concentración celular se determinó mediante recuento al hematocitómetro (A). Cada grupo de datos representa el promedio de tres réplicas. La concentración celular se refiere solo a células vivas (azul tripán).

Aunque para la dosis de 30 Gy no se contó con un control de células no irradiadas, los controles de los ensayos de irradiación con otras dosis demostraron que la línea 3T3 utilizada, bajo condiciones normales, presenta un crecimiento congruente con la curva de crecimiento esperada para cualquier cultivo celular (Freshney, 2010), con una fase exponencial de crecimiento hasta los 6-10 días desde la inoculación o siembra y una fase estacionaria entre los 10-20 días, seguida por una fase de senescencia. Por lo tanto, las anomalías observadas en las células irradiadas con 30 Gy (rayos X) demuestran que esta dosis causó daños importantes en el metabolismo celular, pero no fue suficiente para inducir el arresto mitótico.

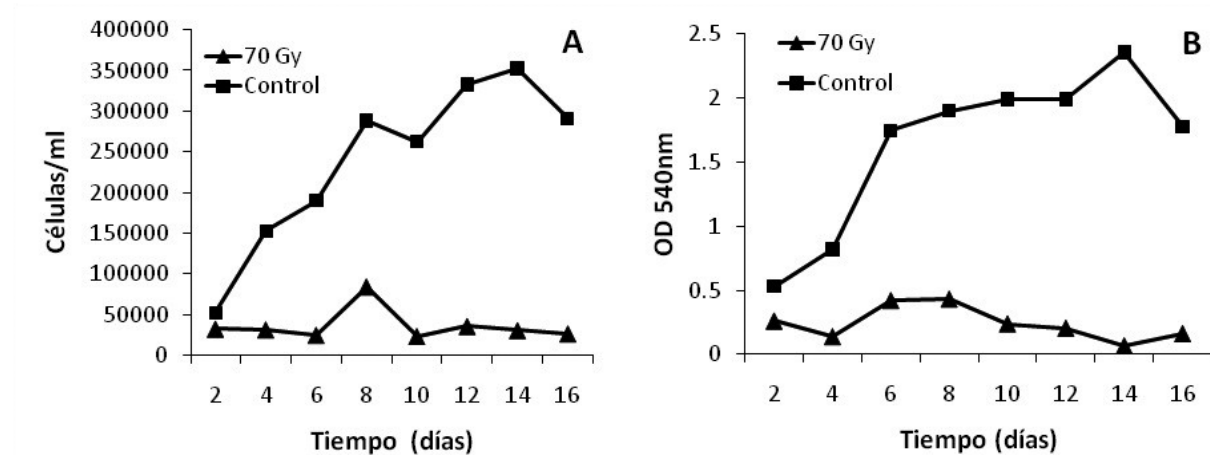
### Dosis de irradiación: 60 y 70 Gy

Las células tratadas con 60 y 70 Gy (figuras 2 y 3) evidenciaron un aparente arresto mitótico, ya que no se encontró diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre la concentración celular (de las células

irradiadas) del día inicial respecto a la concentración celular del día final de cada ensayo. Por otro lado, aunque la viabilidad de las células irradiadas fue significativamente reducida ( $p < 0,05$ ) con respecto a los controles en todos los muestreos, se evidenció la presencia de células metabólicamente activas en los cultivos irradiados. Lo anterior sugiere que ambas dosis fueron efectivas para detener la división celular, manteniendo células metabólicamente activas hasta por 21 días (60 Gy) y 16 días (70 Gy). Sin embargo, no se pudo determinar el tiempo de pérdida completa de la viabilidad celular.

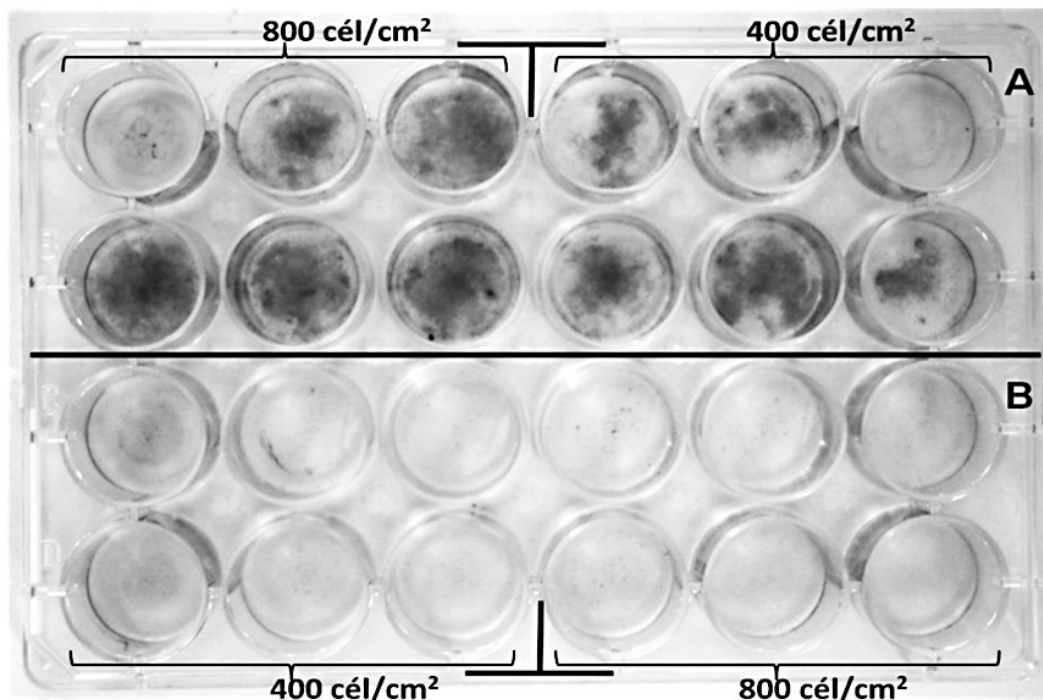


**Figura 2.** Concentración (A) y viabilidad celular (B) de fibroblastos 3T3 irradiados con una dosis de 60 Gy (rayos X). La concentración celular se determinó mediante recuento al hematocitómetro, mientras que la viabilidad celular se determinó mediante MTT. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. La concentración celular se refiere solo a células vivas (azul tripán).



**Figura 3.** Concentración (A) y viabilidad celular (B) de fibroblastos 3T3 irradiados con una dosis de 70 Gy (rayos X). La concentración celular se determinó mediante recuento al hematocitómetro, mientras que la viabilidad celular se determinó mediante MTT. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. La concentración celular se refiere solo a células vivas (azul tripán).

El efecto de la dosis de 70 Gy fue, además, evaluado mediante la observación de la eficiencia de plateo, prueba que ha sido definida como el mejor método para determinar la muerte celular reproductiva luego de tratamientos con radiaciones ionizantes (Franken *et al.*, 2006). El tamaño de las colonias se correlaciona con la capacidad de proliferación celular, mientras que la cantidad de colonias se asocia con la supervivencia y la capacidad de adhesión. En este sentido, no fue posible obtener colonias aisladas y la mayoría de las células se concentraron en una única colonia en el centro del pozo; sin embargo, sin importar la cantidad de células sembradas en el inóculo inicial, hubo ausencia total de formación de colonias en las células irradiadas, mientras que los controles prácticamente alcanzaron la confluencia al finalizar el tiempo de incubación (figura 4). Esto implica que hubo una reducida adhesión y, por lo tanto, supervivencia de las células irradiadas, y a la vez comprueba que no hubo proliferación, por lo que se verifica la efectividad de la dosis de irradiación utilizada.



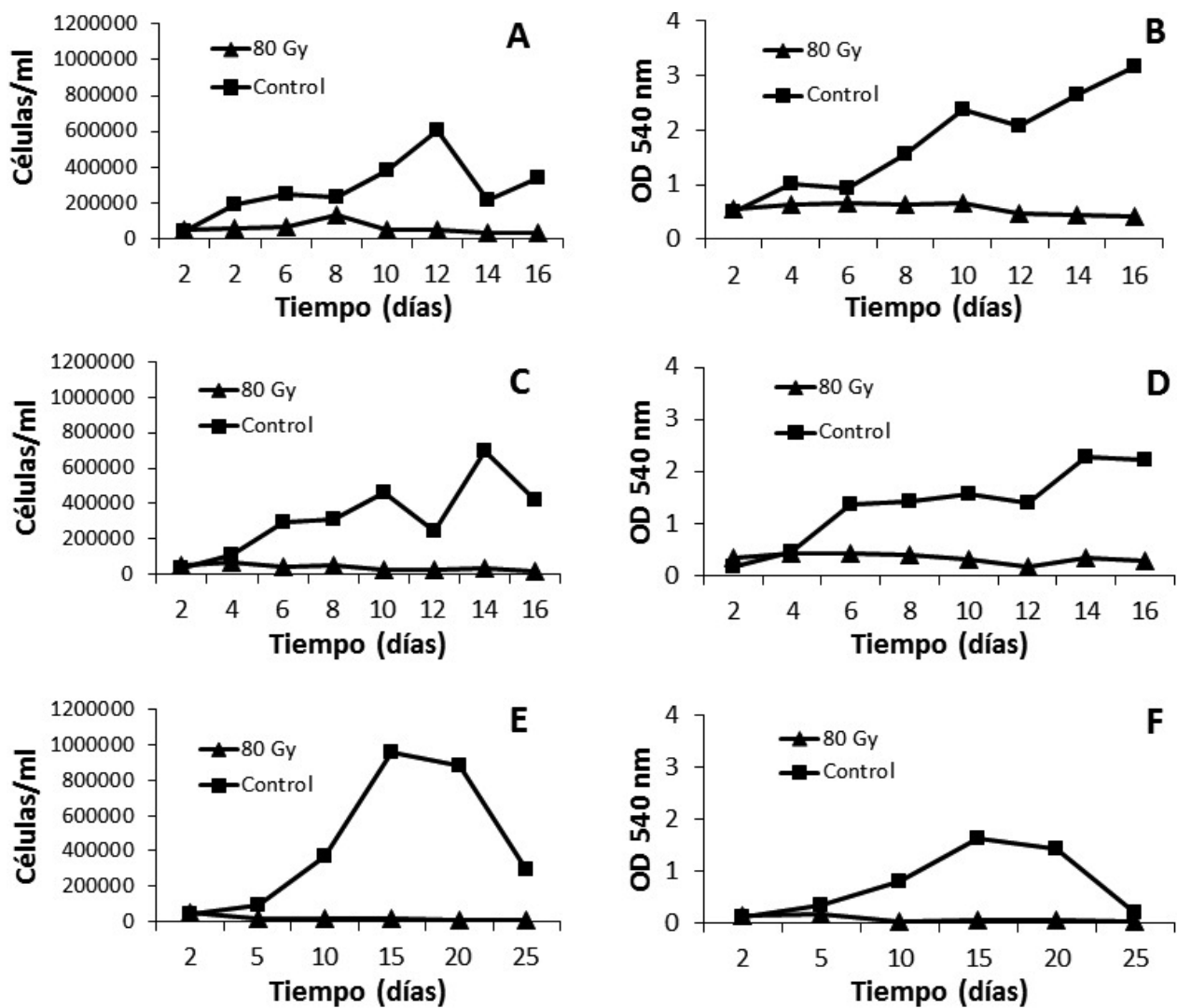
**Figura 4.** Eficiencia de plateo de fibroblastos 3T3 irradiados a 70 Gy (rayos X). Las células no irradiadas (control) se muestran en A, mientras que en B se observan las células irradiadas. Se presentan los datos observados a las dos semanas desde la irradiación e inoculación. Las manchas negras (cuyo color original es morado) son las células teñidas con cristal violeta.

### Dosis de irradiación: 80 Gy

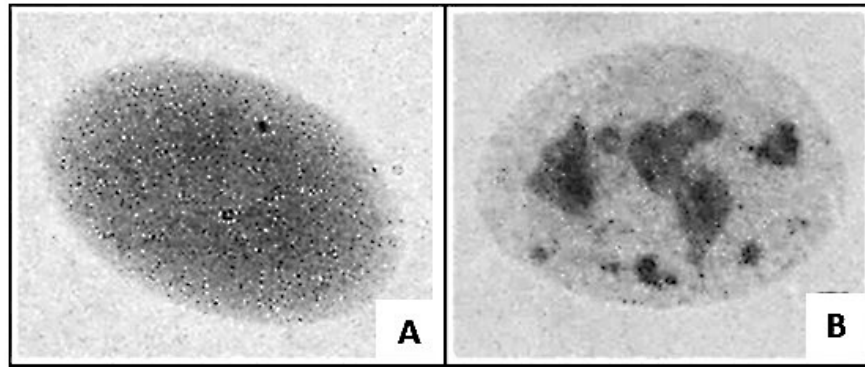
Todas las repeticiones demostraron que una dosis de 80 Gy fue suficiente para detener la división celular (figura 5), ya que no hubo aumentos significativos ( $p > 0,05$ ) en la concentración de las células irradiadas (excepto un aumento anómalo en el día 8 de la repetición 1), pero sí una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al inóculo inicial (50.000 células/ml). Sin embargo, en el último día de muestreo en todas las repeticiones aún se contabilizaron algunas células metabólicamente activas en los cultivos. El arresto mitótico se verificó mediante la tinción de cromosomas de las células en la muestra, donde se evidenció la ausencia de cromatina condensada en las células irradiadas (figura 6).

Por otro lado, al igual que con las dosis de 60 y 70 Gy, la viabilidad de las células irradiadas a 80 Gy fue significativamente reducida ( $p < 0,05$ ) con respecto a los controles en todos los muestreos, excepto para el día 2 en todas la repeticiones y el día 4 en la repetición 2, donde no se encontró diferencia con los controles ( $p > 0,05$ ). Estos datos demuestran que las células irradiadas mantuvieron una actividad metabólica restringida, que decreció progresivamente hasta una reducción del 88% en relación con la viabilidad celular inicial, a los 25 días desde la irradiación.

Considerando que los queratinocitos pueden tardar aproximadamente de 2 a 5 semanas en alcanzar la confluencia en un cultivo primario (Atiyeh, Hayek y Gunn, 2005), se consideró que las células 3T3 tratadas con 80 Gy pueden conformar una capa alimentadora adecuada para el cultivo de epidermis.



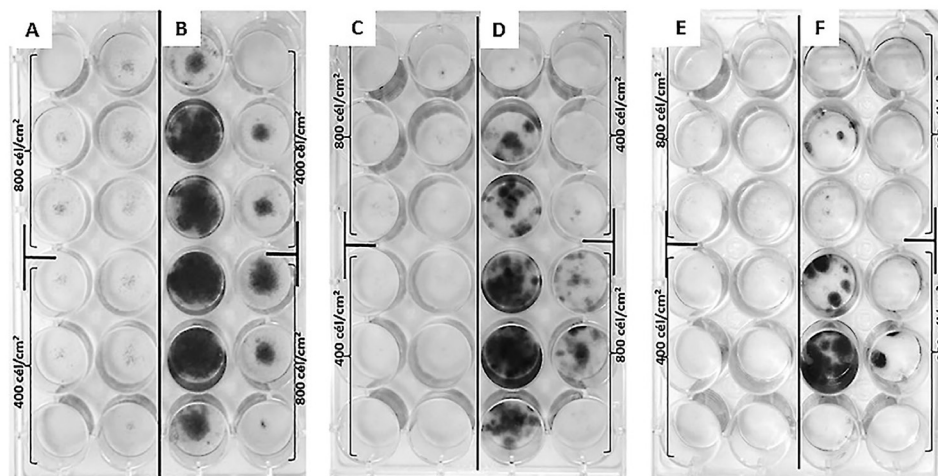
**Figura 5.** Concentración (A, C y E) y viabilidad celular (B, D y F) de fibroblastos 3T3 irradiados con una dosis de 80 Gy (rayos X). La concentración celular se determinó mediante recuento al hematocitómetro, mientras que la viabilidad celular se determinó mediante MTT. Cada punto representa el promedio de tres réplicas. La concentración celular se refiere solo a células vivas (azul tripán). A y B, repetición 1; C y D, repetición 2; E y F, repetición 3.



**Figura 6.** Tinción (GIEMSA) de núcleos de células tratadas con una dosis de irradiación de 80 Gy (rayos X) (1000x). Se muestran los núcleos de las células a las 24 horas de la irradiación. En las células irradiadas (A) se observa la cromatina dispersa por todo el núcleo, mientras que en las células control no irradiadas (B) se observa la cromatina condensada. La condensación de la cromatina es una característica del período de mitosis celular.

Los ensayos de eficiencia de plateo de las células 3T3 tratadas con 80 Gy mostraron que, sin importar la cantidad de células sembradas en el inóculo inicial y, al igual que con la dosis de 70 Gy, hubo reducida o total ausencia de formación de colonias en las células irradiadas, lo que implica mínima adhesión y supervivencia de éstas, verificando la eficacia de la dosis de irradiación utilizada (figura 7). La resolución de las colonias en las células control (no irradiadas) fue mejor que en ensayos previos, demostrándose que una adecuada agitación de los frascos de cultivo durante las primeras horas después de la siembra mejoró la distribución de las colonias.

La mayor cantidad de colonias en los pozos centrales de los frascos de cultivo podría deberse al efecto de borde intrínseco de estos dispositivos; es posible que los pozos centrales mantengan mayor humedad respecto a los pozos periféricos. Esto implica que en futuros ensayos con estos frascos de cultivo se debe emplear la distribución al azar de las réplicas.



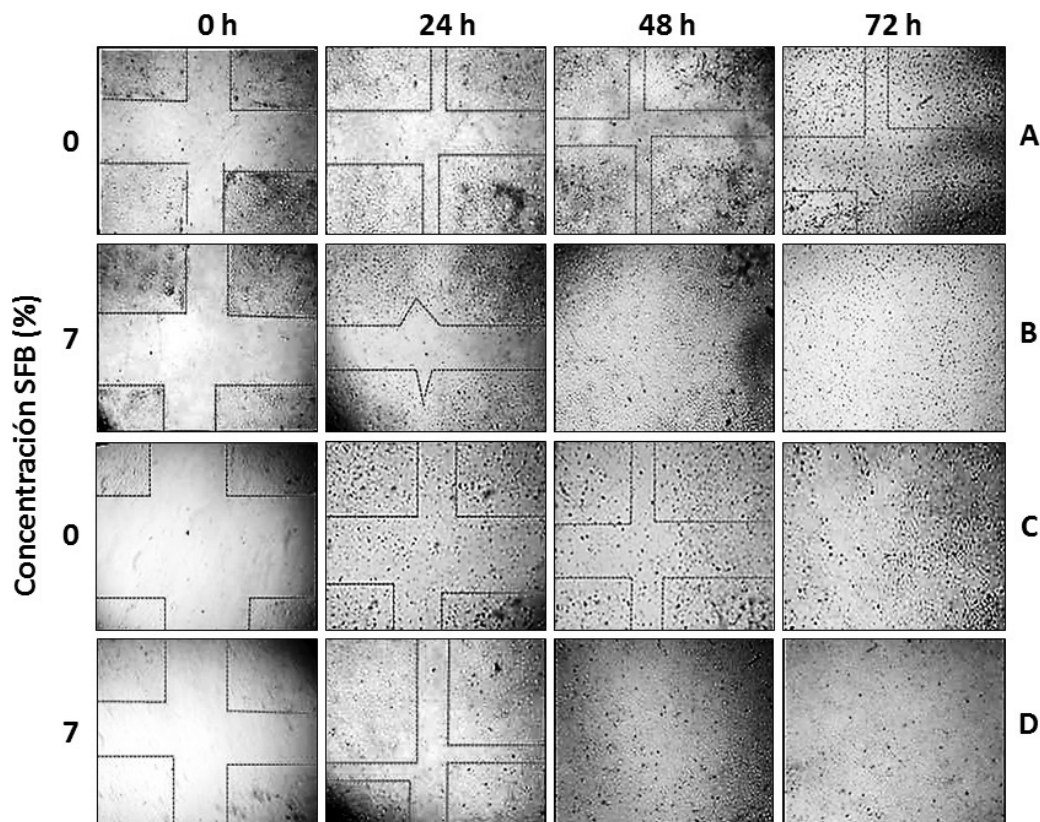
**Figura 7.** Eficiencia de plateo de fibroblastos 3T3 irradiados a 80 Gy (rayos X) en tres repeticiones. Las células no irradiadas (control) se muestran en B, D y F, mientras que en A, C y E se observan las células irradiadas. Se presentan los datos observados a las dos semanas desde la irradiación e inoculación. Las manchas negras (cuyo color original es morado) son las células teñidas con cristal violeta.



Finalmente, se realizaron pruebas de migración celular (*scratch wound healing*) (Ho *et al.*, 2005), que permiten verificar el mantenimiento de la funcionalidad diferenciada de las células adherentes *in vitro* a través de la observación de su comportamiento motil, ya que las células en cultivo, aunque se trate de células adherentes como los fibroblastos, son móviles y pueden recorrer o migrar distancias significativas a través del sustrato (Freshney, 2010). Esta movilidad depende de la densidad celular y la presencia de agentes como factores de crecimiento. La migración celular cesa cuando las células alcanzan confluencia, lo cual va acompañado de una reducción en la tasa de división celular (inhibición por contacto) (Freshney, 2010).

Este tipo de ensayos permite simular *in vitro* el proceso de reparación de una herida o lesión, pudiéndose observar la capacidad de migración y proliferación de las células en cuestión para realizarlo. Al realizar una estría en cultivos con medios que contienen suero, la migración es acompañada por proliferación celular, mientras que en medios de cultivo carentes o deficientes en suero, se reduce o inhibe la proliferación celular, de manera que la repoblación de la estría se debe casi exclusivamente a la migración de las células (Ho *et al.*, 2005).

Al evaluar la migración celular de fibroblastos 3T3 irradiados con una dosis de 80 Gy (rayos X) y cultivados en ausencia y presencia de SFB (figura 8), se encontró que la invasión del sitio de la lesión es al azar y que, en presencia de suero, tanto en las células irradiadas como en las células control, la zona de la lesión es repoblada a las 48 horas, mientras que se aprecia un leve retraso cuando se elimina el SFB, registrándose una migración más lenta. No obstante, no se apreciaron diferencias observables entre las células control y las células irradiadas, lo cual indica que las células irradiadas mantuvieron propiedades de migración similares a las del control.



**Figura 8.** Migración celular de fibroblastos 3T3 irradiados con rayos X (80 Gy) (40x). A y B muestran las células irradiadas, en C y D se observan las células control. La línea punteada marca la lesión original.

## Conclusiones

Se verificó que la irradiación con rayos X es un método viable y efectivo para la reducción de la supervivencia y proliferación celular en los fibroblastos murinos 3T3, ya que una dosis de radiación correspondiente a 80 Gy generó daños suficientes en la línea celular para causar el arresto mitótico, pero manteniendo una actividad metabólica basal durante 25 días. A pesar de la irradiación, los fibroblastos mantuvieron su capacidad de migración, sugiriendo que las células tratadas conservan algunas de sus propiedades diferenciadas *in vitro*.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Organismo Internacional de Energía Atómica y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR por el apoyo financiero que permitió la ejecución de este trabajo, así como a la Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales del ITCR por el acceso al equipo y facilidades de irradiación.

## Bibliografía

- Arango, C., Chamorro, I., Restrepo, L., Correa, L. & Henao, J. (2009). Características histológicas de piel cultivada *in vitro*. *Rev. Argentina de Dermatología*, 90(4), 190-200.
- Arias, J., Aller, M., Arias, J. & Lorente, L. (2001). *Generalidades Médico-Quirúrgicas*. Madrid: Tébar.
- Arvelo, F. (2007). Ingeniería de tejidos y producción de piel humana *in vitro*. *Investigación Clínica*, 48(3), 367-375.
- Arvelo, F., Pérez, P. & Cotte, C. (2004). Obtención de láminas de piel humana mediante ingeniería de tejidos. *ACV*, 55(1), 74-82.
- Atiyeh, B. S., Hayek, S. N. & Gunn, W. (2005). New technologies for burn wound closure and healing: Review of the literature. *Burns*, 31, 944-956.
- Atiyeh, B. & Costagliola, M. (2007). Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: Three decades later. *Burns*, 33, 405-413.
- Castro, S. (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*. Tesis inédita de bachillerato. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica.
- Cura, J., Pedraza, S. & Gayete, A. (2009). *Radiología Esencial*. España: Editorial Médica Panamericana.
- De Diego, E., Roca, A., Villanueva, A., Meana, A., Gómez, S., Martín, B. & Gómez, J. (2006). Reconstrucción tridimensional *in vitro* de mucosa vesical humana. *Actas Urol. Esp.* 30(2), 195-205.
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & Van Breel, C. (2006). Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*, 1, 2315-2319.
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6 ed. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Gil, P. (2011). *Cultivo de Células Animales y Humanas: Aplicaciones en Medicina Regenerativa*. España: Editorial Visión Libros.
- Ho, C-H., Mou, T-Y., Chiang, P-S., Weng, C-H. & Chow, N-W. (2005). Mini-chamber system for long-term maintenance and observation of cultured cells. *BioTechniques*, 38, 267-273.
- Ikada, Y. (2006). *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*. Gran Bretaña: Elsevier.
- Jessop, N. & Hay, R. (1979). *Preparation, preservation, recovery and use of irradiated feeder layers in cell culture research*. *Cell Culture Department*. American Type Culture Collection, Maryland.
- Montuenga, L., Ruiz, F. & Calvo, A. (2009). *Técnicas en Histología y Biología Celular*. España: Editorial Masson.
- Multani, A.S., Ozen, M., Agrawal, A., Hopwood, V. L., Von Eschenbach, A. C. & Pathak, S. (1999). Amplification of the Y chromosome in three murine tumor cell lines transformed *in vivo* by different human prostate cancers. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 35, 236-239.
- Rodríguez, L. G., Wu, X. & Guan, J-L. (2005). Wound-Healing Assay. En: J. Guan (Ed.), *Methods in Molecular Biology. Cell Migration: Developmental Methods and Protocols* (294: 23-29). New Jersey: Humana Press Inc.

# Cultivo *in vitro* de células de piel canina para su aplicación en tratamientos veterinarios

## Culture of canine epithelial cells for veterinarian therapy

Irene Gómez-Murillo<sup>1</sup>, Maritza Guerrero-Barrantes<sup>2</sup>, Laura A. Calvo-Castro<sup>3</sup>, Carolina Centeno-Cerdas<sup>4</sup>, Miguel Rojas-Chaves<sup>5</sup>

---

*Fecha de recepción: 11 de febrero del 2014*

*Fecha de aprobación: 6 de junio del 2014*

Gómez-Murillo, I; Calvo-Castro, L.A.; Centeno-Cerdas, C. Cultivo *in vitro* de células de piel canina para su aplicación en tratamientos veterinarios. *Tecnología en Marcha*. Edición especial Ingeniería de Tejidos. Pág 27-32.

---

1 Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ire.go.08@gmail.com.

2 Bióloga. Máster en Ecología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-2479. Correo electrónico: mguerrero@itcr.ac.cr.

3 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Microbiología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ancalvo@itcr.ac.cr.

4 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Ciencias Biomédicas. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ccenteno@itcr.ac.cr.

5 Microbiólogo. Doctor en Biquímica. Profesor-Investigador de la Escuela de Biología y Coordinador del Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9406. Correo electrónico: mirojas@itcr.ac.cr.

## Palabras clave

Fibroblastos; ingeniería de tejidos; fibrinógeno; trasplante celular.

## Resumen

En este artículo se presenta el caso clínico de un paciente canino con un trauma a nivel de piel, que fue tratado mediante un trasplante heterólogo en una matriz gelificada de fibrinógeno con fibroblastos cultivados *in vitro*. La aplicación de fibroblastos en el paciente logró una mejoría notoria con respecto a la disminución del tamaño de la herida y la ausencia de reacciones alérgicas y efectos adversos frente al tratamiento. Esta experiencia abre las puertas para un desarrollo en la investigación en el área de ingeniería de tejidos veterinaria con fines terapéuticos en Costa Rica.

## Keywords

Fibroblasts; tissue engineering; fibrinogen; cellular therapy.

## Abstract

We present the clinical case of a canine patient with a cutaneous trauma. The injure was treated with a heterologous transplant of *in vitro* cultured fibroblasts on a fibrinogen-based matrix gel. This resulted on a noticeable reduction on the wound size and the patient did not present any allergic reactions or adverse effects to the treatment. This experience opens an opportunity for the development of the veterinary Tissue Engineering area with therapeutic applications in Costa Rica.

## Introducción

En las últimas décadas se han desarrollado numerosos modelos de cultivo *in vitro* que permiten la reconstrucción de tejidos animales a partir de cultivos celulares para diferentes propósitos (Ponec, 1992; Serra *et al.*, 2007; Nilforoushzadeh, Esfahani, Fesharaki, Siadat y HaftBaradaran, 2010; Groeber, Holeiter, Hampel, Hinderer y Schenke-Layland, 2011; Yang y Xiong, 2012).

Uno de los tejidos más estudiados en este campo ha sido la piel, debido a su importancia para la supervivencia como capa protectora ante cambios de temperatura, radiación, trauma, infecciones e invasión de microorganismos. A pesar de la fuerte estructura que conforma este órgano, su funcionalidad puede ser afectada negativamente por quemaduras, enfermedades, accidentes, infecciones y procesos de envejecimiento, privando al individuo de una de sus principales barreras ambientales.

Es así que surge la necesidad de crear sustitutos que cumplan con eficacia las funciones antes mencionadas (Chen, Przyborowski y Berthiaume, 2009).

El desarrollo de cocultivos organotípicos de queratinocitos y fibroblastos se ha realizado en diversas especies, siendo útiles en la investigación dermatológica, en estudios biológicos y fisiológicos de la piel, en pruebas de toxicidad, en sustitutos de piel y para uso farmacológico (Ponec, 2002; Groeber *et al.*, 2011; Yang y Xiong, 2012). Aunque la incorporación de estos modelos en la clínica regenerativa canina no ha sido el eje principal de las investigaciones, sí se ha evaluado su utilización en la medicina regenerativa veterinaria (Serra *et al.*, 2007).

Las ventajas del cultivo celular *in vitro* de piel incluyen la facilidad de obtención de células deseadas a partir de una pequeña muestra de tejido sano del paciente, lo cual permite el aislamiento, cultivo y expansión de estas células en el laboratorio, con el fin de que puedan sobrevivir y ser trasplantadas al paciente. Por otro lado, aunque de preferencia se recomienda el trasplante celular autólogo (de un mismo individuo), también es posible realizar tratamientos con células heterólogas (de un individuo de la misma especie) (Groeber *et al.*, 2011). El propósito de este estudio consistió en la implementación de un sistema de cultivo *in vitro* y trasplante de células de la piel, con el fin de mejorar la calidad de vida de un paciente veterinario.

## Presentación del caso

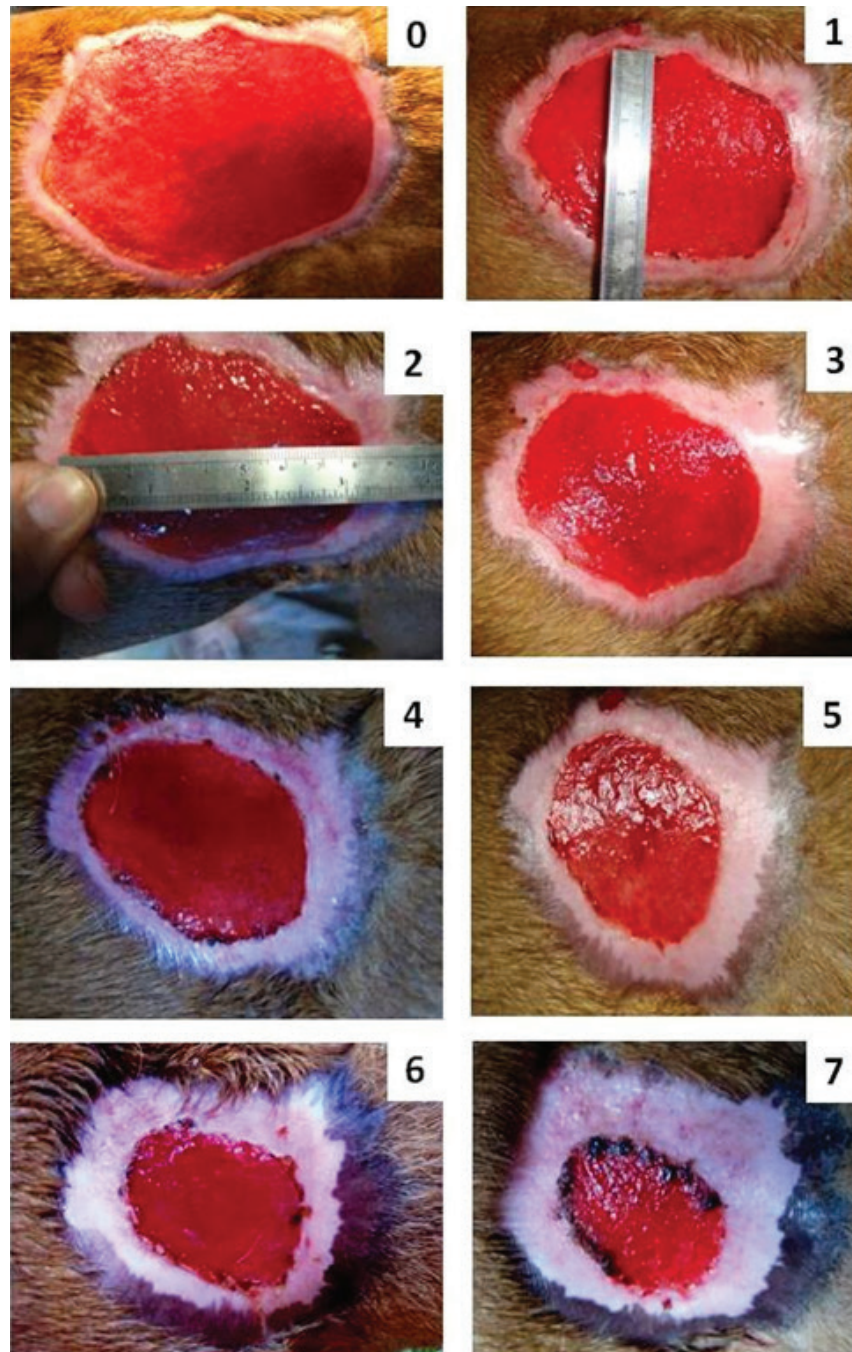
El paciente fue un canino hembra de raza no definida de aproximadamente tres años de edad, que presentaba un trauma de 10 cm de ancho por 11,7 cm de largo en la zona lateral derecha del cuerpo. Bajo anestesia total y en condiciones asépticas, se procedió a tomar una muestra de piel del paciente para establecer los cultivos primarios necesarios para un posterior trasplante. La muestra se trasladó al Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, donde fue procesada con protocolos basados en los procedimientos del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo, España), así como de la Unidad de Traducción Clínica del Hospital Universitario Austral (Buenos Aires, Argentina) y de la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT (España), donde los autores de este trabajo recibieron diversas capacitaciones. Sin embargo, debido a que la paciente presentaba una seborrea oleosa, no fue posible obtener un cultivo primario autólogo. Alternativamente, se utilizó un cultivo primario de fibroblastos de otro paciente veterinario de la misma especie, utilizando los mismos protocolos.

El cultivo primario se obtuvo a partir de un fragmento de tejido de piel (dermis y epidermis) de un canino sano, mediante un protocolo aséptico y bajo anestesia general. Luego de pasar por un tratamiento de desinfección para eliminar los contaminantes ambientales, se separó la dermis de la epidermis mediante incubación con colagenasa (1 mg/ml). Para obtener células individuales, el tejido dérmico se disgregó con esta misma enzima y tratamientos mecánicos. Finalmente, las células se cultivaron a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente de alta humedad, utilizando el medio de cultivo DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (SIGMA), 2% de glutamina (4 mM, GIBCO), 1% de penicilina-estreptomicina (10 000 u/ml penicilina G, 10 000 µg/ml de sulfato de sulfato de estreptomicina; GIBCO) y 1% de piruvato de sodio (0.11 mg/ml, SIGMA), a un pH final de 7,5-7,7.

Los fibroblastos obtenidos se cultivaron en monocapa hasta alcanzar 70-80% de confluencia. Las células fueron suspendidas mediante el método enzimático con tripsina-EDTA (Freshney, 2010). Estas células se diluyeron en solución salina con dextrosa al 5% para el trasplante. Por cada trasplante se colocaron aproximadamente  $2 \times 10^6$  células. Cabe mencionar que durante todo el periodo de cultivo *in vitro* de las células, el animal fue médicamente tratado según el protocolo estándar del hospital veterinario, donde el paciente fue atendido. Para ello, se le aplicó glucosa y antibiótico (cefalexina) sobre la herida para evitar infecciones. Además, la aplicación del trasplante celular fue hecha por personal médico veterinario calificado.

La herida tenía más de un mes de evolución y presentó una medida de 11,7 cm x 10 cm al momento en que se procedió a realizar el primer trasplante celular. Para ello, se preparó un gel a base de fibrinógeno (obtenido a partir de plasma canino) en el hospital veterinario, manteniendo condiciones asépticas. Se aspiró 1 ml de aire en la jeringa, se tomó el plasma junto con las células y se agitó. Posteriormente, se aspiró una mezcla de Ca<sup>2+</sup>/trombina para inducir la coagulación, se mezcló rápidamente y se colocó sobre la lesión. El gel tomó la consistencia adecuada de viscosidad entre 10 y 30 segundos después de que se realizó la mezcla.

Tras la colocación del gel, se cubrió la herida con gasa vaselinada y se vendó al animal, procurando que el vendaje se mantuviera por un lapso de 2-3 días. Después de este período, la herida se mantuvo sin vendaje, lavándola con solución salina de manera delicada cada dos días hasta la siguiente aplicación. El gel con fibroblastos se aplicó una vez por semana a lo largo de siete semanas, periodo tras el cual se observó una reducción significativa en el tamaño de la herida (figura 1). Durante este procedimiento no se le aplicó ningún otro medicamento sobre la herida, con el fin de que no afectar los resultados del estudio.



**Figura 1.** Evolución del proceso de cicatrización de la herida a lo largo de siete semanas, indicadas en la esquina

superior derecha de cada imagen en el panel. Nótese la presencia de tejido de granulación sano durante todo el tratamiento, así como la colonización de vellos y melanocitos en los bordes de la lesión.

Para conocer la mejoría de la paciente durante el tratamiento, se midieron los parámetros de temperatura, peso, estado de ánimo, ritmo cardíaco y examen sanguíneo, observables tanto al inicio como al final del tratamiento para comparar el avance durante el procedimiento. Al comparar al estado corporal antes y después del tratamiento (cuadro 1) se observó una mejoría notoria, sobre todo en el estado de ánimo del animal, así como mayor actividad física.

Cuadro 1. Parámetros medibles de la condición corporal de la paciente canina antes y después de la terapia celular.

PARÁMETRO	CONDICIÓN INICIAL	CONDICIÓN FINAL
Peso	23,4 kg	33 kg
Temperatura	38,8 °C	38,5 °C
Estado de ánimo	Depresión	Normal/Condición alerta
Frecuencia cardíaca	121	124
Hematocrito	20%	33%

## Discusión

Durante el cierre de las heridas de la piel se dan varios procesos, los cuales incluyen diferentes respuestas celulares para permitir la formación de una matriz extracelular por parte de los fibroblastos. La colocación del gel en el sitio de la lesión hace que las plaquetas interactúen con la matriz extracelular lesionada, para ejecutar procesos en los que se fomenta la formación de coágulos a través de la inducción de trombina y fibrina, mientras que la síntesis del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) ayuda a promover la migración y proliferación de los fibroblastos en el sitio de la lesión (Cárdenas, Garzón y Peinado, 2010). El uso del gel también favorece la constitución de un estroma provisional para el ingreso de los fibroblastos, a la vez que la secreción de proteínas como el colágeno y la fibronectina ayudan a construir la nueva matriz extracelular (Reinke y Sorg, 2012) donde estos se establecerán.

Los resultados demostraron una reducción visible en el tamaño de la herida, así como una mejoría en el estado anímico y fisiológico general del animal. Además, al final del tratamiento se observó crecimiento de vello en la zona de la herida, lo cual se ha demostrado que indica una mejoría de la zona dañada (Pavletic, 1991).

## Conclusiones

La terapia celular constituye una opción prometedora para utilizar como tratamiento de heridas en la piel de caninos. Este trabajo demostró resultados satisfactorios que posibilitan el heterotrasplante (y en consecuencia también el autotrasplante) de células para la regeneración de heridas de caninos en Costa Rica.

Es importante hacer un seguimiento constante del paciente animal con el fin de que el tratamiento pueda permanecer en el sitio de aplicación por más tiempo, posibilitando una recuperación más rápida y efectiva del canino.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Organismo Internacional de Energía Atómica y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR por el apoyo financiero que permitió la ejecución de este trabajo. Además, agradecemos al Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo, España), a la Dra. Marcela del Río de la Unidad de Medicina Regenerativa (CIEMAT-UC3M) (España), y a la Dra. Alicia Lorenti, de la Unidad de Traducción Clínica del Hospital Universitario Austral (Buenos Aires, Argentina), por la capacitación en los protocolos descritos en este trabajo.

## Bibliografía

- Cárdenas, R., Garzón, D. & Peinado, L. (2010). Modelo matemático del proceso de migración de fibroblastos en la lesión del ligamento. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 29(1), 1-10.
- Chen, M., Przyborowski, M. & Berthiaume, F. (2009). Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Crit Rev. Biomed. Eng*, 37(4-5), 399-421.
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6 ed. New Jersey, EUA: John Wiley & Sons.
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S. & Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering: *In vivo* and *in vitro* applications. *Advance Drug Delivery Reviews*, 128(2011), 352-366.
- Nilforoushzadeh, M., Esfahani, M., Fesharaki, M., Siadat, A. & HaftBaradaran, E. (2010). Treatment of Recalcitrant Electrical Burn Ulcer with Application of Topical Trichloroacetic Acid and Autologous Cultured Fibroblast. *Cell & Tissue Transplantation & Therapy*, 3, 1-4.
- Pavletic, M. (1991). Anatomy and Circulation of the Canine Skin. *Microsurgery*, 12, 103-112.
- Ponec, M. (1992). *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *International Journal of Cosmetic Science*, 14, 245-264.
- Ponec, M. (2002). Skin constructs for replacement of skin tissues for *in vitro* testing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(S1), 19-30.
- Reinke, J. & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49, 35-43.
- Serra, M., Brazis, P., Puigdemont, A., Fondevila, D., Romano, V., Torre, C. & Ferrer, L. (2007). Development and characterization of a canine skin equivalent. *Experimental Dermatology*, 16, 135-142.
- Yang, Z. & Xiong, H. (2012). *In vitro*, Tissue-Based Models as a Replacement for Animal Models in Testing of Drugs at the Preclinical Stages. En: L. Ceccherini-Nelli (Ed.), *Biomedical Tissue Culture*. InTech, DOI:10.5772/52300.



# Cultivo *in vitro* de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel

## *In vitro* culture of epithelial autografts for treating skin ailments

Laura A. Calvo-Castro<sup>1</sup>, Maritza Guerrero-Barrantes<sup>2</sup>, Carolina Centeno-Cerdas<sup>3</sup>, María Inés Chaves-Rodríguez<sup>4</sup>, Nefertiti Chaves-Solano<sup>5</sup>, Miguel Rojas-Chaves<sup>6</sup>

---

*Fecha de recepción: 11 de febrero del 2014*

*Fecha de aprobación: 14 de junio del 2014*

Calvo-Castro, L. A.; Chaves-Rodríguez, M; Centeno-Cerdas, C; Chaves-Solano, N; Guerrero-Barrantes, M; Rojas-Chaves, M. Cultivo *in vitro* de autoinjertos epiteliales para el tratamiento de lesiones en la piel. *Tecnología en Marcha*. Edición especial Ingeniería de Tejidos. Pág 33-45.

- 1 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Microbiología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ancalvo@itcr.ac.cr.
- 2 Bióloga. Máster en Ecología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-2479. Correo electrónico: mguerrero@itcr.ac.cr.
- 3 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Ciencias Biomédicas. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ccenteno@itcr.ac.cr.
- 4 Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: marchaves@itcr.ac.cr.
- 5 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: neferchaves@gmail.com.
- 6 Microbiólogo. Doctor en Biquímica. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9406. Correo electrónico: mirojas@itcr.ac.cr.

## Palabras clave

Cultivo celular; cultivo de tejidos; ingeniería de tejidos; autoinjerto; fibroblastos; queratinocitos; piel.

## Resumen

En muchos países, novedosas estrategias terapéuticas han permitido mejorar la atención y recuperación de diversos tipos de lesiones y afecciones en la piel. Sin embargo, en Costa Rica no existe, como protocolo de rutina, un tratamiento basado en ingeniería de tejidos que permita una reepitelización más efectiva y permanente en pacientes con heridas crónicas o de gran extensión en la piel. Muchos pacientes con afecciones epidérmicas podrían tratarse si existiese un programa a nivel nacional para la producción y trasplante de células de la piel que posibilite una rehabilitación menos traumática, más efectiva y con menor tiempo de hospitalización. Una opción para resolver este problema es el cultivo *in vitro* de células de la piel (fibroblastos y queratinocitos) para la elaboración de equivalentes dermoepiteliales para autoinjertos, un procedimiento actualmente disponible en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

## Keywords

Cell culture; tissue culture; tissue engineering; autograft; fibroblast; keratinocyte; skin.

## Abstract

Worldwide, novel therapeutic strategies have allowed an improvement on the attention and recovery of several skin ailments. However, to date in Costa Rica, there is no treatment, as a current routine protocol, to allow more effective and permanent re-epithelization of patients with chronic or large wounds on the skin. Given the existence of a national program for the production and transplant of skin cells, many patients with skin affections could be treated in the country, with less traumatic and more effective rehabilitation, and with lesser hospital stays. One option to solve this problem, is the *in vitro* culture of skin cells (fibroblasts and keratinocytes) for the production of autologous dermo-epithelial equivalents for grafting, a procedure currently available at the Tissue Engineering Laboratory (LAINTEC) of the Biotechnology Research Center at the Costa Rica Institute of Technology (ITCR).

## Introducción

El cultivo de tejidos se inició a principios del siglo XX, como un método para estudiar el comportamiento de células animales fuera de las variaciones sistémicas que pueden ocurrir *in vivo*. Debido a que la técnica predominante durante 50 años fue el cultivo de fragmentos no disgregados de tejido (explantes), el término *cultivo de tejidos* se ha utilizado para englobar las técnicas de cultivo de órganos, el propio cultivo de tejidos y el cultivo celular (Freshney, 2010). El cultivo celular, específicamente, consiste en un procedimiento tecnológico de mantenimiento y estudio de células vivas en un medio artificial, donde se procura reproducir las condiciones biológicas originales en las que se desarrollan las células (Cofán y Fernández-Solá, 1992).

En los últimos veinte años, y de forma exponencial, han surgido múltiples variantes técnicas y campos potenciales de aplicación de los cultivos celulares (Cofán y Fernández-Solá, 1992), entre ellos, la ingeniería de tejidos. Esta se define como “La aplicación de los principios y

métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructura-función de los tejidos normales y patológicos de mamíferos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener y mejorar funciones de los tejidos” (MATES, 2007).

El presente trabajo compila los principios generales y las técnicas más relevantes de cultivo celular e ingeniería de tejidos para la producción de autoinjertos epiteliales cultivados *in vitro* con potencial para uso terapéutico, área en la cual se desarrollan los esfuerzos del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos (LAINTEC) del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).

### Cultivo celular: principios generales

El cultivo celular *in vitro* se lleva a cabo mediante diversas estrategias, entre las que destacan el método del explante y el método de disgregación por técnicas enzimáticas o mecánicas. El primero consiste en la inoculación y mantenimiento de pequeños fragmentos no disgregados de tejido vivo, donde el crecimiento se restringe a la migración y ocasional proliferación celular en los bordes del explante. El método de disgregación enzimática implica la disociación de fragmentos de tejido en células individuales, mediante el uso de enzimas proteolíticas para la destrucción de la matriz extracelular (el soporte o andamio natural de las células en el tejido) y los enlaces intercelulares. La disociación mecánica se basa en el mismo principio, pero utilizando técnicas como microcorte, vibración, centrifugación o electroforesis. En cualquiera de los casos, las células que se inoculan pueden ser mantenidas y amplificadas *in vitro* (Freshney, 2010).

Los cultivos así establecidos se denominan *cultivos primarios* cuando proceden directamente del organismo vivo, mientras que los *cultivos secundarios* son los que se obtienen de la resiembra de otro cultivo (Cofán y Fernández-Solá, 1992). Dependiendo de las propiedades de las células, se pueden obtener cultivos en monocapa (para células adherentes) o cultivos en suspensión (para células carentes de dependencia de anclaje). Además, es posible establecer cultivos puros (axénicos), es decir, de un solo tipo celular, o cultivos mixtos (Freshney, 2010).

Según su capacidad de mantener sus propiedades proliferativas y su estado de diferenciación o linaje (funciones diferenciales o progenitoras de cada célula en cada tejido), las células cultivadas pueden ser *diferenciadas* (con nula o limitada capacidad de división), o *progenitoras* y *células madre* (células indiferenciadas con gran capacidad de división que pueden dar origen a otros linajes con distintas funcionalidades) (Cofán y Fernández-Solá, 1992; Estrada, Paz y López, 2006; Tacchi, 2008 y Freshney, 2010).

Cualquier linaje celular puede o no mantener su identidad morfológica y funcional *in vitro*, y es común que la pierdan con el tiempo de no suplirse los requerimientos ambientales, nutricionales y hormonales adecuados. La pérdida irreversible de las funciones especializadas expresadas *in vivo* o de la morfología diferenciada se denomina *desdiferenciación*, un fenómeno indeseable para las aplicaciones en ingeniería de tejidos. Por otro lado, las células progenitoras y las células madre no solo poseen alta capacidad de multiplicación, generando en cada ciclo de división nuevas células del mismo linaje, sino que, con los estímulos adecuados, también pueden generar células diferenciadas (fenómeno de *diferenciación*) (Cofán y Fernández-Solá, 1992; Estrada *et al.*, 2006; Tacchi, 2008 y Freshney, 2010). Para las aplicaciones en ingeniería de tejidos es primordial la obtención, el aislamiento y el mantenimiento de la población de células progenitoras y/o de células madre del tejido que se va a cultivar.

## La piel: estructura y función

La piel es el órgano más extenso del cuerpo: una persona promedio está cubierta por 1,8 m<sup>2</sup> de piel de aproximadamente 2,2 mm de espesor. La elasticidad, resistencia, flexibilidad, extensibilidad, turgencia y humedad de este órgano le permiten cumplir diversas funciones (Sánchez, Quesada y Cedeño, 2010), incluyendo protección de los tejidos internos, prevención de la deshidratación, regulación de la temperatura, almacenamiento de energía en el tejido adiposo subcutáneo, excreción de agua, sales y otras sustancias, percepción del dolor, calor, frío y otras sensaciones, protección contra agentes patógenos y producción de vitamina D (Yamamoto, 2001; Beele, 2002 y Eckes, Krieg y Niessen, 2010). Estructuralmente, desde el exterior hacia el interior, la piel se divide en tres capas o estratos principales, cada uno compuesto por células y tejidos específicos: la epidermis, la dermis y la hipodermis o subdermis (figura 1). Para entender los principios del cultivo *in vitro* de las células de estos tejidos, es necesario conocer su estructura y función.



**Figura 1.** Histología general de la piel. Tinción con hematoxilina eosina de tejido de piel humana de la palma de la mano. Se señalan las capas de la piel: epidermis, dermis e hipodermis. Se observan además los estratos que componen la epidermis; a saber, córneo, granuloso y basal. Modificado de Eroschenko (2008).

## Epidermis

Es la capa más superficial de la piel, cuya principal función es protegerla ante lesiones físicas, químicas y biológicas. Está compuesta mayoritariamente por queratinocitos, e incluye además otras células dendríticas residentes como las células de Langerhans, melanocitos y células de Merkel (Foster y Foil, 2008). Los queratinocitos, además de constituir una importante barrera protectora entre el interior y el exterior del organismo, desempeñan un papel fundamental en el sistema inmune de la piel (principalmente en los procesos inflamatorios) y se encargan de la producción de queratina, principal proteína estructural de la epidermis (Fitzpatrick, 2006 e Ibsch, Bourdeau, Cadiot, Viac y Gatto, 2007).

La epidermis consta de varias subcapas o estratos principales. El *estrato basal* está compuesto de melanocitos y queratinocitos, producidos por un número pequeño de células madre empaquetadas en columnas, así como de un gran repositorio de células progenitoras de vida corta llamadas *células amplificadoras transitorias*. Los queratinocitos de este estrato tienen la capacidad de dividirse y migrar hacia el exterior para el recambio continuo de las células del *estrato córneo*. Estos queratinocitos contienen abundantes ribosomas libres en el citoplasma para la síntesis de queratina (Fitzpatrick, 2006 y Atiyeh y Costagliola, 2007).

Los queratinocitos poligonales del *estrato espinoso* y los queratinocitos fusiformes con gránulos de querato-hialina del *estrato granuloso* también se encargan de la síntesis y producción de queratina (Pavletic, 1991). El *estrato córneo*, la capa más externa, está compuesta por 15 a 20 filas de células terminales sin núcleo, de morfología alargada y con depósitos de queratina y filagrina. Estas células se descaman continuamente en la superficie de la piel y por esa razón son reemplazadas de manera constante (Young, Lowe, Stevens y Heath, 2006).

### Dermis

El tejido conectivo organizado de la dermis consiste en una matriz extracelular de proteínas fibrosas y no fibrosas, con células permanentes y transitorias, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y tejido muscular suave. Asimismo, en esta capa se alojan estructuras como glándulas y folículos pilosos. La dermis se divide en dos subcapas: la dermis papilar y la dermis reticular. Ambas capas integran una estructura sensorial que almacena una parte significativa del agua corporal, a la vez que brinda resistencia mecánica, elasticidad, homeostasis, defensa inmune y cicatrización (Prost-Squarcioni, 2006 y Sánchez *et al.*, 2010).

Las células residentes de la dermis son los fibroblastos, las células mesenquimales con forma dendrítica y los mastocitos (Kanitakis, 1998 y Sánchez *et al.*, 2010). Los fibroblastos son las células más abundantes de este tejido y son metabólicamente muy activas en la secreción de componentes de la matriz extracelular. En general, se encargan de la síntesis y degradación (recambio) del tejido conjuntivo fibroso y no fibroso de la matriz extracelular proteica. Su morfología se caracteriza por un aspecto alargado, fusiforme o estrellado, el cual depende del tipo de matriz extracelular en la que se encuentren inmersos (Foster y Foil, 2008; Gómez y Campos, 2009). Los miofibroblastos son células derivadas de los fibroblastos; aparecen durante los procesos de cicatrización, en los cuales sintetizan y contraen proteínas de la matriz extracelular, remodelando el tejido para la formación de la cicatriz (Smaldone *et al.*, 2011).

La abundante matriz extracelular que rodea a todas las células de la dermis está compuesta de ácido hialurónico, varios tipos de colágeno, fibrina, elastina, fibronectina, tenascina, epimorfina y reticulina (Radostits, Houston y Mayhew, 2002; Prost-Squarcioni, 2006 y Sánchez *et al.*, 2010).

### Lámina basal

La lámina basal es una interfaz compleja y funcional que media la adhesión entre la dermis y la epidermis. Esta estructura contiene a las células basales de la epidermis y es rica en proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento (Foster y Foil, 2008 y Fuchs, 2009). Puede dividirse en cuatro áreas estructuralmente diferenciables: la interfaz hemidesmosoma/lámina lúcida superior, la lámina lúcida inferior, la lámina densa y las fibrillas de anclaje contenidas en la sublámina densa. Los hemidesmosomas (estructuras proteicas transmembrana) conectan el interior de la célula con la matriz extracelular de la lámina basal, formando una estructura funcional que adhiere los queratinocitos al tejido conectivo subyacente (Zambruno y Failla, 1999 y Prost-Squarcioni, 2006).

## Cultivo *in vitro* de fibroblastos y queratinocitos

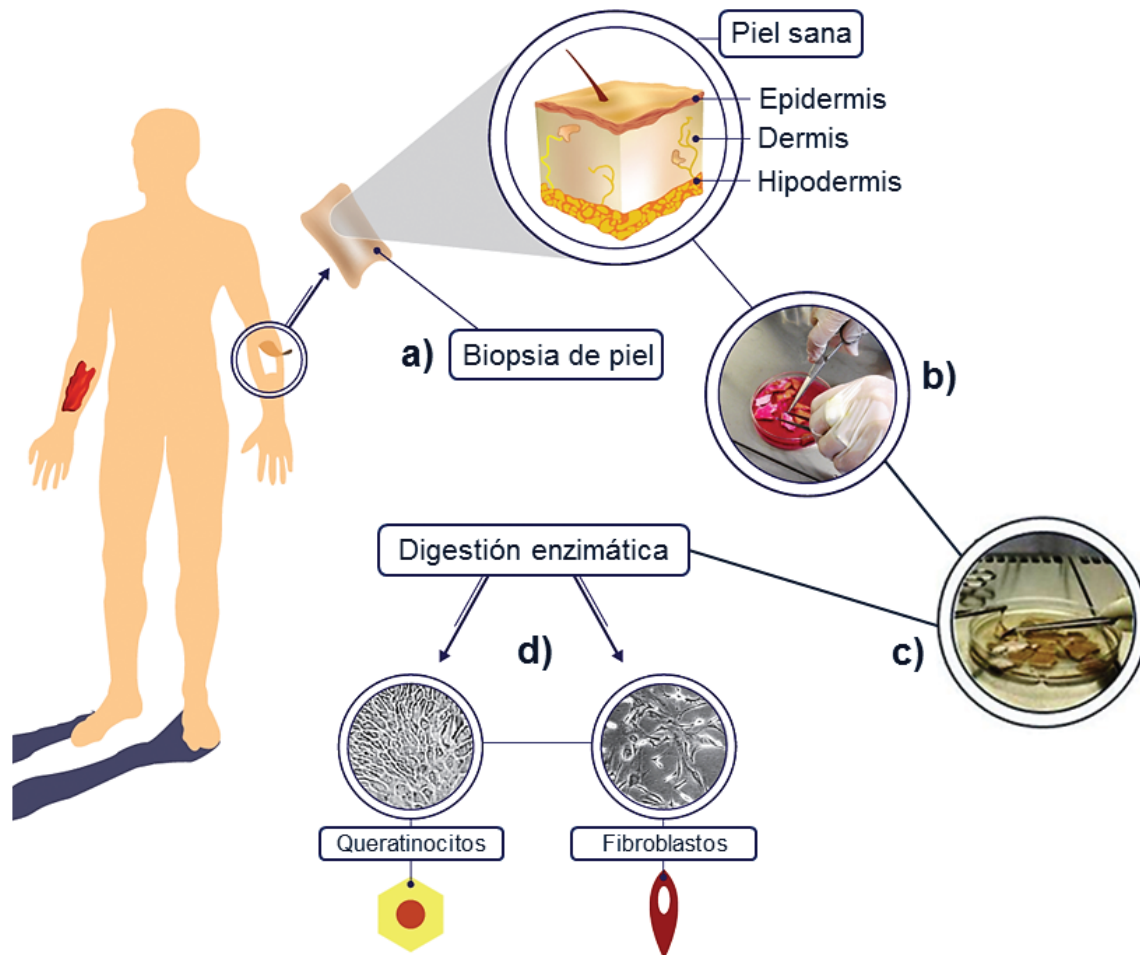
Los primeros trabajos para el cultivo *in vitro* de piel humana datan de hace más de un siglo; sin embargo, aunque la producción de epitelios cultivados *in vitro* se inició formalmente en la década de 1950, no fue sino hasta que Rheinwald y Green publicaron su trabajo sobre el crecimiento y la proliferación de queratinocitos *in vitro* en 1975 que se logró el cultivo eficiente de las células epidérmicas, obteniéndose grandes rendimientos a partir de una biopsia pequeña, con láminas de epitelio estratificado que mantuviese las características de una epidermis auténtica (Brychta, Adler, Rihovd y Komdrkovd, 1994; Leigh y Birgitte, 1994 y Atiyeh y Costagliola, 2007). Se han desarrollado diversas modificaciones y alternativas al protocolo de Rheinwald y Green, pero su trabajo sigue siendo el modelo de referencia para el establecimiento de cultivos *in vitro* de fibroblastos y queratinocitos de piel humana, y en él se basan la mayoría de los procedimientos descritos a continuación.

### Obtención y cultivo de queratinocitos

Para el cultivo de queratinocitos es necesario tomar una muestra de 2 a 3 cm<sup>2</sup> de piel sana, generalmente de la axila o del área púbica, al mismo tiempo que se hace el desbridamiento inicial y la curación tradicional de la lesión en la zona que se va a tratar (Atiyeh y Costagliola, 2007). La toma de esta biopsia debe hacerla personal médico especializado, y el tejido debe colocarse inmediatamente en un recipiente con un medio nutritivo adecuado para su transporte al laboratorio de cultivo celular. Las células humanas epidérmicas son aisladas de la pequeña biopsia de piel, utilizando técnicas de disociación mecánica y enzimática bajo condiciones totalmente estériles (figura 2). El protocolo implementado en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos realiza primero una desinfección superficial del tejido para eliminar los contaminantes ambientales (utilizando lavados con yodo, etanol 70% y solución salina con antibióticos de amplio espectro). Seguidamente, la separación de la dermis de la epidermis se realiza mediante enzimas como la dispasa, la hialuronidasa y, de preferencia, la colagenasa, para destruir la lámina basal y liberar cada tejido. Finalmente, en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos se emplea la colagenasa para disgregar la dermis y la tripsina para la epidermis, obteniéndose células individuales.

En este sentido, se ha encontrado que el uso de dispasa puede causar la pérdida de hasta 37% del total de células clonogénicas (Atiyeh y Costagliola, 2007). Dado que la dispasa es una metaloproteinasa que destruye la fibronectina, el colágeno IV y el colágeno I de la lámina basal (Tavira, Ortega, Dávila, Estrada y Meneses, 2009), es posible que cause además la destrucción y pérdida temporal de las  $\alpha 6\beta 4$ -Integrinas (esenciales para la adhesión) de las células clonogénicas del estrato basal cercano (Atiyeh, Hayek y Gunn, 2005), lo cual podría inducir a los queratinocitos a entrar en un proceso de diferenciación debido a la ausencia de anclaje, tal como se ha reportado que ocurre con otras metaloproteinasas de matriz (Muffler *et al.*, 2008). Debido a esto, en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos se ha preferido la utilización de colagenasa para separar la dermis de la epidermis, con resultados satisfactorios.

Una vez obtenidas las células, los queratinocitos aislados del tejido se inoculan sobre una capa de células alimentadoras o *feeder-layer* (como, por ejemplo, de líneas celulares murinas tales como 3T3-J2 o 3T3-152), cuya mitosis ha sido inhibida por radiación. La función de esta capa alimentadora es actuar como una matriz mesenquimal *in vitro*, dado que se sabe que los queratinocitos son células altamente dependientes de la interacción con proteínas de matriz extracelular para su supervivencia y proliferación (Hernon *et al.*, 2006 y Atiyeh y Costagliola, 2007), pero son incapaces de producir algunas proteínas de la lámina basal (Ikada, 2006; Arango, Chamorro, Restrepo, Correa y Henao, 2009). Las células de la capa alimentadora permiten una óptima expansión clonal de las células epiteliales y promueven la proliferación y el crecimiento de los queratinocitos (Atiyeh y Costagliola, 2007).



**Figura 2.** Obtención de fibroblastos y queratinocitos a partir de una biopsia de piel. Se toma un fragmento de tejido de 2-3 cm<sup>2</sup> de profundidad parcial (a). En el laboratorio, el tejido se desinfecta (b) y se separa la dermis de la epidermis (c), y ambos tejidos se disgregan en células individuales utilizando enzimas (d) para su posterior inoculación en el medio de cultivo correspondiente.

Las capas de células alimentadoras se pueden obtener a partir de células irradiadas subletalmente con rayos X o rayos  $\gamma$ ; además, también se pueden aplicar tratamientos químicos con mitomicina C (Freshney, 2010). Ambos tratamientos generan células no proliferativas que se pueden mantener viables hasta por varias semanas. En el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, se preparan capas alimentadoras de fibroblastos irradiados con rayos X a una dosis de 80 Gy.

Por otro lado, los queratinocitos se cultivan en medios de cultivo celular que proveen a las células, de forma bastante aproximada y específica, de los requerimientos fisiológicos normales del ambiente *in vivo*, a la vez que inhiben el crecimiento de otros tipos celulares. El medio de cultivo tradicional para los queratinocitos incluye el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) combinado con el medio Ham's F12 (en una proporción 3:1) y suplementado con suero fetal bovino (SFB), antibióticos (generalmente penicilina y estreptomycin), antimicóticos (usualmente anfotericina B), factor de crecimiento epidermal (EGF), hidrocortisona, toxina colérica (como factor mitogénico), adenina, insulina, transferrina, glutamina y triiodotironina (Hernon *et al.*, 2006). En nuestro laboratorio, también se agrega piruvato de sodio y/o HEPES para estabilizar el pH.

Bajo estas condiciones, algunos queratinocitos resultan competentes para iniciar colonias y, después de 3 a 4 semanas, los cultivos pueden pasar de monocapa a multicapa, formando estratos con un espesor de hasta 8 a 10 capas celulares. La población inicial de queratinocitos es amplificada por subcultivo (usualmente utilizando el método enzimático con tripsina-EDTA). La adición de factores de crecimiento y suero al medio de cultivo permite un crecimiento óptimo de las células, y un nivel relativamente alto de calcio (1,8 mM), y posibilitan la diferenciación parcial y la estratificación de las células luego de alcanzada la confluencia, de manera que se puede formar una multicapa intacta de células epiteliales (Atiyeh y Costagliola, 2007).

Sin embargo, la estratificación del cultivo implica directamente la diferenciación de los queratinocitos, de manera que es recomendable mantener las células en monocapa con el fin de propiciar la selección y mantenimiento de las propiedades progenitoras de las células madre con alta capacidad proliferativa. Esto incide en la incorporación del injerto al tejido tratado, así como en la funcionalidad de las células por trasplantar en el largo plazo, con resultados clínicos permanentes (Atiyeh *et al.*, 2005).

No obstante, el cultivo primario *in vitro* de la población progenitora de células madre de la epidermis es limitado, ya que solo el 1% o menos de las células del estrato basal de este tejido son células madre. Se asume que las células madre se dividen de forma asimétrica, produciendo en cada división una célula hija con calidad de célula madre (la cual raramente prolifera) y una célula hija con capacidad proliferativa limitada, llamada *célula amplificadora transitoria*, la cual genera un linaje que se divide durante un número finito de ciclos celulares hasta diferenciarse y morir (Muffler *et al.*, 2008 y Atiyeh y Costagliola, 2007).

Así, la vida a largo plazo de los queratinocitos cultivados depende de la subpoblación o linaje que da origen a las colonias en el cultivo, las cuales pueden ser iniciadas por queratinocitos clonogénicos, llamados holoclonos y meroclones, los cuales poseen un potencial de crecimiento significativo; o por queratinocitos con un potencial restringido de crecimiento, llamados paraclones. La transición de holoclonos a meroclones y a paraclones es un proceso unidireccional irreversible que ocurre lentamente durante el envejecimiento (Atiyeh y Costagliola, 2007). Esto implica que las colonias originadas desde paraclones se perderán en fases tempranas del cultivo, mientras que las colonias originadas desde holoclonos o meroclones tendrán el mayor potencial de proliferación a largo plazo.

Aun así, la eficiencia de formación de colonias de los queratinocitos recién aislados de biopsias suele ser muy baja (de 0,15 a 3,8%), y el número de queratinocitos clonogénicos por mm<sup>2</sup> de piel varía grandemente entre individuos y zonas anatómicas. Hacia el final del cultivo primario, un gran número de queratinocitos (hasta 59%) puede llegar a formar colonias, pero la cantidad de colonias con potencial de crecimiento restringido (abortivas) aumenta con los sucesivos pasajes o por condiciones inadecuadas de cultivo. No obstante, se ha estimado que las células de una biopsia de piel de 3 cm<sup>2</sup> pueden ser expandidas de 5000 a 10000 veces en 3 a 4 semanas, generando suficiente piel para cubrir la superficie corporal de un adulto (Atiyeh y Costagliola, 2007). En este sentido, un estudio en curso en nuestro laboratorio (datos no publicados) ha mostrado que los queratinocitos obtenidos por los métodos aquí descritos se mantienen poco diferenciados y retienen una alta capacidad proliferativa hasta el pasaje o subcultivo número 6 y 20, respectivamente.

### Obtención y cultivo de fibroblastos

Los fibroblastos de la dermis pueden ser aislados de la misma biopsia de piel inicial de la cual se obtienen los queratinocitos. Los fibroblastos tienen una tasa de supervivencia, desarrollo y proliferación *in vitro* superior a la de los queratinocitos (Gil, 2011); además, no necesitan de capas alimentadoras para su cultivo *in vitro*, y sus requerimientos nutricionales son menores,



por lo que se utilizan medios de cultivo menos exigentes que usualmente incluyen solo DMEM o RPMI, con SFB al 5-10% y antibióticos, aunque también se suelen suplementar con L-glutamina y piruvato de sodio o HEPES para el control de pH (Cofán y Fernández-Solá, 1992; Abdel-Naser, Adallah, Larangeira de Almeida y Wollina, 2005 y Freshney, 2010). Debido a la mayor facilidad para el cultivo de estas células, se pueden establecer cultivos primarios mediante el método del explante o el método de disociación enzimática (Rittié y Fisher, 2005). En el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos se prefiere este último, utilizando colagenasa para disgregar las células de la dermis, principalmente porque es más efectivo para obtener gran cantidad de células en un lapso corto de tiempo.

Los fibroblastos humanos normales obtenidos de adultos jóvenes alcanzan la senescencia entre las semanas 10 y 20, y pueden alcanzar de 30 a 50 ciclos de división; aunque se pueden mantener viables hasta por 18 meses luego de alcanzar su punto crítico (Rittié y Fisher, 2005 y Freshney, 2010). Además, para evitar la inducción de anomalías y senescencia por inhibición por contacto, los fibroblastos deben cultivarse en monocapas subconfluentes, y es recomendable criopreservar fibroblastos con bajo número de pasajes, manteniendo así reservas de células genéticamente jóvenes.

Los fibroblastos son esenciales para la curación de las heridas, donde han sido asociados con mejoras en la deposición y remodelación del colágeno y en la formación y organización de las uniones dermoepiteliales; promueven el crecimiento y la supervivencia de los queratinocitos y se ha demostrado que reducen la formación de miofibroblastos y la contracción de las heridas. En general, los fibroblastos mejoran las propiedades mecánicas de los injertos, acelerando el desarrollo de la función del tejido como barrera protectora y el anclaje entre la dermis y la epidermis (Atiyeh y Costagliola, 2007).

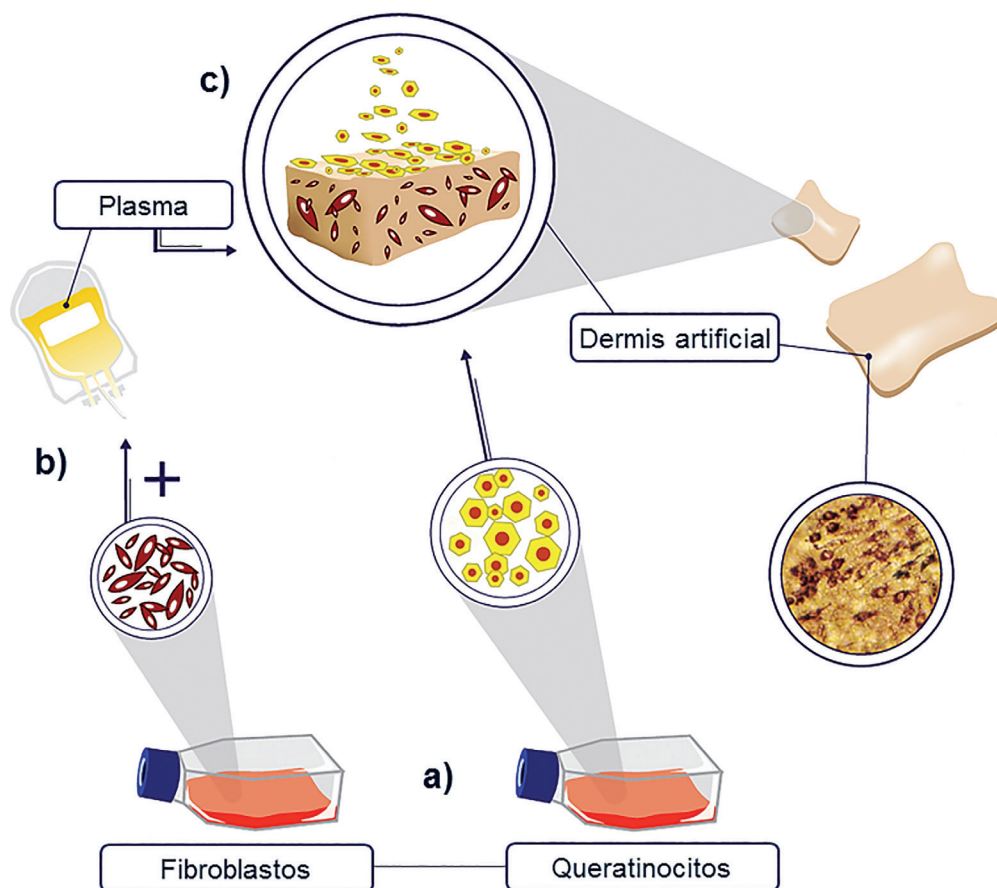
Mientras que el uso de queratinocitos autólogos para el tratamiento de lesiones en la piel es esencial para la incorporación adecuada del injerto al tejido basal de la lesión, se ha demostrado que existe tolerancia inmunológica hacia los fibroblastos alogénicos (de un donador diferente al receptor), los cuales parecen ser aceptados por el paciente receptor sin evidencia de rechazo inmunológico en el largo plazo. Esto implica que los injertos epiteliales cultivados *in vitro* pueden ser producidos con fibroblastos tanto autólogos como alogénicos, donde el uso de fibroblastos alogénicos permitiría la preparación previa de equivalentes dérmicos y el mantenimiento de bancos de reserva, reduciendo el tiempo y esfuerzo necesarios para la elaboración del injerto y la reconstrucción del tejido cuando los pacientes lo requieren. No obstante, estudios recientes han demostrado que el uso de fibroblastos autólogos resulta en mejoras funcionales y estéticas (Atiyeh y Costagliola, 2007).

### Trasplante de las células o de los injertos a la lesión

Las células cultivadas *in vitro* pueden ser trasplantadas a la lesión mediante diversas y numerosas estrategias, que incluyen desde la administración directa de las células en monocapa o en suspensión hasta la aplicación de las células en estructuras histotípicas u organotípicas (sustitutos o equivalentes epiteliales), elaboradas generalmente con andamios de soporte naturales o artificiales.

Actualmente, los esfuerzos se dirigen a la creación por ingeniería de tejidos de sustitutos organotípicos que se asemejen mejor a la microanatomía y la fisiología normales de la piel, de manera que favorezcan una mejor integración en el receptor, con poca o ninguna cicatrización y que reproduzcan y mantengan las propiedades bioquímicas, morfológicas y funcionales del tejido a largo plazo (Atiyeh *et al.*, 2005).

Las estrategias con mejores resultados implican el desarrollo de análogos dermoepidérmicos que incluyen tanto fibroblastos como queratinocitos, con células jóvenes con potencial proliferativo suficiente para sustentar la toma del injerto en el largo plazo. Para ello, las células cultivadas *in vitro* requieren de un soporte estructural para su aplicación como implante. Una de las técnicas más exitosas utiliza matrices a base de fibrina, una de las proteínas de la sangre involucradas en la coagulación, la cual puede obtenerse de forma autóloga o alogénica a partir de plasma sanguíneo irradiado y certificado de un banco de sangre. Los epitelios así creados (figura 3) permiten preparar una matriz gelificada a base de fibrina dentro de la cual se encuentran embebidos los fibroblastos y sobre la cual se inoculan los queratinocitos. Esta es la técnica que ha sido implementada y optimizada en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos.



**Figura 3.** Elaboración de un equivalente dermoepidérmico cultivado *in vitro* a base de fibrina. Los fibroblastos y queratinocitos se cultivan por separado (a); los fibroblastos son embebidos en plasma sanguíneo (b) junto con una solución de cloruro de calcio para inducir su coagulación. Los queratinocitos posteriormente se inoculan sobre esta "lámina" (c), recreando la disposición que presentan normalmente en el tejido *in vivo*.

En nuestra experiencia, la lámina dermoepidérmica puede ser sujeta al tejido receptor utilizando puntos quirúrgicos o adhesivos quirúrgicos. El éxito del implante dependerá tanto de la condición fisiológica general del paciente como del estado del tejido receptor, para lo cual es preferible contar con un buen tejido de granulación y ausencia de infecciones y de tejido necrosado. Es importante considerar que el tejido implantado es delgado, por lo que, aunque su adhesión sea buena, será una piel más frágil que la natural y, por lo tanto, más susceptible a

las tensiones mecánicas. Por otro lado, rara vez se logra mantener la población de melanocitos original del paciente, lo que resulta en que la piel del injerto sea mucho más sensible a la luz solar natural que la piel original. Sin embargo, el efecto más relevante del injerto es la inducción de la regeneración en la zona de la lesión, donde el injerto estimula la proliferación y migración de las células nativas de la piel del paciente.

Por otro lado, cuando la lesión es de gran profundidad y el tejido receptor no se encuentra en buenas condiciones, puede ser recomendable tratar la lesión primeramente con trasplantes de piel cadavérica o con aplicaciones previas de una suspensión axénica de fibroblastos autólogos embebidos en la matriz de fibrina. Esta matriz de fibroblastos autólogos en fibrina puede ser dispensada directamente sobre la herida, de manera que al gelificar se ajustará estrictamente a la forma de la lesión.

Las aplicaciones de fibroblastos en fibrina no necesariamente son permanentes, ya que no siempre estarán sujetas al tejido receptor con puntos quirúrgicos o adhesivos, pues solo se mantendrán sobre la herida durante varios días utilizando vendajes con gasa vaselinizada. Durante este período, los factores de crecimiento secretados por los fibroblastos del implante estimularán la proliferación y crecimiento de las células vivas de la lesión, preparando el tejido basal para la aplicación de equivalentes dermoepidérmicos más elaborados, tal como se describió previamente. Es poco probable que los fibroblastos de las aplicaciones iniciales se incorporen al tejido basal, pero podrán favorecer el depósito de proteínas de matriz extracelular (principalmente colágeno) sobre el lecho de la herida, lo cual contribuye a la regeneración de la lesión.

Finalmente, dado que se tarda alrededor de 2 a 4 semanas en amplificar suficiente cantidad de células para cubrir la herida, durante este período se deberá tratar al paciente con los métodos convencionales de debridación, irrigación, curación y vendaje, con el fin de evitar la deshidratación y reducir el riesgo de infección, y a la vez preparar la herida para la recepción de los implantes. En todos los casos, es posible cubrir la lesión con implantes de piel cadavérica mallada durante el período de cultivo de las células y de preparación de los equivalentes dermoepidérmicos. Además, la técnica del “emparedado”, en la cual se cubren los análogos dermoepidérmicos con piel cadavérica usualmente mallada, ha sido ampliamente recomendada con el mismo propósito de protección.

## Consideraciones finales

Los esfuerzos realizados por el ITCR en el área de ingeniería de tejidos, a través del establecimiento y optimización de procedimientos para el cultivo *in vitro* de células de piel humana, han permitido que esta tecnología se encuentre disponible para el tratamiento de pacientes con lesiones en la piel en Costa Rica. No obstante, para ampliar y difundir la implementación clínica de estos procedimientos en nuestro país resulta necesario que el personal médico y de atención clínica se familiaricen y conozcan más sobre ellos. Además, es imprescindible establecer alianzas entre el sector médico y las universidades, con el fin de posibilitar el desarrollo y traducción clínica de este tipo de productos para su uso cotidiano en la práctica clínica.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Organismo Internacional de Energía Atómica, la Caja Costarricense del Seguro Social de Costa Rica y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR por el apoyo financiero que ha permitido el establecimiento del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos. Además, agradecen al Ing. Randall Chacón, de la Escuela de Biología

del ITCR, por la revisión de este trabajo, así como a Olman Madrigal, Ricardo Alvarado, Irene Gómez, Andrea Ulloa y Susana Acosta, estudiantes asistentes del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos.

## Bibliografía

- Arango, C., Chamorro, I., Restrepo, L., Correa, L. & Henao, J. (2009). Características histológicas de piel cultivada *in vitro*. *Revista Argentina de Dermatología*, 90(4), 190-191.
- Atiyeh, B. S., Hayek, S. N. & Gunn, W. (2005). New technologies for burn wound closure and healing: Review of the literature. *Burns*, 31, 944-956. <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2005.08.023>
- Atiyeh, B. & Costagliola, M. (2007). Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: Three decades later. *Burns*, 33, 405-413. <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2006.11.002>
- Badawy, M., Abdallah, M., Larangeira, H. & Wollina, U. (2005). Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. *Egyptian Dermatology Online Journal*, 1(2), 1-25.
- Beele, H. (2002). Artificial skin: past, present and future. *Int. J. Artif. Organs*, 25(3), 163-73.
- Brychta, R., Adler, J., Rihovd, V. & Komdrkovd, J. (1994). Cultured Skin cells for treatment of Burns. *Ann. Medit. Burns Club*, 71(4), 206-208.
- Cofán, M. & Fernández-Solá, J. (1992). Cultivos celulares: utilidad en investigación biomédica. *Medicina Clínica*, 98, 782-789.
- Eckes, B., Krieg, T. & Niessen, C. (2010). Biology of the Skin. En: T. Krieg, D. Bickers y Y. Miyachi (Eds.), *Therapy of Skin Disease: A Worldwide Perspective on Therapeutic Approaches and Their Molecular Basis*. Berlin: Springer.
- Eroschenko, V. P. (2008). *Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Philadelphia, EUA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Estrada, C., Paz, C. & López, L. (2006). Ingeniería de Tejido Óseo: Consideraciones básicas. *Revista EIA*, 1(5), 93-100.
- Fitzpatrick, T. (2006). *Dermatología en medicina general*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Foster, A. & Foil, C. (2008). *Manual de Dermatología en Pequeños Animales y Exóticos*. España: BSAVA Manuales.
- Freshney, I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. New Jersey, EUA: John Wiley & Sons.
- Fuchs, E. (2009). Finding One's Niche in the Skin. *Cell Stem Cell*, 4(6), 499-502. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.001
- Gil, P. (2011). *Cultivo de Células Animales y Humanas; Aplicaciones en Medicina Regenerativa*. España: Editorial Visión Libros.
- Gómez, M. & Campos, A. (2009). *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Heron, C., Dawson, R., Freedlander, E., Short, R., Haddow, D., Brotherston, M. & MacNeil, S. (2006). Clinical experience using cultured epithelial autografts leads to an alternative methodology for transferring skin cells from the laboratory to the patient. *Regenerative Med*, 1(6), 809-821. doi:10.2217/17460751.1.6.809
- Ibisch, C., Bourdeau, P., Cadiot, C., Viac, J. & Gatto, H. (2007). Upregulation of TNF- $\alpha$  Production by IFN- $\gamma$  and LPS in Cultured Canine Keratinocytes: Application to Monosaccharides Effects. *Veterinary Research Communications*, 31(7), 835-846. doi:10.1007/s11259-007-0004-9
- Ikada, Y. (2006). *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*. Gran Bretaña: Elsevier.
- Kanitakis, J. (1998). Inmunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 8(8), 539-547.
- Leigh I. & Birgitte E. (1994). *Keratinocyte methods*. Gran Bretaña: Editorial Universidad de Cambridge.
- MATES (Multi-Agency Tissue Engineering Science). (2007). Advancing Tissue Science and Engineering: A Foundation for the Future. FDA/NIST. En: *Workshop on In Vitro Analysis of Cell/Scaffold Medical Products*. Recuperado de: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/NewsEvents/WorkshopsMeetingsConferences/UCM096128.pdf>

- Muffler, S., Stark, H., Amoros, M., Falkowska-Hansen, B., Boehnke, K., Bühring, H., Marmé, A., Bickenbach, J. R. & Boukamp, P. (2008). A Stable Niche Supports Long-Term Maintenance of Human Epidermal Stem Cells in Organotypic Cultures. *Stem Cells*, 26: 2506-2515. doi: 10.1634/stemcells.2007-0991
- Pavletic, M. (1991). Anatomy and circulation of the canine skin. *Microsurgery Research*, 12(2), 103-112. doi: 10.1002/micr.1920120210
- Prost-Squarcioni, C. (2006). Histologie de la peau et des follicules pileux. *Medicine/Science*, 22(2), 131-137.
- Radostits, O., Houston, D. & Mayhew, I. (2002). *Examen y diagnóstico clínico en veterinaria*. Madrid: Elsevier.
- Rheinwald, J. & Green, H. (1975). Serial cultivation of strain of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6, 331-344.
- Rittié, L. & Fisher, G. (2005). Isolation and Culture of Skin Fibroblasts. *Fibrosis Research: Methods and protocols*, 117(2), 83-98. doi: 10.1385/1-59259-940-0:083
- Sánchez, I., Quesada, A. & Cedeño, M. L. (2010). Lesiones elementales en dermatología. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 594, 345-348.
- Smaldone, S., Olivieri, J., Gusella, G. L., Moroncini, G., Gabrielli, A. & Ramírez, F. (2011). Ha-Ras stabilization mediates pro-fibrotic signals in dermal fibroblasts. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 4, 1-10. doi: 10.1186/1755-1536-4-8.
- Tacchi, H. (2008). Nuevos caminos de la terapia celular. *Insuficiencia cardiaca*, 3(1), 9-10.
- Tavira, C., Ortega, A., Dávila, I., Estrada, S. & Meneses, A. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(4): 35-46.
- Yamamoto, M. (2001). Fisiología de la piel. *Revista Peruana de Dermatología*, 11(2). ISSN versión electrónica: 1609-7203.
- Young, B., Lowe, J., Stevens, A. & Heath, J. (2006). *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*. Philadelphia, EUA: Elsevier Limited.
- Zambruno, G. & Failla, C. M. (1999). Autoimmunity of the dermal-epidermal junction. *European Journal of Dermatology*, 9(6), 437-442.

# Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos

## Skin grafts and substitutes developed by Tissue Engineering

María Inés Chaves-Rodríguez<sup>1</sup>, Laura A. Calvo-Castro<sup>2</sup>, Ricardo Alvarado-Meza<sup>3</sup>, Olman Madrigal-Monge<sup>4</sup>, Andrea Ulloa-Fernández<sup>5</sup>, Carolina Centeno-Cerdas<sup>6</sup>

---

*Fecha de recepción: 11 de febrero del 2014*

*Fecha de aprobación: 11 de mayo del 2014*

Chaves-Rodríguez, M. I.; Calvo-Castro, L. A.; Alvarado-Meza, R; Madrigal-Monge, O; Ulloa-Fernández, A; Centeno-Cerdas, C. Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos. *Tecnología en Marcha*. Edición especial Ingeniería de Tejidos. Pág 46-57.

- 1 Ingeniera en Biotecnología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: marchaves@itcr.ac.cr.
- 2 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Microbiología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ancalvo@itcr.ac.cr.
- 3 Ingeniero en Biotecnología. Investigador del Laboratorio Nacional de Nanotecnología. Costa Rica. Correo electrónico: ricardoalvarado13@gmail.com.
- 4 Ingeniero en Biotecnología. Licenciado en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: madrigal.olman@gmail.com.
- 5 Ingeniera en Biotecnología. Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: andreguf@gmail.com.
- 6 Ingeniera en Biotecnología y Máster en Ciencias Biomédicas. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ccenteno@itcr.ac.cr.

## Palabras clave

Piel; cultivo celular; ingeniería de tejidos; trasplante; injerto; equivalentes epiteliales.

## Resumen

La reconstrucción de tejidos y órganos mediante ingeniería de tejidos ha permitido la elaboración y comercialización de diversos sustitutos o equivalentes epiteliales, que han sido utilizados desde hace más de 30 años a escala internacional para el tratamiento de lesiones en pacientes humanos. Estos injertos o implantes se confeccionan con materiales biodegradables (naturales o polímeros sintéticos) que sirven como matrices para la adhesión y proliferación celular y pueden contener células de diversos orígenes (autólogas, alogénicas o xenogénicas). Su principal ventaja clínica consiste en proporcionar una reepitelización efectiva en lesiones de gran extensión, lo que es particularmente relevante cuando hay poco tejido disponible para hacer autoinjertos. Además, ofrecen una cobertura al lecho de la lesión, evitando la deshidratación y las infecciones microbianas. Sin embargo, aún existen numerosos retos para asegurar la funcionalidad inmediata y la permanencia a largo plazo de los implantes, así como la reproducción exacta de la estructura y fisiología normal del tejido. En Costa Rica, el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica cuenta con el único laboratorio en el país dedicado al cultivo *in vitro* de células de piel para la reconstrucción de equivalentes epiteliales con fines terapéuticos.

## Keywords

Skin; cell culture; Tissue Engineering; transplant; graft; epithelial equivalents.

## Abstract

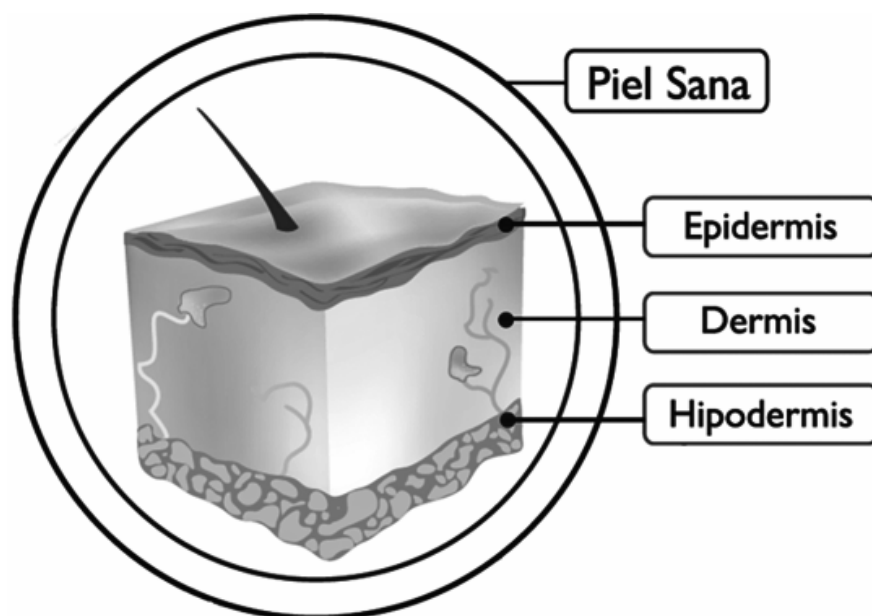
Tissue Engineering strategies for tissue and organ regeneration have allowed the fabrication and commercialization of diverse skin substitutes, which have been applied in different parts of the world on human patients over the course of the last 30 years. These grafts have been developed using biodegradable materials (of natural or synthetic origin) as scaffolds for the adhesion and proliferation of cells that may be of different origins (autologous, allogenic and xenogenic). The main clinical advantage of these materials is to provide an effective re-epitelization of large wounds, which is particularly relevant when there is little tissue available for autografts. Also, skin equivalents provide coverage for skin lesions, avoiding dehydration and microbial infections. Despite these advantages, there are still many challenges to solve including the immediate functionality and long term permanency of the grafts and the exact reproduction of the normal tissue structure and physiology. In Costa Rica, the only laboratory dedicated to *in vitro* skin cell culture for reconstructing epithelial equivalents with therapeutic applications is located at the Biotechnology Research Center at the Costa Rica Institute of Technology.

## Introducción

La ingeniería de tejidos se basa en la obtención de nuevas estructuras tisulares tridimensionales a partir de fragmentos pequeños de tejido sano. Estas estructuras reconstruidas pueden ser trasplantadas, usualmente empleando sistemas poliméricos naturales o artificiales para el soporte de las células, con el fin de restaurar la funcionalidad parcial o total de los tejidos u órganos dañados (San Román, Gallardo, Vázquez y López, 2000; Horch, 2009; Kwan, Slater, Chang, Longaker y Gurtner, 2009). Estos dos pilares fundamentales de la ingeniería de tejidos (las células y el andamio o soporte) se complementan con la adición de factores solubles, o moléculas de señalización, de origen local y sistémico, para lograr un ambiente físico-químico apropiado que permita la reconstrucción del tejido u órgano (Estrada, Paz y López, 2006). Además, la materia prima para los injertos puede ser de origen autólogo (del mismo individuo) o alogénico (proveniente de un donador) (Böttcher-Haberzeth, Biedermann y Reichmann, 2010 y Boyce y Warden, 2002).

Si bien se han hecho grandes avances en la producción de este tipo de sustitutos, aún existen algunos problemas relacionados con el desarrollo de estructuras que ofrezcan una funcionalidad inmediata y óptima después del trasplante. En este sentido, los retos actuales incluyen la elaboración de tejidos de larga duración y adecuada vascularización (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

Las siguientes páginas resumen el estado actual de la tecnología en el desarrollo de equivalentes dermoepidermales para el tratamiento de lesiones o afecciones de la piel (Fig. 1). Esta área de estudio de la ingeniería de tejidos ha cobrado gran importancia tanto dentro como fuera de nuestro país, y en ella se han centrado los esfuerzos multidisciplinarios del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR).



**Figura 1.** Estructura general de la piel humana. Como se observa en la ilustración, la piel está conformada por tres estratos: la *epidermis*, compuesta principalmente por células llamadas queratinocitos; la *dermis*, que es tejido conjuntivo de soporte compuesto principalmente de fibroblastos embebidos en matriz extracelular; y la *subdermis* o *hipodermis*, constituida principalmente por tejido graso.



## Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos

De acuerdo con Brychta, Adler, Rihovd y Komdrkovd (1994), el desarrollo de sustitutos o injertos mediante ingeniería de tejidos para el tratamiento de daños en la piel dio sus primeros pasos en 1950, cuando se logró la separación enzimática de la epidermis y la dermis utilizando tripsina, pero sin destruir la viabilidad de las células epiteliales. A inicios de 1960 se demostró que los queratinocitos pueden sobrevivir en cultivo artificial, mientras que en 1975 Rheinwald y Green publicaron el trabajo de referencia sobre el crecimiento y proliferación de células cutáneas *in vitro*, a partir del cual lograron desarrollar un epitelio trasplantable.

El trabajo de Rheinwald y Green (1975) permitió no solo establecer el cultivo *in vitro* de queratinocitos, sino que para 1978 se logró su cultivo en forma de pequeñas láminas para implante, y para la década de 1980 se inició la aplicación clínica de cultivos autólogos y se desarrollaron alternativas dermales sintéticas (Chern, Baum y Arpey, 2009). Sin embargo, no fue hasta la década de 1990 cuando se comprendió la codependencia entre queratinocitos y fibroblastos y, poco después, se determinó que los queratinocitos no son capaces de sobrevivir a largo plazo en caso de provenir de un donador alogénico. Sin embargo, desde 1995 se ha reportado la reconstrucción de amplias regiones de piel dañada utilizando cultivos autólogos de células epidérmicas en colágeno bovino y otras matrices de soporte análogas a las estructuras reales *in vivo* (MacNeil, 2007).

Se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar sustitutos de piel sin necesidad de donantes, los cuales permitan aumentar la disponibilidad de piel para injertar en caso de lesiones masivas. En este aspecto, se debe tener en cuenta que se considera que cualquier lesión cutánea de más de 4 cm de diámetro no sanará correctamente sin un implante. Aunque hasta ahora no se ha podido reconstruir en su totalidad la compleja estructura de la piel, se han desarrollado diversos tipos de equivalentes monocapa o multicapa (cuadro 1), donde la monocapa más simple es equivalente a una lámina o a una suspensión de queratinocitos autólogos (Hierner *et al.*, 2005).

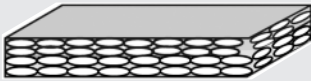
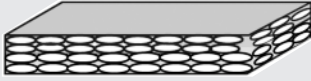

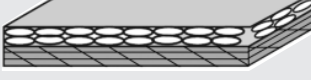

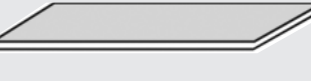
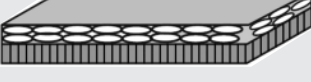
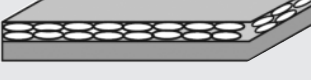
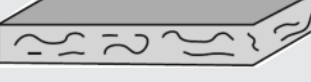
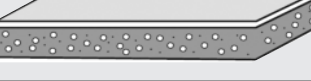

Como características ideales para estos sustitutos se busca que sean capaces de resistir infecciones y soportar la hipoxia en la lesión, así como que sean resistentes, costo-eficientes, fáciles de preparar, almacenar, usar y adquirir, con espesor flexible, ausencia de inmunogenicidad, resistencia a microorganismos y estabilidad a largo plazo. Además, es deseable que provean de cobertura permanente a la herida, recreando los componentes dérmicos y epidérmicos naturales (Chern *et al.*, 2009 y Shores, Gabriel y Gupta, 2007).



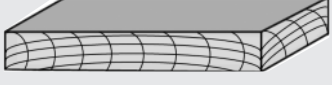
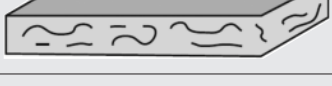
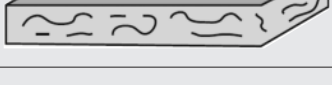

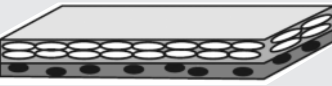

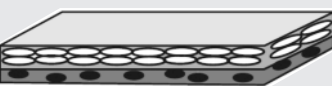
**Cuadro 1.** Tipos de implantes para el tratamiento de lesiones en la piel.

Tipo de implante	Descripción
Tejidos naturales	Injertos de piel propia (autoinjertos), de un donante (aloinjertos) o de origen animal (xenoinjertos). También se utiliza membrana amniótica.
Sustitutos artificiales de la piel	Láminas y matrices poliméricas, de estructura usualmente porosa y de origen artificial, que pueden usarse como recubrimiento temporal análogo de la epidermis y la dermis.
Matrices dérmicas acelulares	Tejido epitelial, usualmente de origen animal, tratado química o físicamente para eliminar todas las células dérmicas y epidérmicas, dejando solo la matriz extracelular biológicamente activa.
Tejidos cultivados	Fibroblastos humanos embebidos en una matriz de soporte, con o sin una capa superficial análoga a la epidermis que contiene únicamente queratinocitos. Pueden ser producidos de forma autóloga o alogénica.

Durante los últimos 30 años se han desarrollado y comercializado varios productos del tipo implante como sustitutos temporales o permanentes de la piel (Cuadro 2). Funcionalmente, su principal alcance ha sido proporcionar una cobertura al lecho de la lesión, evitando la deshidratación y las infecciones. Estos productos contienen células de diversos orígenes (autólogo, alogénico o xenogénico) y materiales biodegradables (naturales o polímeros sintéticos) que sirven como matrices para la adhesión y proliferación celular, al mismo tiempo que facilitan la manipulación para la aplicación terapéutica (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

**Cuadro 2.** Algunos productos comerciales desarrollados mediante la ingeniería de tejidos para el tratamiento de lesiones en la piel.

Clasificación	Producto comercial	Estructura	Composición
Sustitutos de la epidermis	Epicel™ (Genzyme Corporation)		Queratinocitos autólogos cultivados.
	EpiDex® (Euroderm-Biotech AG)		Autoinjerto epidérmico cultivado (células del folículo).
	LaserSkin™ (Fidia Advanced Biopolymers)		Queratinocitos autólogos sobre matriz de ácido hialurónico.
	Myskin (Celltran Ltd.)		Queratinocitos autólogos cultivados sobre una capa de silicón con plasma.
	ReCell® (Clinical Cell Culture C3 Ltd.)		Suspensión celular autóloga de queratinocitos.
	Suprathel® (Institute of Textile and Process Engineering)		Capa delgada a base de ácido poliláctico.
	Vivoderm™ (ER Squibb & Sons Inc.)		Queratinocitos autólogos sobre matriz de ácido hialurónico.
Sustitutos de la dermis	Aloinjerto cadavérico (Bancos de tejidos)		Piel alogénica criopreservada, glicerolada, liofilizada y/o irradiada.
	Alloderm® (LifeCell)		Aloinjerto de dermis acelular.
	Biobrane™ (Bertek Pharmaceuticals Inc.)		Capa delgada de silicón y malla de nylon sobre una capa de colágeno.
	Dermagraft® (Advanced Biohealing Inc.)		Fibroblastos neonatales inoculados en una matriz bioabsorbible.

Clasificación	Producto comercial	Estructura	Composición
Sustitutos de la dermis	ICX-SKN (Intercytex, Ltd.)		Fibroblastos alogénicos en su propia matriz extracelular.
	Integra® (Integra Life Sciences Corporation)		Capa delgada de silicón sobre una capa de colágeno tipo I bovino y glicosaminoglicano de tiburón.
	Matriderm® (Dr. Suwalackk Skin & Health Care AG)		Colágeno dermal bovino tipo I, III y V y elastina.
	OASIS (Healthpoint)		Matriz natural intacta derivada de la submucosa del intestino delgado porcino.
	Permacol™ (Tissue Science Laboratories)		Xenoinjerto de colágeno de dermis porcina acelular.
	TransCyte® (Advanced Biohealing Inc)		Fibroblastos neonatales humanos cultivados en colágeno y cubiertos por una capa de silicón y malla de nylon.
Sustitutos dermoepidérmicos	Apligraf® (Organogenesis Inc. y Novartis Corp.)		Queratinocitos neonatales humanos sobre una capa de colágeno bovino tipo I con fibroblastos neonatales.
	OrCel® (Ortec International, Inc., Forticell Bioscience Inc.)		Esponja de colágeno bovino tipo I embebida con fibroblastos humanos neonatales con una cubierta de queratinocitos humanos neonatales o autólogos cubiertos de gel.
	Autoinjertos cultivados <i>in vitro</i>		Fibroblastos y queratinocitos autólogos cultivados <i>in vitro</i> .

Compilado de Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010; Boyce y Warden, 2002; Jones, Lachlan y Robin, 2002; Flaszka *et al.*, 2007; Shores, Gabriel y Gupta, 2007 y MacNeil, 2007. Las estructuras son interpretaciones ilustrativas de los autores basadas en la descripción de la composición de los productos. La clasificación en el grupo “Sustitutos dermoepidérmicos” se refiere a materiales que contienen tanto queratinocitos como fibroblastos, aunque otros de los productos en esta lista también podrían cumplir la función dermoepidérmica.

## Origen del tejido y/o de las células para los sustitutos de piel

### Autoimplantes (autoinjertos)

El donador del material que compone el injerto es el mismo receptor, lo cual implica que no hay riesgo de rechazo del implante, ya que no existen problemas de compatibilidad (Wysocki y Dorsett-Martin, 2008). La principal desventaja que presentan los autoinjertos es que,

irremediablemente, se debe generar una lesión en el sitio donador, lo que involucra dolor, cicatrización y riesgo de infección adicional a la de la lesión original. Además, en caso de pérdida de grandes áreas de piel como, por ejemplo, en los grandes quemados, no existen zonas donadoras suficientes para implantar las regiones dañadas (Loss, Wedler, Kunzi, Meuli-Simmen y Meyer, 2000).

Los autoinjertos pueden ser de piel natural o de piel cultivada *in vitro*. Los autoinjertos cultivados *in vitro* tampoco presentan riesgo de rechazo pero son frágiles y deben ser manejados con cuidado y experticia, ya que las lesiones son susceptibles a reaperturas y contracciones de las cicatrices (Barret, Wolf, Desai y Herndon, 2000). La fragilidad durante los primeros días de trasplante se asocia principalmente al epitelio no cornificado y a la unión dermoepidérmica (lámina basal) incipiente, factores que hacen que esta alternativa sea más susceptible a la infección bacteriana y daño mecánico que los injertos mallados de piel natural (Reinhart *et al.*, 2007).

Sin embargo, los autoinjertos cultivados *in vitro* han sido utilizados clínicamente desde 1981 como cobertura permanente, y permiten cubrir lesiones de una gran área superficial a partir de una pequeña biopsia obtenida del mismo paciente, aunque la producción de suficiente material para injertar puede tomar de 3 a 4 semanas (Loss *et al.*, 2000 y Barret *et al.*, 2000). Las experiencias con estos injertos son diversas, pero mayoritariamente se reportan resultados cosméticos superiores y disminución en las tasas de mortalidad. Las principales limitaciones incluyen estadías hospitalarias más prolongadas y costos hospitalarios elevados, así como la desincronización entre los requerimientos del paciente y el tiempo que toma cultivar el autoinjerto, lo que ha restringido su uso generalizado (Barret *et al.*, 2000 y Herson *et al.*, 2006).

### Aloimplantes (aloinjertos)

Se trata de injertos en los que el donador y el receptor son individuos diferentes pero de la misma especie, de manera que su principal ventaja consiste en su mayor disponibilidad. Los aloinjertos pueden ser obtenidos a partir de donantes vivos o fallecidos. La piel cadavérica, por ejemplo, se obtiene a partir de bancos de piel sin fines de lucro (Jones, Lachlan y Robin, 2002). Al igual que los xenoinjertos, los aloinjertos estimulan la formación de tejido de granulación, lo que facilita implantes posteriores; sin embargo, debido a que la piel es altamente inmunogénica, los aloimplantes son rechazados en aproximadamente 10 días, por lo que su carácter temporal constituye su principal limitación. En pacientes con quemaduras extensas, este período de rechazo suele prolongarse (Wysocki y Dorsett-Martin, 2008). Al igual que los autoinjertos, los aloimplantes pueden ser de piel natural o piel cultivada *in vitro*.

Los aloinjertos cultivados *in vitro* pueden obtenerse y prepararse previamente a partir de donantes vivos o piel cadavérica; además, pueden utilizarse en fresco, criopreservados o liofilizados. La liofilización permite almacenarlos convenientemente a temperatura ambiente; además, gracias a la criopreservación, se han establecido bancos de aloinjertos que presentan una funcionalidad comparable a la de los aloinjertos frescos (Kamolz, Lumenta, Kitzinger y Frey, 2008 y Chern *et al.*, 2009). Todos los aloinjertos requieren un estricto control, mediante análisis serológicos y microbiológicos, para evaluar la presencia de enfermedades infecciosas en el material (Chern *et al.*, 2009); cualquier tejido contaminado debe ser descartado. Al igual que los autoinjertos cultivados *in vitro*, los aloinjertos cultivados se limitan al tratamiento de lesiones de profundidad parcial (Wysocki y Dorsett-Martin, 2008), aunque en nuestra experiencia se han obtenido resultados exitosos en lesiones de gran profundidad, incluso con músculo y hueso expuestos.

Por otro lado, aunque se ha demostrado que existe tolerancia inmunológica a largo plazo a los fibroblastos alogénicos, para la incorporación adecuada y permanente del injerto al tejido

basal de la lesión es esencial el uso de queratinocitos autólogos. Además, estudios recientes han señalado que el uso de fibroblastos autólogos resulta en mejoras funcionales y estéticas (Atiyeh y Costagliola, 2007).

Cabe mencionar que cuando se hace referencia a los implantes o injertos de piel natural (de donante vivo o cadavérico), existen diferencias estructurales, funcionales y aplicadas respecto a si se trata de tejido de espesor total o parcial. Los injertos de espesor parcial, que incluyen la epidermis completa y parte de la dermis, se recomiendan para lesiones de textura irregular, y suelen presentar mayor éxito en la toma del injerto, aunque pueden contraerse; pueden ser mallados para cubrir mayor superficie y permitir el intercambio de exudados y el flujo de sangre a través de la lesión. No obstante, esta alternativa produce resultados estéticos inferiores, ya que puede producir hipopigmentación o hiperpigmentación (Wysocki y Dorsett-Martin, 2008), así como cicatrización hipertrófica o queloide, la cual puede causar severas discapacidades y desfiguraciones (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

Por su parte, los injertos de espesor completo, que incluyen la dermis y la epidermis completas, se utilizan en lesiones pequeñas y profundas (usualmente en zonas anatómicas como articulaciones y palmas de las manos y pies), confieren mayor elasticidad, mejor protección, mejores resultados cosméticos, son más resistentes, presentan mejor compatibilidad (Wysocki & Dorsett-Martin, 2008) y usualmente no causan cicatrización anómala (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

### Xenoinjertos (xenoinjertos)

Estos son injertos en los que el donador es de una especie distinta a la del receptor (por ejemplo, implantes de piel de cerdo en humanos). Su principal limitante es el alto riesgo de rechazo. Aunque la utilización de tejido natural y fresco de este tipo no es común en los países occidentales, sí lo es en Oriente debido a creencias culturales que limitan el uso de aloimplantes (Wysocki y Dorsett-Martin, 2008). Sin embargo, existen diversos productos comerciales europeos y norteamericanos (Cuadro 2) que se utilizan como sustitutos de la piel que incluyen tejidos (normalmente acelulares) o proteínas de origen animal entre sus componentes.

## Tipos de sustitutos de piel según el tejido que reemplazan

### Sustitutos de la epidermis

Estos se refieren principalmente a queratinocitos autólogos, que a menudo se cultivan en presencia de una capa de células alimentadoras (*feeder layer*). La mayoría de estos sustitutos pertenece a la categoría de *autoinjerto epidérmico cultivado*, para lo cual los queratinocitos se cultivan en láminas de células estratificadas partiendo de una biopsia de piel del mismo paciente receptor y utilizando diferentes tipos de soportes. Otro enfoque para el reemplazo celular epidérmico es el uso de cultivos de queratinocitos autólogos en suspensión, que se pueden rociar sobre el lecho de la herida inmediatamente después de haber sido preparados a partir de una biopsia en la sala de operación. Aunque este método ha demostrado una epitelización algo más rápida en la maduración epidérmica en modelos de herida, la calidad y el beneficio para el paciente en la práctica clínica son todavía objeto de debate (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

### Sustitutos de la dermis

Se trata de preparaciones con diversa estructura, composición y costo. Algunos presentan disponibilidad inmediata y pueden ser procesados para ser inmunológicamente inertes, con una vida útil prolongada y fácil manipulación. Sin embargo, requieren de al menos un

tratamiento subsecuente que cubra el tejido con células epidérmicas (Wysocki y Dorsett-Martin, 2008 y Chern *et al.*, 2009). Se debe considerar que la calidad de adhesión y cicatrización de los sustitutos epidérmicos depende de las condiciones fisiológicas de la dermis sobre la que se aplican, de manera que los sustitutos dérmicos buscan restaurar el tejido dañado, promoviendo el crecimiento de nuevo tejido y la optimización de las condiciones de curación. Así, el objetivo primordial de los sustitutos de la dermis no es reepitelizar, sino aportar la secreción de factores de crecimiento y citoquinas y el depósito de proteínas típicas de la matriz dérmica (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

### Sustitutos dermoepidérmicos

Este tipo de injertos presenta una estructura análoga a la de las capas de la piel natural. En términos de resistencia mecánica y aspecto de la cicatriz, los resultados de la aplicación de estos injertos parecen ser superiores a las técnicas convencionales (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010). Además, se han reportado disminuciones en el tiempo de cicatrización y la hiperpigmentación e hipopigmentación, así como mejorías en la flexibilidad y la calidad de la cicatrización, sin reacciones inmunológicas adversas por parte del paciente receptor. Inicialmente, estos sustitutos fueron desarrollados como vendajes; recientemente se han diseñado para estimular la reepitelización y la formación de piel nueva, gracias a la secreción de factores de crecimiento (Nie *et al.*, 2007). Los productos comerciales de este tipo (Apligraf® y OrCel®) no han reportado evidencia de rechazo inmunológico. No obstante, su costo es elevado, su vida útil no es tan prolongada y su manipulación debe ser cuidadosa (Chern *et al.*, 2009). Además, dado que los productos comerciales desarrollados utilizan piel de donantes, esto ha suscitado un debate ético sobre el uso de piel cadavérica con fines comerciales (Wysocki y Dorsett-Martin, 2008).

### Andamios para la reconstrucción de la piel

La ingeniería de tejidos se basa en el uso de células y materiales de soporte sintéticos o naturales, que pueden formar una estructura de tejido en la que se mantiene la comunicación célula-célula y las interacciones célula-matriz extracelular, en la que la matriz o andamio le da soporte y funcionalidad al tejido (Jiménez y Jiménez, 2004). Los materiales de soporte utilizados para este fin deben cumplir con características como: porosidad adecuada para favorecer la integración del tejido y la vascularización, biodegradabilidad controlada, compatibilidad histoquímica (Sachlos y Czernuszka, 2003), estabilidad a largo plazo, ausencia de inmunogenicidad y citotoxicidad, así como ser accesibles (en costo y disponibilidad) y fáciles de preparar, manipular y esterilizar.

El desarrollo de un modelo de piel *in vitro* que sea estructural y funcionalmente similar a la piel normal ha llevado al desarrollo y estudio de numerosos andamiajes poliméricos (de origen sintético o natural) que sirvan de soporte para el cultivo de las células epiteliales (Arvelo, Perez y Cotte, 2004). Los principales polímeros sintéticos biodegradables son poliésteres, polianhidros, policaprolactona, policarbonato y polifumarato, mientras que los polímeros de origen natural incluyen proteínas naturales de las matrices extracelulares como colágeno y glicosaminoglicano, ácido alginico, quitosano y otros polipéptidos (Chen, Ushida y Tateish, 2002).

En nuestro laboratorio se ha favorecido el uso de soportes tipo gel, desarrollados a base de las proteínas del plasma sanguíneo. Este tipo de geles se suelen obtener combinando la fracción del plasma sanguíneo, rico o pobre en plaquetas, con trombina calcificada, lo cual imita la reacción fisiológica que induce la polimerización de la fibrina y provoca la formación de un material biológico suave, parecido al gel (Burnouf, Radosevich y Goubran, 2004). Un factor importante en el uso de este tipo de geles es la relativamente fácil y amplia disponibilidad de plasma sanguíneo con calidad de banco de sangre.

Se ha observado que los geles basados en fibrina permiten un rápido crecimiento de los queratinocitos, brindando también una matriz ideal que permite un manejo fácil de la lámina de células para su trasplante, aparte de hacer posible cultivar grandes superficies sobre una base que sirve muy bien de equivalente dérmico (Arvelo *et al.*, 2004).

### Ventajas y desventajas de los implantes y/o sustitutos de la piel

La creación de sustitutos de la piel implica emular una serie de procesos que en el cuerpo humano suceden de manera autónoma, pero en el cultivo *in vitro* deben ser mediados de forma artificial. La ontogénesis de la piel, de ser posible, sería el método mediante el cual se lograría el desarrollo correcto de estructuras y funciones, mediado por los pasos secuenciales de citogénesis, morfogénesis, histogénesis y organogénesis. Dada la incapacidad actual de emular estos pasos, el fenotipo expresado por las células en cultivo se asemeja más al de un proceso de curación fisiológica, que incluye solo los pasos de citogénesis, morfogénesis e histogénesis, careciendo del proceso de organogénesis. Este último paso es crucial en la formación de estructuras anatómicas como las glándulas, los folículos y los nervios, y explica la inexistencia de estas estructuras en la curación postnatal (Boyce y Warden, 2002). Estos autores también mencionan una serie de limitaciones y consideraciones en el uso de sustitutos dérmicos. Entre las limitantes destacan la fragilidad mecánica, la susceptibilidad a la contaminación microbiana, bajas tasas de toma del injerto, así como un costo elevado. Por otro lado, en nuestra experiencia también ha sido relevante la necesidad de vendaje y cuidados especiales, incluyendo aplicaciones repetidas y la incapacidad de algunos pacientes de apegarse al seguimiento clínico y las recomendaciones.

En relación con los injertos cultivados *in vitro*, es importante considerar el tiempo que se requiere para alcanzar la confluencia necesaria para utilizar el cultivo de las células, lo cual debe estar sincronizado con los requerimientos de los pacientes. Además, se ha reportado que el autoinjerto debe ser utilizado en un periodo de 2 a 3 días, de lo contrario no se adhiere satisfactoriamente al lecho de la herida (Hernon *et al.*, 2006). En este sentido, uno de los principales retos de la ingeniería de tejidos consiste en la disminución del tiempo requerido para alcanzar cultivos útiles, siendo que los esfuerzos se concentran en identificar queratinocitos con alta capacidad de multiplicación y fibroblastos con mayor capacidad para actuar como capas alimentadoras (Carsin *et al.*, 2000).

Por otro lado, en los autoinjertos epiteliales cultivados obtenidos a partir de biopsias influyen factores como la asepsia de la muestra y las condiciones fisiológicas del paciente, tales como la edad y la historia clínica (si es fumador o ha sido sometido a tratamientos de quimioterapia o radioterapia); así como la secreción de exudados e infecciones en la herida. En este sentido, se ha observado que la toma del autoinjerto es más exitosa en pacientes jóvenes, debido al estado fisiológico de sus células y su mayor capacidad de respuesta para la toma del injerto (Carsin *et al.*, 2000). Además, el éxito del tratamiento depende de la naturaleza de la herida; por ejemplo, cuando la dermis se encuentra totalmente destruida, se recomienda no utilizar sustitutos epidérmicos ya que se ha reportado que en este tipo de lesiones los injertos no presentan adherencia o funcionalidad satisfactoria dada la ausencia de células madre en la dermis residual (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

En términos funcionales, algunos problemas que no han sido resueltos en la elaboración de autoinjertos cultivados incluyen dudas respecto al nivel de diferenciación que debe tener el injerto al momento de ser trasplantado, de manera que pueda sostener la regeneración del tejido a largo plazo pero que exprese su función como barrera al ser aplicado; por otro lado, no se han podido elaborar injertos con una adecuada vascularización (Böttcher-Haberzeth *et al.*, 2010).

## Consideraciones finales

En términos económicos, las alternativas terapéuticas basadas en implantes epiteliales cultivados *in vitro* reportan costos más elevados que los tratamientos convencionales, en parte debido a que se requiere de reactivos y medios de cultivo de alto costo, personal capacitado y equipos especializados de alta tecnología. Sin embargo, los pacientes que reciben las células autólogas cultivadas tiene tasas de mortalidad mucho menores que aquellos que reciben tratamientos convencionales. Al mismo tiempo, se reporta que en estos pacientes se ha reducido la necesidad de intervenciones quirúrgicas y el dolor causado por las lesiones (Coto-Segura *et al.*, 2007; Carsin *et al.*, 2000 y Wood, Kolybaba y Allen, 2006). Por otro lado, cuando las lesiones no son muy extensas ni profundas, este tipo de tratamiento sí puede representar una disminución de costos, asociados principalmente a la reducción del tiempo requerido para sanar, lo que implica menos gastos en personal médico, menos insumos y menor tiempo de internamiento.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Organismo Internacional de Energía Atómica y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), por el apoyo financiero que ha permitido el establecimiento del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos en el CIB, ITCR. Además, agradecemos a la M.Sc. Montserrat Jarquín Cordero (Escuela de Biología, ITCR), por la revisión de este trabajo.

## Bibliografía

- Arvelo, F., Pérez, P. & Cotte, C. (2004). Obtención de láminas de piel humana mediante ingeniería de tejidos. *ACV*, 55(1), 74-82.
- Atiyeh, B. & Costagliola, M. (2007). Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: Three decades later. *Burns*, 33, 405-413.
- Barret, J. P., Wolf, S. E., Desai, M. H. & Herndon, D. N. (2000). Cost-efficacy of cultured epidermal autografts in massive pediatric burns. *Ann. Surg.*, 231(6), 869-76.
- Böttcher-Haberzeth, S., Biedermann, T. & Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *Burns*, 36, 450-460.
- Boyce, S. T. & Warden, G. D. (2002). Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. *The American Journal of Surgery*, 183, 445-456.
- Brychta, R., Adler, J., Rihovd, V. & Komdrkovd, J. (1994). Cultured skin cells for treatment of burns. *Ann. Medit. Burns Club*, 71(4), 206-208.
- Burnouf, T., Radosevich, M. & Goubran, H. (2004). *Hemoderivados hemostáticos locales: sellador de fibrina y gel de plaquetas*. Québec: Federación Mundial de Hemofilia.
- Carsin, H., Ainaud, P., Le Bever, H., Rives, J., Lakhel, A., Stephanazzi, J., Lambert, F. & Perrot, J. (2000). Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: A five year single-center experience with 30 patients. *Burns*, 26, 379-87.
- Chen, G., Ushida, T. & Tateish, T. (2002). Scaffold design for Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.*, 2, 67-77.
- Chern, P. L., Baum, C. L. & Arpey, C. J. (2009). Biologic Dressings: Current applications and limitations in dermatologic surgery. *Dermatol. Surg*, 35(6), 891-906.
- Coto-Segura, P., García, E., García, V., Fueyo-Casado, A., Vázquez-López, F., Pérez-Oliva, N. & Meana-Infesta, A. (2007). Efficacy of a self-made artificial skin in the treatment of chronic ulcers. *Dermatol. Surg.*, 33(3), 392-394.
- Estrada, C., Paz, C. & López, L. (2006). Ingeniería de Tejido Óseo: Consideraciones básicas. *Revista EIA*, 1(5), 93-100.
- Flasza, M., Kemp, P., Shering, D., Qiao, J., Marchall, D., Bokta, A. & Johnson, P. A. (2007). Development and manufacture of an investigational human living dermal equivalent (ICX-SKN). *Regen. Med.* 2(6), 903-918.



- Hernon, C., Dawson, R., Freedlander, E., Short, R., Haddow, D., Brotherston, M. & MacNeil, S. (2006). Clinical experience using cultured epithelial autografts leads to an alternative methodology for transferring skin cells from the laboratory to the patient. *Regenerative Med.*, 1(6), 809-821.
- Hierner, R., Degreef, H., Vranckx, J., Garmyn, M., Massage, P. & van Brusse, P. (2005). Skin grafting and wound healing - the dermato-plastic team approach. *Clin. Dermatol.*, 23(4), 343-352.
- Horch, R. E. (2009). Tissue Engineering of Cultured Skin Substitutes. En: U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel & H. Wiesmann (Eds.), *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Alemania: Springer-Verlag.
- Jiménez, P. A. & Jiménez, S. E. (2004). Tissue and cellular approaches to wound repair. *Am. J. Surg.*, 184(5A), 56S-64S.
- Jones, I., Lachlan, C. & Robin, M. (2002). A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery*, 55(3), 185-193. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1054/bjps.2002.3800>
- Kamolz, L. P., Lumenta, D. B., Kitzinger, H. B. & Frey, M. (2008). Tissue engineering for cutaneous wounds: an overview of current standards and possibilities. *Eur. Surg.*, 40(1), 19-26.
- Kwan, M., Slater, B., Chang, E., Longaker, M. & Gurtner, G. (2009). Tissue Engineering Applications in Plastic Surgery. En: U. Meyer, T. Meyer, J. Handschel & H. Wiesmann (Eds.), *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative*. Alemania: Springer-Verlag.
- Loss, M., Wedler, V., Kunzi, W., Meuli-simmen, C. & Meyer, V. E. (2000). Artificial skin, split-thickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of TBSA. *Burns*, 26, 644-652.
- MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445, 874-880. doi:10.1038/nature05664
- Nie, X., Zhang, J. Y., Cai, K. J., Yang, M. H., Xiao, A. H., Hu, H. D., Liu, L. Y., Wang, H. J., Ning, W. & Jin, Y. (2007). Cosmetic improvement in various acute skin defects treated with tissue-engineered skin. *Artificial Organs*, 31(9), 703-710.
- Reinhart, U., Stern-Straeter, J., Riedel, K., Bran, G., Hörmann, K. & Riedel, F. (2007). Tissue engineering in head and neck reconstructive surgery: what type of tissue do we need? *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 264(11), 1343-1356.
- Rheinwald, J. & Green, H. (1975). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from teratoma. *Cell*, 6, 317-330.
- Sachlos, E. & Czernuszka, J. (2003). Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid free-form fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*, 5, 29-40.
- San Román, J., Gallardo, A., Vázquez, B. & López Bravo, A. (2000). Ingeniería de tejidos: contribución de los polímeros al desarrollo de los procesos de regeneración tisular. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 1, 5-18.
- Shores, J. T., Gabriel, A. & Gupta, S. (2007). Skin substitutes and alternatives: A Review. *Adv. Skin Wound Care*, 20,493-508.
- Wood, F., Kolybaba, M. & Allen, P. (2006). The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: A critical review of the literature. *Burns*, 32, 395-401.
- Wysocki, A. & Dorsett-Martin, W. (2008). New Advances in skin substitutes, dermal fillers and other products have expanded the surgical approaches that can be considered to cover tissue defects. *ORNurse*, 2(9), 30-38.

# Membranas de colágeno y quitosano de fuentes alternativas: evaluación para su uso potencial en ingeniería de tejidos

## Collagen and chitosan membranes from alternative sources: evaluation of their potential for Tissue Engineering applications

Silvia E. Castro-Piedra<sup>1</sup>, Laura A. Calvo-Castro<sup>2</sup>, Silvana Alvarenga-Venutolo<sup>3</sup>, Carolina Centeno-Cerdas<sup>4</sup>, Maikol Ramos-Madriral<sup>5</sup>, José Vega-Baudrit<sup>6</sup>, Vanessa Zamora-Mora<sup>7</sup>, Miguel Rojas-Chaves<sup>8</sup>

*Fecha de recepción: 26 de octubre del 2014*

*Fecha de aprobación: 14 de enero del 2015*

Castro-Piedra, S; Calvo-Castro, L. A.; Alvarenga-Venutolo, S; Centeno-Cerdas, C; Ramos-Madriral, M; Vega-Baudrit, J; Zamora-Mora, V; Rojas-Chaves, M. Membranas de colágeno y quitosano de fuentes alternativas: evaluación para su uso potencial en ingeniería de tejidos. *Tecnología en Marcha*. Edición especial Ingeniería de Tejidos. Pág 58-68.

- <sup>1</sup> Ingeniera en Biotecnología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9027. Correo electrónico: silviabiotec@gmail.com.
- <sup>2</sup> Ingeniera en Biotecnología. Máster en Microbiología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9027. Correo electrónico: ancalvo@itcr.ac.cr.
- <sup>3</sup> Máster en Ciencias de Fitomejoramiento. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-2479. Correo electrónico: salvarenga@itcr.ac.cr.
- <sup>4</sup> Ingeniera en Biotecnología. Máster en Ciencias Biomédicas. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9027. Correo electrónico: ccenteno@itcr.ac.cr.
- <sup>5</sup> Licenciado en Química Industrial con énfasis en Polímeros. Universidad Nacional de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)7075-1189. Correo electrónico: maikolramos@gmail.com.
- <sup>6</sup> Doctorado en Polímeros. Profesor catedrático del Laboratorio de Polímeros POLIUNA de la Universidad Nacional y Director del Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANOTEC-CeNAT-CONARE. Costa Rica. Teléfono: (506)2519-5835. Correo electrónico: jvegab@gmail.com.
- <sup>7</sup> Maestría en Química. Universidad Nacional de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: vzamora4@gmail.com.
- <sup>8</sup> Microbiólogo. Doctor en Ciencias Naturales con énfasis en Bioquímica. Profesor de la Escuela de Biología y Coordinador del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9406. Correo electrónico: mirojas@itcr.ac.cr

## Palabras clave

Biopolímeros; fibroblastos; andamios; UV; rayos X.

## Resumen

Los polímeros naturales, como el colágeno y el quitosano, presentan características físicas, químicas y biológicas que los hacen buenos candidatos para usarlos como soportes análogos de matriz extracelular, con potenciales aplicaciones en la ingeniería de tejidos. En el presente trabajo se evaluaron membranas biopoliméricas de colágeno y quitosano de material considerado tradicionalmente de desecho en la industria pesquera, para el cultivo de fibroblastos dérmicos. Se emplearon matrices de 100% colágeno, 100% quitosano y colágeno:quitosano en proporciones 8:2, 2:8, 6:4 y 4:6, obtenidos a partir fuentes alternativas (cáscara de camarón y piel de tilapia). El principal reto para el empleo de estos materiales en aplicaciones biomédicas es su esterilización, para lo cual se evaluaron diferentes métodos, incluyendo tratamientos químicos (etanol, antibióticos y acetona) y físicos (rayos X, radiación UVC). El único procedimiento que permitió la desinfección efectiva sin comprometer la integridad de los biomateriales fue la incubación con antibióticos y antimicóticos durante 48 horas. Además, se confirmó la adhesión y proliferación celular sobre las membranas. Estos resultados demostraron el potencial biomédico de estos materiales.

## Keywords

Biopolymers; fibroblasts; scaffolds; UV; X-rays.

## Abstract

Natural polymers such as collagen and chitosan possess physical, chemical and biological characteristics that make them good candidates as extracellular matrix scaffolds with potential applications in Tissue Engineering. In the present work, collagen and chitosan biopolymer membranes made from waste material, were evaluated for dermal fibroblasts cell culture. Several membrane compositions were analyzed, including 100% collagen, 100% chitosan, 8:2, 2:8, 6:4, 4:6 collagen-chitosan, obtained from alternative sources (shrimp shells and fish scales). Given that sterilization is one of the main challenges for using materials and devices in biomedicine, we evaluated different methods to achieve this, including chemical (ethanol, antibiotics and acetone) and physical (X-rays, UVC irradiation) treatments. Antibiotic and antifungal immersion for 48 hours was the only procedure that allowed complete sterilization without compromising the integrity of the membranes. Also, we were able to confirm cellular adhesion and proliferation on the membranes. These results demonstrate the potential of these materials to be used as scaffolds in Tissue Engineering applications.

## Introducción

La matriz extracelular de los tejidos animales está constituida por un entrelazado de heteropolisacáridos y proteínas fibrosas, que sostienen a las células para que se mantengan juntas y proveen de vías porosas para la difusión de nutrientes y oxígeno a las células individuales (Nelson y Cox, 2005). La reconstrucción de órganos y tejidos humanos *in vitro* requiere reconstruir la estructura de la matriz extracelular natural; en este sentido, diversos biopolímeros de origen natural o sintético han demostrado que pueden servir como soportes bidimensionales o tridimensionales para el cultivo celular (Han *et al.*, 2010), promoviendo la adhesión, el crecimiento y la diferenciación (Zhong, Zhang y Lim, 2010). Los polímeros naturales como el colágeno y el quitosano han sido ampliamente utilizados como andamios aplicados en la ingeniería de tejidos: Integrar®, Regen Menaflex®, Ologen® (Jana *et al.*, 2012; Parenteau *et al.*, 2010 y Van Essen *et al.*, 2013).

El colágeno es una proteína fibrosa secretada por las células en los tejidos conectivos (Nelson y Cox, 2005). Además, es uno de los principales componentes estructurales del hueso, el cartílago y la piel (Chen *et al.*, 2009) y se le considera uno de los biomateriales más prometedores para el desarrollo de aplicaciones biomédicas en ingeniería de tejidos, especialmente para la reconstrucción de piel, debido su excelente biocompatibilidad y degradabilidad, así como por su baja antigenicidad y abundante disponibilidad en mamíferos (Han *et al.*, 2010).

El quitosano es un derivado desacetilado de la quitina, un polisacárido lineal no ramificado presente principalmente en el exoesqueleto de los crustáceos y en micelios fúngicos (Howling *et al.*, 2001). En la última década ha sido ampliamente utilizado para aplicaciones en ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de acelerar la regeneración de tejidos y la síntesis de colágeno (Chen *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que los productos de degradación del quitosano no son tóxicos ni alergénicos (Kim, Lee, Chung y Yang, 2009). Asimismo, se ha observado que las membranas de quitosano proveen estabilidad mecánica y flexibilidad, mayor captación de agua y tienen propiedades bacteriostáticas y fungistáticas (Johnen *et al.*, 2008).

Aunque el colágeno y el quitosano no existen juntos como mezcla en la naturaleza (Zamora-Mora, Sibaja y Vega-Baudrit, 2010), se ha reportado que matrices que combinan ambos componentes son excelentes candidatas para la reconstrucción *in vitro* de sustitutos de la piel, ya que proveen mayor bioestabilidad y excelente biocompatibilidad (Han *et al.*, 2010).

Considerando el gran potencial de los biopolímeros en la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), en colaboración con el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional (UNA), realizó la evaluación preliminar de un biomaterial de colágeno y quitosano, con el fin de determinar su potencial uso como andamio para el cultivo de células epiteliales para aplicaciones terapéuticas en Costa Rica.

## Metodología

### Elaboración de las membranas

La elaboración de las membranas se llevó a cabo empleando colágeno y quitosano como sustrato. El quitosano grado técnico se obtuvo a partir del material de desecho pesquero de camarón camello (*Heterocarpus vicarius*). Este sustrato lo proporcionó el Laboratorio de Investigación de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA). La purificación del quitosano se realizó usando la metodología descrita por Esquivel, Moya, Sibaja y Calvo (2004).

El proceso de extracción de colágeno se hizo de acuerdo con la metodología adaptada por Zamora y colaboradores (2010), en el cual la purificación y caracterización del colágeno obtenido se lleva a cabo a partir de pieles de tilapia (*Oreochromis niloticus*).

La posterior elaboración y caracterización de las membranas de 100% m/v colágeno, 100% m/v quitosano y colágeno:quitosano en proporciones 8:2, 2:8, 6:4 y 4:6, respectivamente las realizó el POLIUNA y se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Zamora-Mora, Ramos, Sibaja y Vega-Baudrit (2012).

### Pruebas de esterilización

*Inmersión en etanol 70%*. Cada tipo de membrana fue sumergido en etanol 70% (filtrado, 0,22  $\mu\text{m}$ ). Se probaron dos tratamientos de 45 minutos y 4 horas en los que las membranas se dejaron en agitación constante.

*Exposición a luz UV (200-300nm)*. Las membranas se expusieron a luz UV (200-300nm) en un ambiente estéril durante 8 horas (4 horas por lado) y 48 horas (24 horas por lado). Posteriormente se mantuvieron en la oscuridad durante 12 horas.

*Inmersión en antibióticos y antimicóticos*. Las membranas se sumergieron en una solución de antibióticos y antimicóticos (fluconazol 100  $\mu\text{g/ml}$ , anfotericina B 0,3  $\mu\text{g/ml}$ , vancomicina 50  $\mu\text{g/ml}$ , imipenem 96  $\mu\text{g/ml}$ ), disueltos en medio de cultivo, durante 16, 24, y 48 horas a 37 °C.

*Exposición a óxido de etileno*. Las membranas se empacaron en bolsas permeables al gas (con indicador bioquímico de esterilidad) y se esterizaron en una cámara de óxido de etileno en un hospital local.

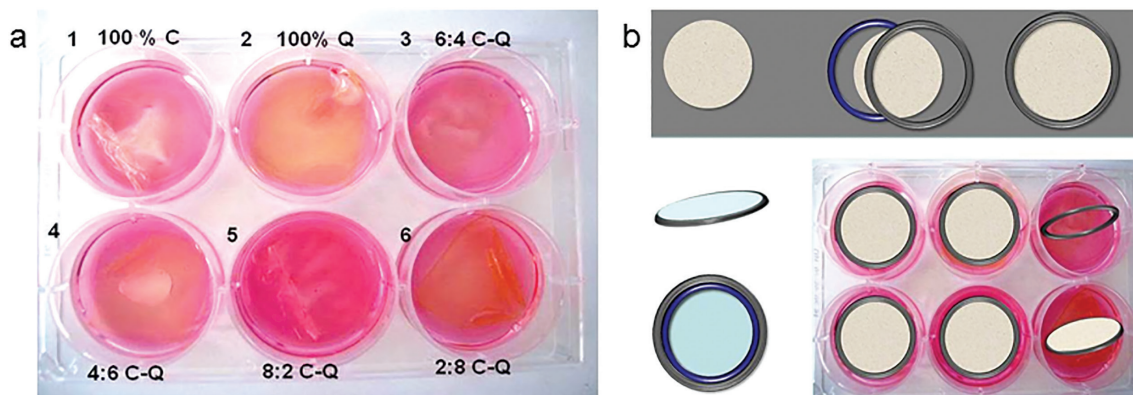
*Exposición a rayos X*. Los segmentos de membrana se expusieron a una dosis de rayos X equivalente a 50 Gy en el Laboratorio de Ensayos no Destructivos de la Escuela de Ingeniería en Materiales del ITCR.

*Inmersión en alcohol 70% y acetona*. Las muestras se sumergieron en alcohol 70% (filtrado, 0,22  $\mu\text{m}$ ), durante 5 minutos. Seguidamente se sumergieron en acetona (filtrada, 0,22  $\mu\text{m}$ ) durante 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Para cada método de esterilización se realizaron controles de contaminación microbiana en Agar Papa Dextrosa (APD) y en Agar de Recuento Estándar (ARE). Además, se llevaron a cabo comparaciones espectroscópicas infrarrojas de las membranas luego de cada tratamiento (excepto la inmersión en alcohol 70% – acetona y la exposición a rayos X) con el fin de evaluar cambios en las características físico-químicas originales de los apósitos.

*Evaluación de las membranas en las condiciones de cultivo*. Se sumergió una muestra de cada membrana en medio de cultivo celular para fibroblastos (DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2% glutamina [4 mM], 1% penicilina-estreptomina [10000 u/ml penicilina G, 10 000  $\mu\text{g/ml}$  sulfato de sulfato de estreptomina] y 1% piruvato de sodio [0.11 mg/ml], con un pH final de 7,5-7,7). Las muestras se incubaron durante una semana a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$ . Se realizaron controles microbiológicos en ADP y ARE. Dado que el proceso para la obtención de las membranas implica la disolución de los polímeros en ácido acético (Zamora-Mora *et al.*, 2010), la acidez residual de las membranas redujo drásticamente el pH del medio de cultivo (figura 1a), lo cual sería desfavorable para el cultivo celular. Por ello, en adelante se realizaron tres lavados de 5 minutos con medio de cultivo a cada membrana antes de su utilización para el cultivo celular.

*Evaluación de las membranas como soporte para el crecimiento de células dérmicas*. Ensayos preliminares demostraron que las membranas flotaron, se contrajeron y se plegaron sobre sí mismas en el medio de cultivo celular (figura 1a). Además, se ha mostrado que cuando se usan membranas biopoliméricas como soporte para el cultivo de células dermales, la distorsión en

los andamios puede causar cambios morfológicos y apoptosis en el cultivo celular, mientras que en membranas tensadas los fibroblastos humanos se alinean de forma más organizada y similar a su disposición *in vivo* (Castro-Piedra, 2009). Por ello, se confeccionaron aros de acero inoxidable que permitieron fijar y tensar espacialmente las membranas (figura 1b). Las membranas estériles fueron prensadas entre los aros (esterilizados por calor húmedo) y se inocularon con fibroblastos murinos 3T3 ( $5 \times 10^4$  células/ml). Se utilizó el medio de cultivo estándar para fibroblastos y las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente. Luego de 48 horas, se incubó cada muestra con MTT (0.5 mg/ml en medio de cultivo) por 2 horas; posteriormente, se removieron las membranas de los aros, se lavaron dos veces con PBS, se colocaron sobre un plato Petri con PBS y se observaron al microscopio.



**Figura 1.** Matrices biopoliméricas inmersas en medio de cultivo para fibroblastos (a) y diseño de los aros metálicos tipo prensa como mecanismo de sujeción para las membranas biopoliméricas (b). Nótese que, en ausencia de los aros, las matrices no están sujetas a la superficie, se encuentran flotando y presentan arrugas y dobleces.

## Resultados y discusión

*Evaluación de los métodos de esterilización.* La esterilización de las membranas biopoliméricas es fundamental para su uso en aplicaciones biomédicas. En este estudio (Cuadro 1), algunos de los métodos utilizados resultaron poco efectivos, ya que solo disminuyeron la carga microbiana, mientras que otros resultaron demasiado agresivos, afectando la integridad física y química de la matriz, lo que podría impedir la posterior adhesión y proliferación celular. A nivel macroscópico, se observó que los métodos de esterilización no alteraron significativamente la estructura de las membranas, a excepción de la esterilización con óxido de etileno.

*Etanol 70%.* Después del tratamiento, las membranas se tornaron frágiles y quebradizas, lo que podría deberse al efecto deshidratante del etanol. El nivel de fragilidad observado fue proporcional al porcentaje de colágeno presente en la membrana. Por otro lado, a pesar de reducir la carga microbiana (datos no mostrados), no se obtuvo esterilización total de ninguna de las membranas con este método, ya que se detectaron contaminantes en todos los controles microbiológicos. Sin embargo, se ha reportado que una combinación alcohol-acetona o un mayor tiempo de incubación (24 horas) presentan mayor capacidad de desinfección (Han *et al.*, 2010), tal y como se discute más adelante.

*Luz UV (200-300nm).* La luz UV forma radicales libres que oxidan las moléculas biológicas, rompe los enlaces dobles en proteínas causando su desnaturalización y genera la formación de dímeros de timina en el ADN. Lo anterior puede generar mutaciones que lleven a la

transformación de las células de forma que comprometan su viabilidad (Boyce y Flanders, 1964). Ambos tiempos de incubación (8 y 48 horas) redujeron considerablemente la carga microbiana. Sin embargo, ninguno de los tratamientos logró eliminar los contaminantes fúngicos. Además, el potencial daño oxidativo a las proteínas que componen la membrana, así como la incapacidad de este tratamiento para esterilizar efectivamente, fueron criterios para descartar este método de esterilización.

**Cuadro 1.** Determinación de la presencia de contaminación microbiana presente en matrices de colágeno:quitosano sometidas a diferentes tratamientos de desinfección

Tratamiento		100% Colágeno		100% Quitosano		6:4 C-Q		4:6 C-Q		8:2 C-Q		2:8 C-Q	
		APD	ARE	APD	ARE	APD	ARE	APD	ARE	APD	ARE	APD	ARE
Alcohol 70%	45 min	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Luz UV	8 h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	48 h	1*	1*	3*	0*	3*	0*	3*	0*	3*	0	3*	0*
AB/AM	16 h	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	24 h	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rayos X	50 Gy	NR	NR	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Alcohol	Acetona	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR

APD: agar papa dextrosa, ARE: agar de recuento estándar, OE: óxido de etileno, NR: no se realizó, AB: antibióticos, AM: antimicóticos, C: colágeno, Q: quitosano, + indica presencia de contaminantes (incontable), \* expresado en UFC (unidades formadoras de colonias).

*Antibióticos y antimicóticos.* El único tratamiento que logró esterilizar todas las muestras evaluadas fue la exposición a una mezcla de antibióticos y antimicóticos por 48 horas. Aunque este tratamiento demostró ser efectivo para la esterilización de las membranas, es laborioso y costoso. Además, implica el riesgo de crear bacterias resistentes a antibióticos o enmascarar la presencia de microorganismos de baja tasa de replicación.

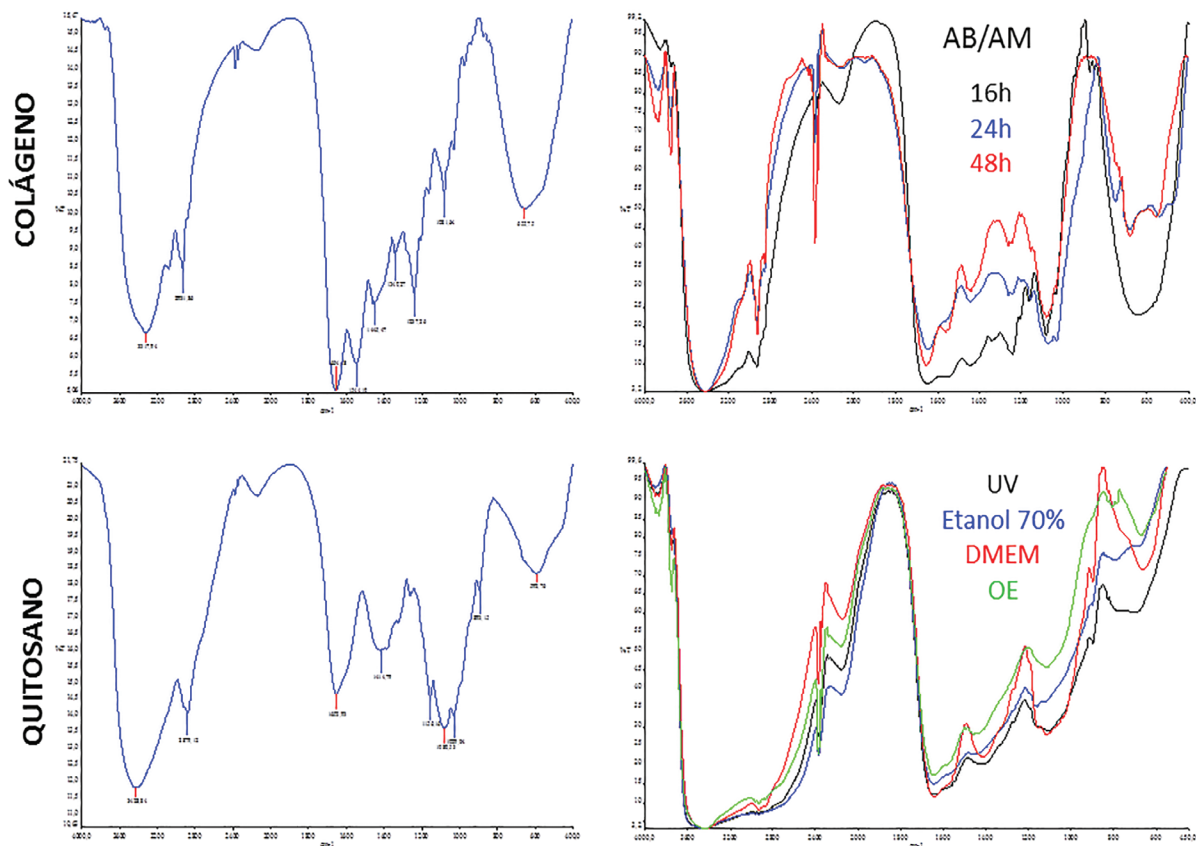
*Óxido de etileno.* Aunque este tratamiento también fue efectivo para esterilizar completamente las membranas, estas se observaron frágiles y oscurecidas, lo que sugiere que sufrieron oxidación relevante, lo cual es esperable ya que este gas basa su efectividad precisamente en una alta capacidad oxidativa de las moléculas biológicas. En efecto, como se observa en los resultados de espectroscopía infrarroja, este tratamiento fue el que causó mayores alteraciones en la composición química de las membranas (figura 2). El daño a la estructura química de las membranas descarta este procedimiento, ya que es deseable alterar lo menos posible su composición original.

*Exposición a rayos X.* Los ensayos de control microbiológico para la evaluación de la esterilidad indicaron que este método de esterilización no fue efectivo, ya que se presentó contaminación variable. Esto puede deberse a que la dosis de irradiación empleada fue relativamente baja,

por lo que se recomienda repetir estas pruebas utilizando la dosis de esterilización internacional estándar adoptada por la OIEA (25 kGy) para la esterilización de productos médicos, la cual provee un nivel de aseguramiento de la esterilidad (SAL, por sus siglas en inglés) de  $10^{-6}$  (Lobo Gajuwala, 2003). Sin embargo, esta dosis de irradiación no es alcanzable con el equipo de rayos X disponible en el ITCR, ya que está equipado con una fuente de baja intensidad.

*Inmersión en alcohol 70% y acetona.* Este ensayo de esterilización fue efectivo para reducir significativamente la carga microbiana. No se observaron contaminantes fúngicos en la primera semana de evaluación de los controles microbiológicos; sin embargo, todas las muestras incubadas en agar papa dextrosa mostraron contaminantes a las 2 semanas de incubación. Además, estas muestras también fueron evaluadas mediante incubación en caldo tioglicolato, y no se encontró turbidez luego de una semana de incubación a 37 °C.

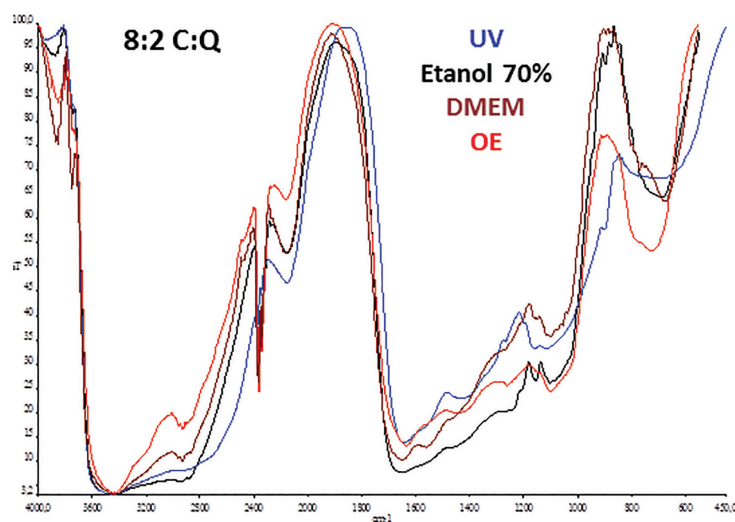
*Alteraciones físico-químicas de las membranas ante los diferentes métodos de esterilización.* En las membranas de 100% colágeno y 100% quitosano, conforme aumentó el tiempo de exposición a los antibióticos, ocurrió mayor alteración química de las membranas (figura 2). Los otros tratamientos evaluados también causaron alteraciones, principalmente el óxido de etileno.



**Figura 2.** Espectro infrarrojo (derecha) de colágeno obtenido de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y quitosano obtenido de cáscara de camarón (*Heterocarpus vicarius*). Se muestra el % de transmitancia vs. la banda de absorción ( $\text{cm}^{-1}$ ). A la izquierda, se muestra una membrana de quitosano 100% y una membrana de colágeno 100% sometidas a diversos procesos de esterilización. Los resultados para el quitosano en antibióticos y antimicóticos (AB/AM) y para el colágeno con los otros tratamientos fueron (UV: irradiación ultravioleta, DMEM: control no tratado y mantenido en medio de cultivo, OE: óxido de etileno) muy similares y no se muestran. Fuente: Laboratorio de Polímeros, UNA.

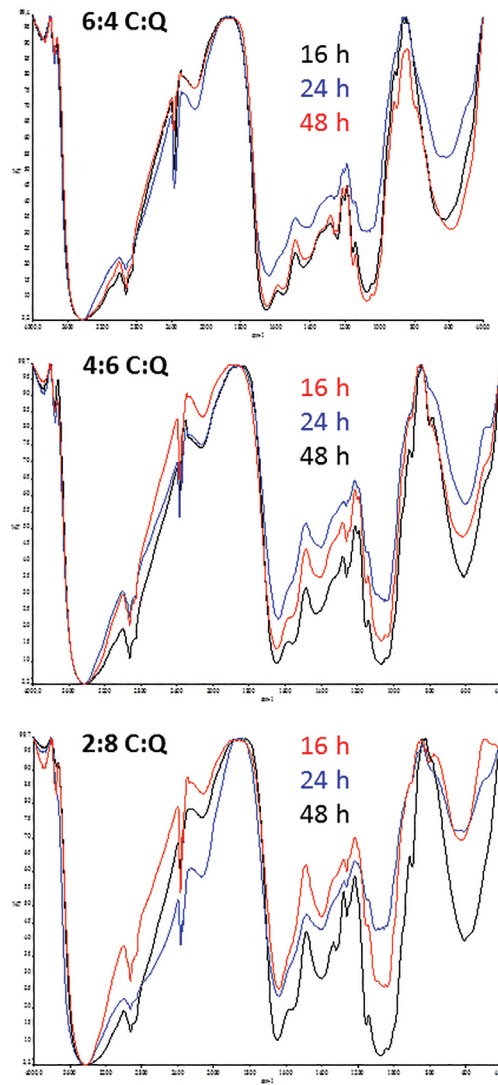


Los resultados de espectrometría infrarroja fueron similares en las matrices compuestas por 6:4 colágeno-quitosano y 4:6 colágeno-quitosano (datos no mostrados); no obstante, estas modificaciones fueron menos drásticas en comparación con la membrana 100% colágeno. Lo anterior también se reflejó en los análisis de las matrices 8:2 colágeno-quitosano, lo cual confirma que estos dos polímeros mezclados en las diferentes proporciones presentan mayor estabilidad que de forma individual (figura 3). Además, se observó que a mayor proporción de colágeno y menor cantidad de quitosano, ocurrieron menores variaciones (Fig. 4). Lo anterior sugiere que la estabilidad química de las membranas evaluadas durante su esterilización y en condiciones de almacenamiento fue directamente proporcional a la cantidad de colágeno presente en la membrana.

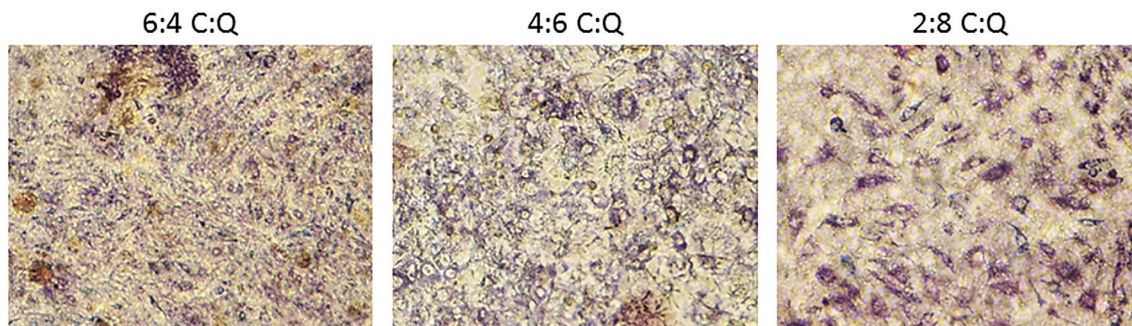


**Figura 3.** Comparación espectroscópica infrarroja (FITR) para una película de 8:2 colágeno-quitosano (C:Q), sometida a diversos procesos de esterilización, mostrados en diferentes colores. Se muestra el % de transmittancia vs. la banda de absorción (cm<sup>-1</sup>). Fuente: Laboratorio de Polímeros, UNA. UV: irradiación ultravioleta, DMEM: control no tratado y mantenido en medio de cultivo, OE: óxido de etileno.

*Evaluación de las matrices poliméricas como soporte para el crecimiento de células dérmicas.* Luego de un periodo de 24-36 horas de incubación en condiciones de cultivo celular, se observó que las matrices 100% colágeno se disolvieron por completo en el medio de cultivo para fibroblastos. Por lo tanto, en estas nuevas condiciones se observó una relación proporcional entre la cantidad de quitosano presente y la estabilidad estructural de la membrana. Por ejemplo, las membranas 8:2 colágeno:quitosano se rompieron en trozos y presentaron desgarres luego de una semana bajo las condiciones de cultivo celular. Por otro lado, al ser colocadas en una solución acuosa, las matrices presentaron la tendencia a hidratarse, a plegarse sobre sí mismas, flotar y contraerse. Esto dificultó la inoculación de células de manera homogénea sobre las matrices y la observación al microscopio para el seguimiento del crecimiento celular sobre las membranas. Sin embargo, con el uso de los aros metálicos tipo prensa, esta situación mejoró y permitió la adhesión y proliferación de los fibroblastos en las membranas 6:4, 4:6 y 2:8 colágeno:quitosano, de tal forma que los fibroblastos crecieron de manera normal sobre la membrana, lo que indica que las matrices y los aros no tuvieron efectos citotóxicos observables sobre las células (figura 5). Esto concuerda con experimentos reportados por otros autores que han utilizado andamios de quitosano recubiertos con colágeno, en los que el quitosano provee el soporte estructural y el colágeno favorece la adhesión celular (Chen *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Comparación espectroscópica infrarroja (FITR) membranas de 6:4, 4:6 y 2:8 colágeno:quitosano (C:Q), sometidas a diversos tiempos de esterilización (16, 24 y 48 h) ante una solución de antibióticos y antimicóticos. Se muestra el % de transmitancia vs. la banda de absorción (cm<sup>-1</sup>). Fuente: Laboratorio de Polímeros, UNA.



**Figura 5.** Membranas de 6:4, 4:6 y 2:8 colágeno:quitosano inoculadas con fibroblastos 3T3 (100x) teñidos con MTT

luego de 48 horas de incubación. El MTT tiñe de color morado únicamente las células metabólicamente viables.

## Conclusiones

Los métodos de esterilización utilizados no resultan por completo satisfactorios desde una perspectiva de costo-efectividad. Los ensayos realizados para evaluar la adhesión de fibroblastos a los andamios de colágeno y quitosano indicaron que las células requieren soportes con cierta tensión para que no se vean afectados aspectos de su fisiología como la organización del citoesqueleto. No obstante, bajo las condiciones evaluadas, se observó que la presencia de las membranas no interfiere con el crecimiento y la proliferación celular, lo cual sugiere que las membranas no son citotóxicas. Por otro lado, la proporción colágeno:quitosano es un factor importante a considerar en la preparación de estos apósitos, puesto que influye tanto en la estabilidad de la membrana como en la adhesión celular. Además, es imperativo estandarizar el protocolo de esterilización y optimizar el mecanismo de sujeción adecuado para la tensión de las matrices.

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Fondo Estatal para la Educación Superior (FEES). Los autores agradecen al Laboratorio de Investigación de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA, Costa Rica) y al Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANOTEC-CeNAT-CONARE, por el aporte de las membranas para la realización del estudio, por la caracterización física y química de las membranas; a la estudiante Diana Michelle López Fonseca (ITCR), por la elaboración de los aros de sujeción y el análisis de esterilización mediante rayos X; a los estudiantes Rebecca Nieto (UNA) y José Valverde (ITCR), por el cultivo celular utilizando los aros de sujeción; y a la estudiante Susana Acosta González (ITCR), por su colaboración en la redacción de este documento.

## Bibliografía

- Boyce, R. & Flanders, P. (1964). Release of ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci*, 51(2): 293-300.
- Castro-Piedra, S. E. (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*. Informe de Trabajo Final de Graduación, Bachillerato en Ingeniería en Biotecnología, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Chen, K-Y., Liao, W-J., Kuo, S-M., Tsai, F-J., Chen, Y-S., Huang, C-Y. & Yao, C-H. (2009). Asymmetric chitosan membrane containing collagen I nanospheres for skin tissue engineering. *Biomacromolecules*. 10, 1642-1649.
- Esquivel, M., Moya, M., Sibaja, M. & Calvo, M. (2004). Obtención de quitosano grado farmacéutico a partir del langostino *Pleuroncodes planipes*. III Simposio Iberoamericano de Quitina (SIAQ). 116.
- Han, C., Zhang, L., Sun, J., Shi, H., Zhou, J. & Gao, C. (2010). Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. *Biomed & Biotechnol*, 11(7), 524-530.
- Howling, G., Dettmar, P., Goddard, P., Hampson, F., Dornish, M. & Wood, E. (2001). The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes *in vitro*. *Biomaterials* (22), 2959-2966.
- Jana, S., Florczyk, S., Leung, M. & Zhang, M. (2012). High-strength pristine porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Chem*, 22, 6291-6299.
- Johnen, C., Steffen, I., Beichelt, D., Brautigam, K., Witascheck, T., Toman, N., Moser, V., Ottomann, C., Hartmann, B. & Gerlach, J. C. (2008). Culture of subconfluent human fibroblasts and keratinocytes using biodegradable transfer membranes. *Burns*, 34(5), 655-663.

- Kim, N. R., Lee, D. H., Chung, P. & Yang, H.-C. (2009). Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 108, e94-e100.
- Lobo Gajiwala, A. (2003). Tissue banking in India: Gamma-irradiated allografts. *Cell and Tissue Banking* 4, 203-211.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4 ed. W. H. Freeman.
- Parenteau, R., Gauvin, R. & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* 3, 1863-1887.
- Van Essen, T., Lin, C., Hussain, A., Maas, S., Lai, H., Linnartz, H., van den Berg, T., Salvatori, D., Luyten, G. & Jager, M. (2013). A fish scale-derived collagen matrix as artificial cornea in rats: properties and potential. *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 54(5), 3224-3233.
- Zamora-Mora, V., Sibaja, M. & Vega-Baudrit, J. (2010). Diseño de un biofilm a partir de colágeno de pieles de tilapia y de quitosano de camarón como soporte para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(7), 607-619.
- Zamora-Mora, V., Ramos M., Sibaja M. & J. Vega-Baudrit. (2012). Aprovechamiento de los desechos de las actividades acuícolas y pesqueras de Costa Rica para el Desarrollo de Biomateriales para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos. *Residuos Sólidos en Iberoamérica*, 1, 312-356.
- Zhong, S. P., Zhang, Y. Z. & Lim, C. T. (2010). Tissue scaffolds for skin woundhealing and dermal reconstruction. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 510-525.

# Evaluación de técnicas de procesamiento y almacenamiento de piel cadavérica para bancos de tejidos

## Evaluation of skin procurement and storage techniques for Tissue Banking

Laura A. Calvo-Castro<sup>1</sup>, Maritza Guerrero-Barrantes<sup>2</sup>, Andrea Ulloa-Fernández<sup>3</sup>, Rafael Portuguez-Barboza<sup>4</sup>, Carolina Centeno-Cerdas<sup>5</sup>, Miguel Rojas Chaves<sup>6</sup>

---

*Fecha de recepción: 14 de octubre del 2014*  
*Fecha de aprobación: 7 de febrero del 2015*

Calvo-Castro, L. A.; Guerrero-Barrantes, M.; Ulloa-Fernández, A.; Portuguez-Barboza, R.; Centeno-Cerdas, C.; Rojas-Chaves, M. Evaluación de técnicas de procesamiento y almacenamiento de piel cadavérica para bancos de tejidos. *Tecnología en Marcha*. Edición especial Ingeniería de Tejidos. Pág 69-82.

- 1 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Microbiología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9027. Correo electrónico: ancalvo@itcr.ac.cr.
- 2 Bióloga. Máster en Ecología. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-2479. Correo electrónico: mguerrero@itcr.ac.cr.
- 3 Ingeniera en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9027. Correo electrónico: andreguf@gmail.com.
- 4 Médico-Cirujano, Especialista en Anatomía Patológica. Departamento de Anatomía, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2511-4488. Correo electrónico: rportugu@yahoo.com
- 5 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Ciencias Biomédicas. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ccenteno@itcr.ac.cr.
- 6 Microbiólogo. Doctor en Bioquímica. Escuela de Biología; Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506)2550-9406. Correo electrónico: mirojas@itcr.ac.cr.

## Palabras clave

Irradiación con haz de electrones; solución de Dakins; glicerol; criopreservación.

## Resumen

En el presente trabajo se reproducen y analizan algunas de las técnicas más comunes a nivel internacional para el manejo de piel cadavérica para bancos de tejidos. Para ello, se llevó a cabo la ablación, el procesamiento, la desinfección y el almacenamiento de piel utilizando un modelo animal (cerdo, *Sus scrofa domesticus*). Para verificar la calidad microbiológica del tejido se compararon dos diferentes métodos de desinfección (antibióticos y desinfección química con cloro). Además, se evaluó el efecto de dos tratamientos para el almacenamiento y conservación de la piel: inmersión en glicerol a bajas temperaturas (4 °C) y criopreservación (-70 °C). Finalmente, se analizó un método de esterilización utilizando irradiación con haz de electrones (25 kGy). La estructura general del tejido se analizó mediante tinciones histológicas. Los resultados demostraron la esterilización completa de las muestras, tanto de los tejidos irradiados como en la piel glicerolada desinfectada químicamente (solución de Dakins). Por otro lado, la comparación histológica de las muestras reveló que el tejido glicerolado fue el que mostró la mejor calidad en términos estructurales.

## Keywords

Electron beam irradiation; Dakins solution; glycerol; cryopreservation.

## Abstract

Here we report how we reproduced and analyzed the most common international techniques for managing skin for Tissue Banking. Skin ablation, processing, disinfection and storage were performed using an animal model (domestic pig, *Sus scrofa domesticus*). Two different disinfection methods were compared (antibiotics and chemical disinfection with chlorine) by evaluating the microbiology profile of the tissue. Also, two different storage and preservation treatments were compared: glycerol immersion at low temperatures (4°C) and cryopreservation (-70°C). Finally, we analyzed the sterilization of the tissue by electron beam irradiation (25 kGy). General structural changes in the tissue were analyzed by histological staining. Our results show that complete sterilization of the samples was achieved in both the irradiated tissue and in the chemically disinfected glycerolated skin (Dakins solution). Histological comparison between treatments revealed that samples kept in glycerol showed the best structural quality.

## Introducción

Un banco de tejidos es una entidad que provee servicios relacionados con la conservación y distribución de células y/o tejidos provenientes de donantes vivos o fallecidos, para utilizarlos con fines terapéuticos y/o de investigación. Las actividades de un banco de tejidos incluyen tanto los estudios de viabilidad de los tejidos a partir de los donantes como su obtención, procesamiento, almacenamiento y distribución (Susó Vergara y Segur Vilalta, 2009). Además, puede actuar como una entidad centralizada para la estandarización y supervisión de protocolos para el procesamiento y almacenamiento de las muestras, y también fungir como un mediador honesto en la protección de la confidencialidad de donantes y receptores (Pollack, 2011). Su principal objetivo es garantizar la calidad de los tejidos y procedimientos de confidencialidad desde el momento de su obtención hasta el trasplante (Susó Vergara y Segur Vilalta, 2009).

Se define como aloinjerto al injerto en el cual el donante y el receptor son individuos de la misma especie (Susó Vergara y Segur Vilalta, 2009). El uso de aloinjertos de piel en pacientes humanos fue reportado por primera vez en la medicina moderna a finales del siglo XIX. Sin embargo, el desarrollo de estrategias para la conservación de este tejido ocurrió hasta inicios del siglo XX, y no fue hasta la década de 1950 que se establecieron formalmente los primeros bancos de piel (Kagan, Robb y Plessinger, 2005). Desde entonces, el uso de aloinjertos de piel humana como apósitos biológicos es considerado el tratamiento ideal para la cobertura temporal de lesiones extensas en la piel (Kagan *et al.*, 2005) o cuando no se dispone de suficiente tejido para el autoinjerto (Hautier *et al.*, 2008).

Aparte de proveer a la lesión de una cobertura, reduciendo la deshidratación y la pérdida de fluidos y de calor (Hautier *et al.*, 2008 y Kagan *et al.*, 2005), diversos estudios han descrito las propiedades curativas de los aloinjertos de piel, incluyendo la reducción de infecciones bacterianas y del dolor, así como la estimulación de vascularización y una mejor recuperación (Kagan *et al.*, 2005). Sin embargo, debido a la fuerte antigenicidad y recambio normal de la epidermis, los aloinjertos suelen ser rechazados por el receptor a las 2 o 3 semanas (Hautier *et al.*, 2008). Por ello, y a pesar de los beneficios y propiedades curativas de los aloinjertos de piel, se debe considerar que se trata únicamente de una cobertura temporal, que prepara la zona receptora para una cobertura permanente (Kagan *et al.*, 2005).

Para la posterior utilización del tejido, es necesario garantizar su adecuada conservación. A nivel internacional, se han establecido diversos protocolos que incluyen (de forma general) la conservación a corto plazo del tejido "fresco" (piel refrigerada a 4 °C), y la criopreservación y liofilización para el almacenamiento a largo plazo (Hautier *et al.*, 2008 y Kagan *et al.*, 2005). La refrigeración del tejido sumergido en soluciones nutritivas (medios de cultivo) permite mantener su viabilidad por un tiempo limitado (De, Mathur & Gore, 2008). Sin embargo, debido a la dificultad de mantener suplementos continuos y abundantes de piel fresca, la práctica estándar para los bancos de piel implica su criopreservación (Kagan *et al.*, 2005).

Por otro lado, debido a la naturaleza de su aplicación clínica, un paso crítico en el procedimiento implica la adecuada desinfección y/o esterilización del tejido. Al respecto, mientras que algunos autores toleran la presencia de bajos niveles de contaminación microbiana ( $<10^3$  organismos/g de tejido), algunas agencias exigen que el tejido se encuentre totalmente estéril para su utilización (Kagan *et al.*, 2005).

El objetivo del presente trabajo fue comparar diferentes procesos de manejo de piel cadavérica según los protocolos internacionales de los bancos de tejidos, con el fin de ofrecer un criterio técnico respecto a las técnicas disponibles en el país.

## Materiales y métodos

La metodología empleada para el procesamiento y conservación de la piel en este trabajo se basó en los protocolos del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo, España), siguiendo procedimientos internacionales estándar para bancos de piel, los cuales se pueden consultar de forma resumida en el trabajo de Kagan y colaboradores (2005).

### Toma y desinfección de muestras

Las muestras de piel se obtuvieron a partir de un cadáver de cerdo (*Sus scrofa domesticus*) eviscerado de aproximadamente 8 meses de edad, con una masa de  $\approx 120$  kg, adquirido a un productor local. La ablación de la piel se realizó dentro de las primeras 12 horas luego del fallecimiento del animal, en un área limpia. Para ello, las zonas de interés (lomo y abdomen) fueron rasuradas y luego refregadas con un jabón antibacterial comercial (Prolimza), utilizando gasa estéril. El jabón fue lavado con agua destilada estéril y suero fisiológico. Seguidamente, la piel se desinfectó con yodo povidona y etanol 70% (v/v). Finalmente, fue lubricada con glicerol puro. El tejido fue ablacionado utilizando un dermatomo eléctrico (Padgett Instruments), en láminas de 0,03 a 0,045 cm de grosor. Todas las muestras se colocaron inmediatamente en un medio de recogida DMEM con glucosa 4,5 g/L (GIBCO, Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), 3,7%  $\text{NaHCO}_3$ , 2% antibióticos (10 000 I.U.  $\text{mL}^{-1}$  penicilina y 10 000  $\mu\text{g/mL}$  estreptomina; GIBCO) y 0,5% de un antimicótico (anfotericina 25  $\mu\text{g/mL}$ ), donde permanecieron por 24 horas a 4 °C (desinfección con antibióticos). Inmediatamente después de la desinfección con antibióticos, una parte de cada fragmento de piel fue desinfectada químicamente por inmersión (3 minutos) en solución de Dakins (0,25%  $\text{NaClO}$ ) en agitación continua.

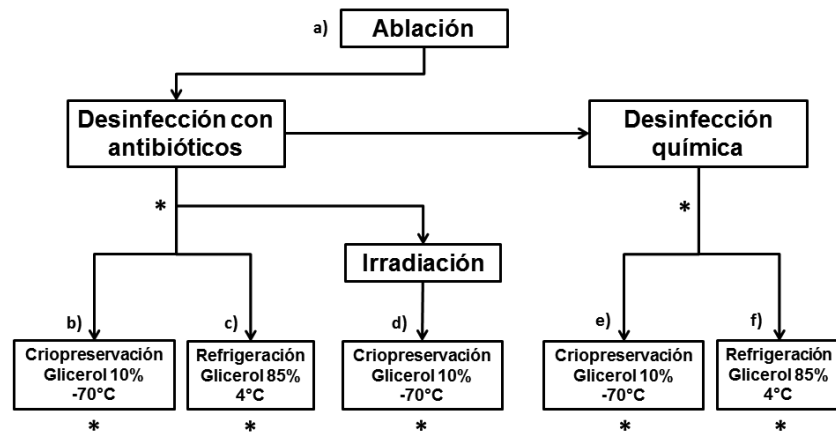
### Procesamiento del tejido

Inmediatamente después de su desinfección, y trabajando en condiciones asépticas empleando una cámara de flujo laminar de bioseguridad tipo II (ESCO), todas las muestras se sometieron a tres lavados consecutivos con suero fisiológico. El tejido se cortó en rectángulos de 5 x 10 cm y los excedentes de piel se usaron para el control microbiológico del ensayo, descrito más adelante. La metodología empleada para este trabajo se resume en la figura 1, en la que también se señalan los puntos de muestreo para los análisis histológicos y microbiológicos.

### Criopreservación

Seis de las muestras tratadas únicamente con antibióticos y tres de las muestras tratadas también con desinfección química fueron preparadas en una disposición tipo "sándwich" para su criopreservación. Para ello, se colocó una muestra de piel cortada entre dos gasas vaselinadas, sobre la cual se dispuso otra muestra de piel y finalmente otra gasa vaselinada. Esta disposición se dobló sobre sí misma en un doblez tipo carta y se colocó en bolsas plásticas metalizadas P600 (Quimifarma) de 13 x 21,5 cm con 15-30 ml (hasta cubrir por completo) de solución criopreservante (DMEM con glucosa 4,5 g/L, suplementado con 20% suero fetal bovino y 10% glicerol). Las bolsas fueron selladas herméticamente con un sellador térmico para plásticos. Para congelar el tejido, se realizó un método de descenso controlado de temperatura rápido y sencillo, colocando las bolsas a 0 °C durante 20 minutos, seguido por 2 horas de incubación a -20 °C y almacenamiento a -70 °C. El tejido se mantuvo criopreservado a esta temperatura durante 5,5 meses.





**Figura 1** Resumen de la metodología empleada en este estudio. Luego de la ablación, la piel fue lavada con suero fisiológico y desinfectada mediante dos métodos. El tejido fue almacenado por 5,5 meses en criopreservación o en conservación en glicerol en refrigeración. Además, algunas muestras del tejido fueron tratadas con irradiación con haz de electrones (25 kGy). Los asteriscos (\*) marcan los puntos de muestreo de tejido para el análisis microbiológico. Para el análisis histológico, se tomaron muestras de piel desinfectada con antibióticos y criopreservada (b); piel desinfectada con antibióticos y conservada en glicerol a 4°C (c); piel desinfectada con antibióticos, irradiada (25 KGy) y criopreservada (d); piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins y criopreservada (e); y piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins y conservada en glicerol a 4°C (f).

### Conservación en glicerol

Seis de las muestras tratadas únicamente con antibióticos y tres de las muestras tratadas también con desinfección química fueron conservadas en glicerol a bajas temperaturas (4 °C). Para ello, el tejido ya cortado se incubó sumergido en glicerol 70% a 33 °C durante 3 horas, seguido por otras 3 horas de incubación a la misma temperatura en glicerol al 85%. La piel se mantuvo durante 3 semanas en esta solución a 4 °C, tras lo cual el tejido se empacó en la misma disposición tipo “sándwich” descrita anteriormente. Tres de las muestras desinfectadas únicamente con antibióticos y gliceroladas mediante este protocolo fueron además criopreservadas en bolsas metalizadas selladas, pero empleando glicerol al 85% en lugar de solución criopreservante. El resto del tejido se almacenó a 4 °C sumergido en glicerol al 85% en bolsas metalizadas selladas o en frascos de plástico estériles con tapa de rosca.

### Esterilización por irradiación con haz de electrones

Del tejido desinfectado únicamente con antibióticos, se esterilizaron por irradiación con haz de electrones (25 kGy) tres de las muestras criopreservadas con glicerol al 10%. La irradiación se realizó por contrato en la empresa Synergy Health (Alajuela, Costa Rica).

### Análisis microbiológico

Los excedentes de piel obtenidos del tejido lavado con suero fisiológico (tres muestras procedentes de la desinfección con antibióticos y tres muestras de la desinfección química) fueron utilizados para realizar controles microbiológicos en agar Sabouraud (AS; OXOID), agar papa dextrosa (APD; OXOID) y tioglicolato (SIGMA). El tejido fue incubado sobre el medio de cultivo (en los medios semisólidos) o por inmersión (en tioglicolato) a 37 °C durante 5 días. Estos análisis se realizaron con tres muestras de piel después de cada tratamiento de desinfección.

Además, se realizó un análisis microbiológico postalmacenamiento (a los 5,5 meses), en el que se incluyeron controles en agar de recuento estándar (ARE, OXOID); sin embargo, no se realizaron controles en AS postalmacenamiento. En todos los medios semisólidos, la incubación del tejido se realizó tanto por muestreo directo (colocando un trozo de tejido sobre el medio) como por la técnica de vaciado (utilizando pequeños fragmentos del tejido disueltos en 1 ml de solución salina). En AS, APD y ARE, se tomó como resultado positivo (contaminación) la presencia de cualquier tipo de crecimiento microbiano, mientras que en el tioglicolato se tomó como resultado positivo (contaminación) la aparición de turbidez. No se cuantificó ni se identificó la carga microbiana.

### Análisis histológico

El efecto de las desinfecciones y/o del método de conservación sobre la estructura general del tejido se evaluó en tres muestras de piel de cada tratamiento (postalmacenamiento), fijadas con paraformaldehído 3,5%, y teñidas con hematoxina-eosina, tinción tricrómica de Gomori, tinción para fibras reticulares y tinción con orceína, a partir de cortes histológicos parafinados. La preparación del tejido y las tinciones se hicieron por contrato en el Departamento de Anatomía de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica. Los cortes histológicos teñidos se observaron en un microscopio Motic BA400, con una cámara digital Motic 300. Las imágenes no fueron modificadas, excepto para mejorar el brillo y/o el contraste.

## Resultados

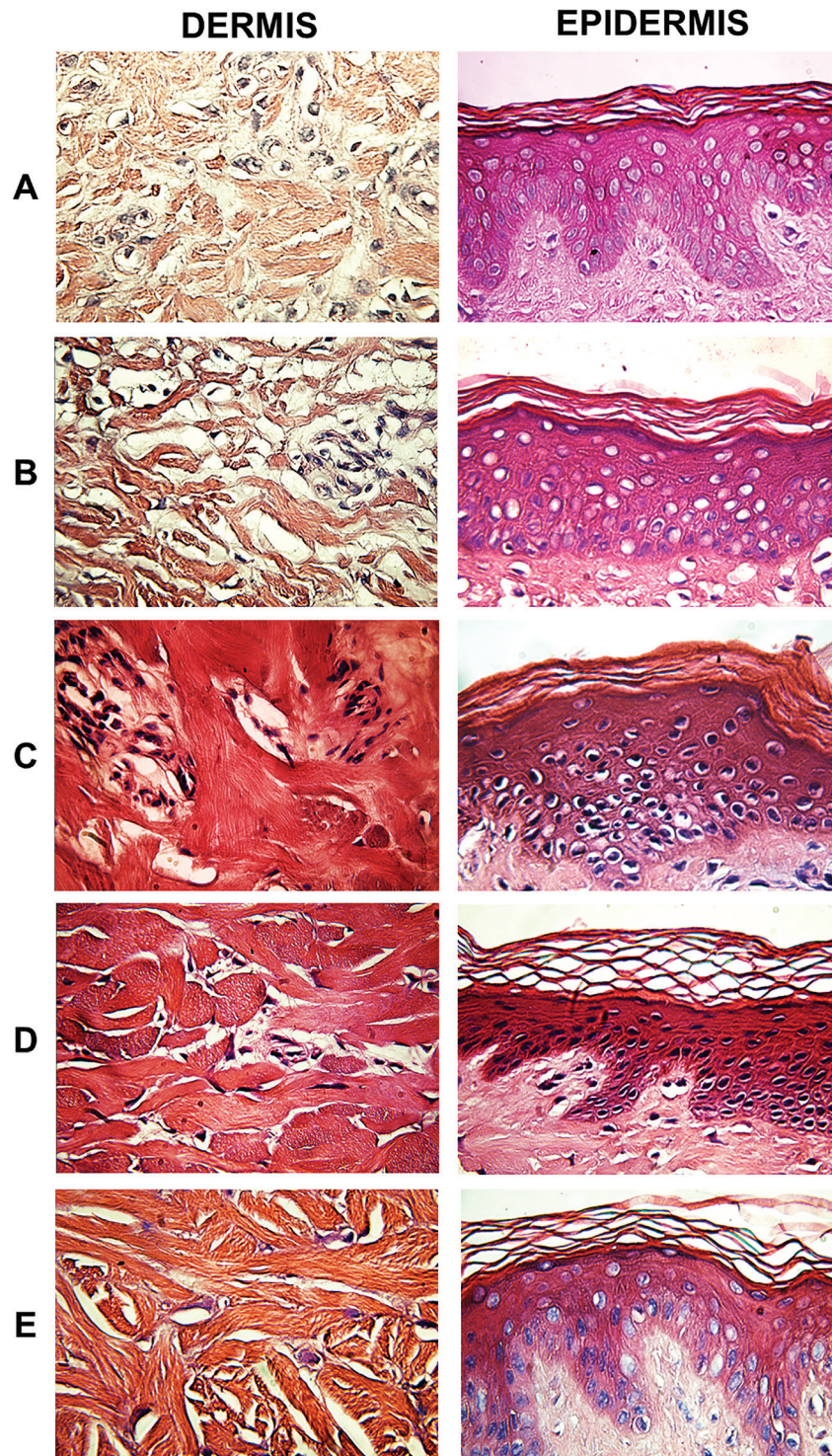
### Análisis microbiológico

En los muestreos realizados de forma previa a la conservación del tejido, se demostró presencia de microorganismos tanto en la piel desinfectada con antibióticos y químicamente (con solución de Dakins) como en la piel tratada únicamente con antibióticos. Sin embargo, para la desinfección química, la contaminación se observó únicamente en el muestreo directo en medios semisólidos (AS y APD), mientras que en la desinfección con antibióticos se observó solo en la zona anaerobia del tioglicolato. Por otro lado, en los controles realizados postalmacenamiento, se encontró contaminación microbiana (AS, ARE y tioglicolato positivos) en todas las muestras que fueron criopreservadas a -70 °C con glicerol al 10%, sin importar el método de desinfección inicial, excepto en las muestras irradiadas. Además, también se encontró contaminación microbiana (tioglicolato positivo) en la piel desinfectada únicamente con antibióticos y almacenada a 4 °C con glicerol al 85%. Por su parte, todas las muestras que fueron irradiadas, así como el tejido desinfectado químicamente y almacenado a 4 °C con glicerol, no mostraron crecimiento microbiano en ningún control.

## Histología

### Epidermis

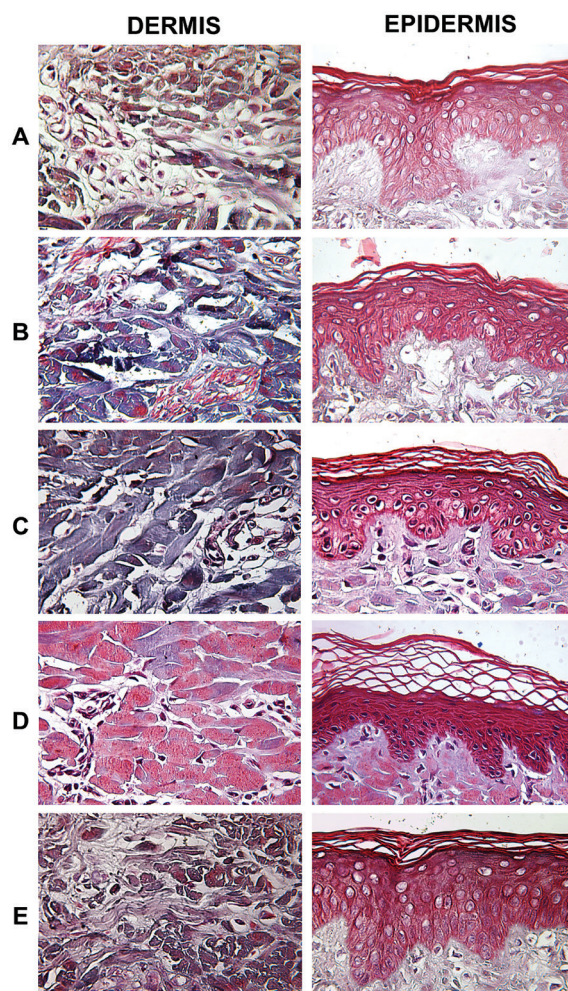
En todos los casos, la epidermis mostró conservación del patrón celular usual, con leve erosión en algunas áreas de los estratos superficiales. Esto se observó en la tinción con hematoxilina-eosina (figura 2), en la cual los ácidos nucleicos se tiñen de color azul, mientras que las proteínas se tiñen de color rojo a naranja (Cardiff, Miller y Munn, 2014). Esta tinción mostró una mejor conservación estructural de la epidermis en las muestras de piel tratadas con glicerol al 85% y almacenadas a 4 °C, incluyendo en la piel tratada con desinfección química, específicamente en términos de la conservación de los núcleos, muchos de los cuales se observan vacíos en las muestras criopreservadas.



**Figura 2.** Tinción con hematoxilina-eosina de la dermis y la epidermis de piel cadavérica (*Sus scrofa domestica*) procesada para su desinfección y almacenamiento. A, piel desinfectada con antibióticos (penicilina, estreptomicina y anfotericina) y criopreservada (-70°C, 5,5 meses); B, piel desinfectada con antibióticos, irradiada (25 KGy) y criopreservada; C, piel desinfectada con antibióticos y conservada en glicerol (85%, 4°C, 5,5 meses); D, piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins (0.25% NaClO, 3 min) y conservada en glicerol (85%, 4°C); E, piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins y criopreservada (-70 °C). Se muestra la mejor de tres réplicas (40x).

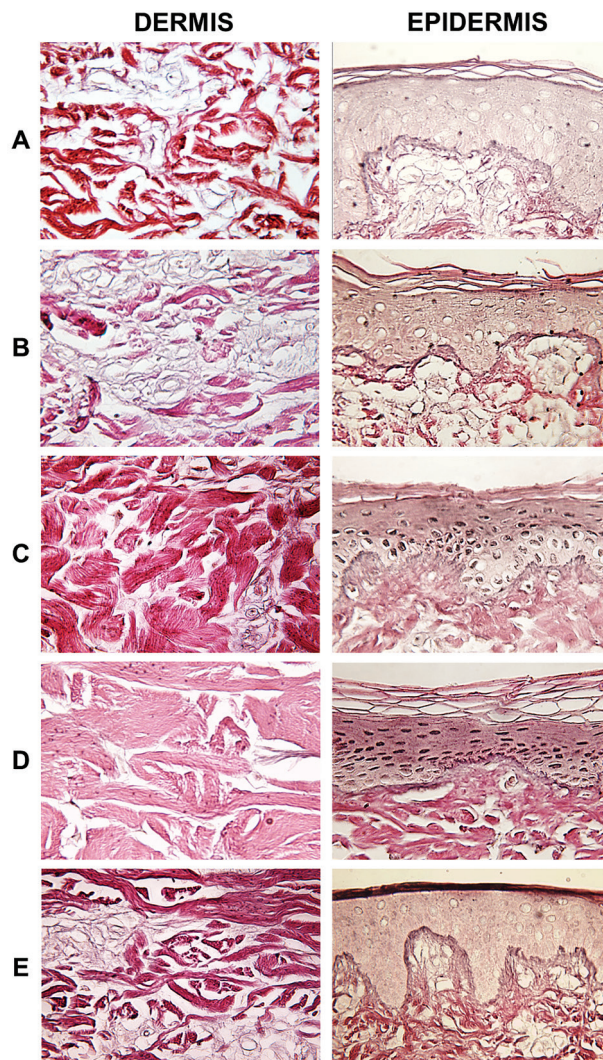
## Dermis

Además de las células residentes (mayoritariamente fibroblastos), el tejido conectivo está conformado por tres tipos principales de fibras proteicas, a saber, colágeno, fibras reticulares y fibras elásticas (Ross y Pawlina, 2010). Se realizaron tinciones selectivas para observar cada una de estas estructuras en la dermis. Al igual que con la epidermis, la tinción con hematoxilina-eosina (figura 2) mostró una mejor conservación estructural de los componentes fibrosos de la dermis en las muestras de piel tratadas con glicerol al 85% y almacenadas a 4 °C, sin importar el método de desinfección. Sin embargo, la tinción tricrómica de Gomori (figura 3) reveló gran cantidad de estructuras oxidadas (tejido de color rojo, Figs. 3D-3E), en la piel desinfectada con solución de Dakins, siendo que las fibras de colágeno tipo I (azules) se mantuvieron intactas únicamente en el tejido desinfectado solo con antibióticos (figuras 3A, 3B y 3C). De forma general, no se observó disociación de la unión dermis-epidermis en ningún tratamiento.



**Figura 3.** Tinción tricrómica de Gomori (fibras de colágeno) de la dermis y la epidermis de piel cadavérica (*Sus scrofa domestica*) procesada para su desinfección y almacenamiento. A, piel desinfectada con antibióticos (penicilina, estreptomycin y anfotericina) y criopreservada (-70°C, 5,5 meses); B, piel desinfectada con antibióticos, irradiada (25 KGy) y criopreservada; C, piel desinfectada con antibióticos y conservada en glicerol (85%, 4°C, 5,5 meses); D, piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins (0.25% NaClO, 3 min) y conservada en glicerol (85%, 4°C); E, piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins y criopreservada (-70 °C). Se muestra la mejor de tres réplicas (40x).

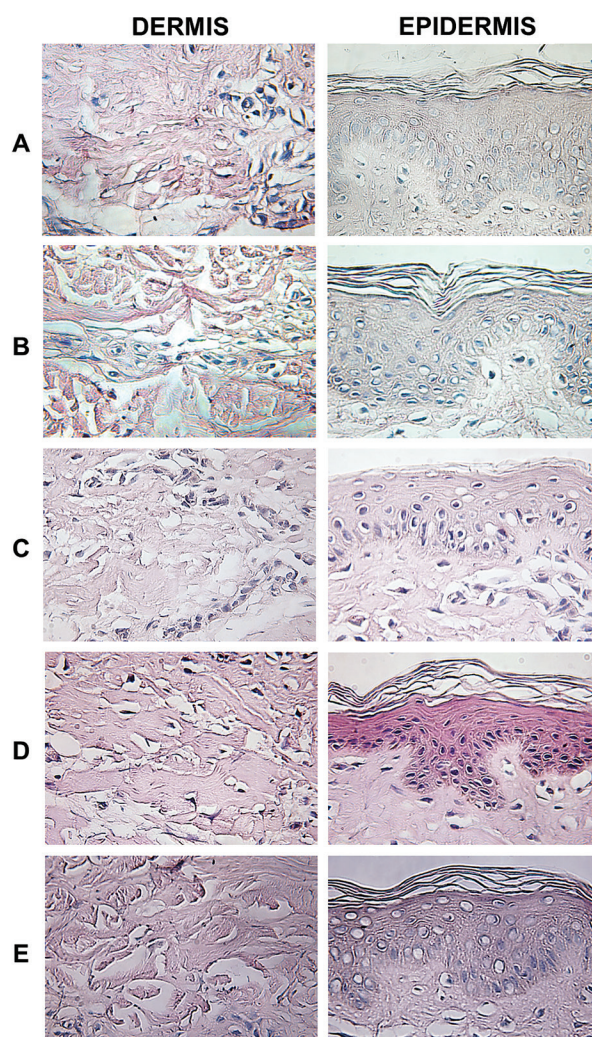
Para confirmar la conservación estructural del tejido, también se realizó una tinción de fibras reticulares (PAS, ácido periódico de Schiff) y una tinción de fibras elásticas con orceína. Las fibras reticulares son fibras de colágeno tipo III presentes en el tejido conectivo, las cuales se tiñen de color morado-magenta con la tinción del ácido periódico de Schiff (Ross y Pawlina, 2010). Los resultados obtenidos muestran mayor cantidad de estas fibras en los tejidos que no fueron tratados con glicerol (figuras 4A, 4B y 4E). Sin embargo, esto no significa que el glicerol haya dañado estas fibras, sino que es posible que no se observen en la muestra. Por su parte, la tinción con orceína se realizó para observar las fibras elásticas, las cuales no se observan claramente en ninguno de los tratamientos, aunque parecen estar levemente reducidas en la piel desinfectada con antibióticos y conservada en glicerol a 4 °C (figura 5C).



**Figura 4.** Tinción de fibras reticulares de la dermis y la epidermis de piel cadavérica (*Sus scrofa domestica*) procesada para su desinfección y almacenamiento. A, piel desinfectada con antibióticos (penicilina, estreptomicina y anfotericina) y criopreservada (-70°C, 5,5 meses); B, piel desinfectada con antibióticos, irradiada (25 KGy) y criopreservada; C, piel desinfectada con antibióticos y conservada en glicerol (85%, 4°C, 5,5 meses); D, piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins (0.25% NaClO, 3 min) y conservada en glicerol (85%, 4°C); E, piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins y criopreservada (-70 °C). Se muestra la mejor de tres réplicas (40x).

## Discusión

Formalmente desde el año 2006, el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), con el apoyo de la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA), ha implementado en el país estrategias para mejorar el tratamiento de pacientes con lesiones en la piel, principalmente a través del cultivo celular y aplicación de equivalentes epidérmicos autólogos generados *in vitro*. Además, durante el período 2009-2012, el ITCR participó en un programa regional latinoamericano (ARCAL-RLA-6062) organizado y financiado por el OEIA, con el fin de favorecer la implementación de bancos de tejidos en la región. A través de este programa, se facilitó la capacitación en esta área de profesionales de la Caja Costarricense del Seguro Social y del propio ITCR. Esto, a la vez, favoreció el establecimiento del Banco Nacional de Tejidos del Hospital Nacional de Niños, el primer banco de tejidos en Centroamérica.



**Figura 5.** Tinción con orceína (fibras elásticas) de la dermis y la epidermis de piel cadavérica (*Sus scrofa domesticus*) procesada para su desinfección y almacenamiento. A, piel desinfectada con antibióticos (penicilina, estreptomicina y anfotericina) y criopreservada (-70°C, 5,5 meses); B, piel desinfectada con antibióticos, irradiada (25 KGy) y criopreservada; C, piel desinfectada con antibióticos y conservada en glicerol (85%, 4°C, 5,5 meses); D, piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins (0.25% NaClO, 3 min) y conservada en glicerol (85%, 4°C); E, piel desinfectada con antibióticos y con solución de Dakins y criopreservada (-70 °C). Se muestra la mejor de tres réplicas (40x).

Dada la necesidad de asegurar la calidad y garantizar la optimización continua de los procedimientos, el ITCR se dio a la tarea de reproducir y analizar algunas de las técnicas más comunes a nivel internacional para el manejo de piel cadavérica para bancos de tejidos, con el fin de proveer un criterio técnico respecto a las estrategias disponibles en el país.

Para el aseguramiento de la calidad microbiológica, se siguieron las recomendaciones de Kagan y colaboradores (2005), evaluando la carga microbiana total (bacterias aerobias y anaerobias, levaduras y hongos) a partir de muestras de 1 cm<sup>2</sup> de piel por cada 10% de superficie corporal removida. Estos autores indican que la piel ablacionada no se debe utilizar como aloinjerto si contiene estafilococos coagulasa-positivos, estreptococos beta-hemolíticos del Grupo A, enterococos, organismos Gram-negativos, *Clostridia* sp., y hongos o levaduras. Sin embargo, en este trabajo no se identificaron los microorganismos contaminantes, dado que se asumió el máximo criterio de esterilización, aceptándose como válidos únicamente los tratamientos que esterilizaron por completo el tejido. En este caso, solamente la irradiación con haz de electrones (25 kGy) logró eliminar por completo la carga microbiana en todos los tratamientos, mientras que la desinfección química alcanzó este criterio solo cuando fue acompañada por la conservación en glicerol a altas concentraciones, lo cual puede atribuirse a las propiedades antibacteriales y antivirales del glicerol (De *et al.*, 2008).

Para este estudio, se utilizó la dosis de esterilización internacional estándar adoptada por la OIEA (25 kGy) para productos médicos. Esta dosis provee un nivel de aseguramiento de la esterilidad (SAL, por sus siglas en inglés) de 10<sup>-6</sup>, cuando se cuenta con una carga microbiana (*bioburden*) inicial baja. Para ello, se debe asegurar un manejo adecuado del material desde la ablación, con el fin de reducir la contaminación del tejido en cada paso del procesamiento. Sin embargo, aunque esta dosis de irradiación es suficiente para inactivar el virus de la Hepatitis C, no logra eliminar el VIH. Esto implica que, de utilizarse este método de esterilización, se debe realizar un escaneo muy estricto de los donantes, y que los tejidos deben ser manejados en condiciones asépticas y lavados y desinfectados durante el procesamiento, con el fin de reducir progresivamente la carga microbiana (Lobo Gajuwala, 2003), tal y como se hizo en este estudio.

Por otro lado, el uso de antibióticos para la desinfección del tejido se considera controversial, debido a que muchos no son efectivos a la temperatura de incubación (4 °C) y a que no se han determinado las dosis y combinaciones que garanticen la eliminación o reducción de la carga microbiana sin resultar tóxicas para los componentes celulares de la piel (Kagan *et al.*, 2005). Por otro lado, se busca reducir el uso de antibióticos con el fin de no propiciar procesos de desarrollo de resistencia a estas sustancias. En este trabajo, se demostró que la desinfección con antibióticos no fue efectiva para eliminar por completo la contaminación microbiana, ni siquiera en los casos donde se conservó la piel con glicerol a altas concentraciones (85%). Por lo tanto, se recomienda emplear este tipo de desinfección únicamente cuando sea acompañado por un tratamiento de esterilización subsecuente. Al respecto, y con base en el uso que se le quiera dar al material biológico, también se deben considerar los efectos dañinos de estos tratamientos sobre el tejido, ya que podrían destruir su viabilidad y funcionalidad, limitando su uso para trasplante, pero resultando aún funcional como cobertura temporal.

Por otro lado, aunque la transmisión de enfermedades en los trasplantes ha sido minimizada mediante el establecimiento de estrictas normas internacionales para el aseguramiento de la calidad microbiológica, se han reportado casos de transmisión de enfermedades virales y bacterianas en trasplantes de piel cadavérica (Kagan *et al.*, 2005). Así mismo, los programas de bancos de tejidos deben procurar la utilización de estrictas medidas para el aseguramiento de la calidad microbiológica de sus tejidos. Aunque la irradiación representaría el método ideal de esterilización, el sector público de Costa Rica no cuenta con las facilidades requeridas para este fin, resultando mucho más viable y económica (en tiempo y dinero) la desinfección química. Sin embargo, cabe mencionar que el ITCR, en colaboración con la OIEA, se encuentra

realizando esfuerzos para la instalación de facilidades de irradiación comercial y científica en Costa Rica, lo que podría solventar esta y otras necesidades del sector público a mediano y largo plazo.

En relación con los métodos de conservación, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron una mejor preservación de la arquitectura del tejido en las muestras de piel glicerolada (85%) mantenida en refrigeración (4 °C), incluso después de casi 6 meses de almacenamiento. No obstante, se ha demostrado que los métodos actualmente preferidos a nivel internacional para la conservación de la piel (refrigeración a 4 °C y criopreservación) no previenen la reducción en la viabilidad celular (Hautier *et al.*, 2008). Al respecto, se ha mostrado que, en el almacenamiento en refrigeración, la capacidad de crecimiento de los fibroblastos y queratinocitos decrece desde el séptimo día de almacenamiento, y se pierde casi completamente en los queratinocitos y totalmente en los fibroblastos hacia el día 35 (Hautier *et al.*, 2008). Otros autores (De *et al.*, 2008) han reportado que, en la criopreservación (-70 °C) de piel cadavérica tratada con glicerol al 15%, el tejido puede mantener la viabilidad hasta por un mes de almacenamiento, mientras que la piel refrigerada al 4 °C en PBS (sin glicerol) pierde por completo su viabilidad a las 2 semanas.

Debido a la cualidad temporal de los aloinjertos de piel, el mantenimiento de la viabilidad del tejido es también un aspecto controversial. Esto se debe a que la viabilidad y la integridad estructural son clave para la toma del injerto y la vascularización (Hautier *et al.*, 2008 y Kagan *et al.*, 2005); además, los aloinjertos de piel también pueden proveer factores de crecimiento a la herida (Hautier *et al.*, 2008). Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, es difícil mantener suplementos continuos y abundantes de piel fresca por más de dos semanas (De *et al.*, 2008). Debido a ello, aunque la piel criopreservada presenta menor viabilidad que la piel fresca, la práctica estándar para los bancos de piel implica su criopreservación. Para ello, el tejido debe ser tratado con crioprotectores y luego ser enfriado paulatinamente, hasta alcanzar los -70 °C a -100 °C, conservando hasta un 85% de su viabilidad. La piel almacenada en congeladores (-70 °C a -100 °C) puede mantenerse por 3 a 6 meses, mientras que los tejidos almacenados en nitrógeno líquido (-150 °C a -196 °C) pueden mantenerse viables hasta por 10 años (Kagan *et al.*, 2005). En el caso de este trabajo, la piel conservada en altas concentraciones de glicerol (85%) a 4 °C mostró mejor mantenimiento de la arquitectura histológica que la piel criopreservada, incluso luego de 5 meses de almacenamiento. Sin embargo, no se realizó un análisis de la viabilidad del tejido.

Por otro lado, los agentes crioprotectores son sustancias que protegen al tejido del daño mecánico que puede causar la congelación. Los dos crioprotectores más utilizados para la criopreservación de piel son el glicerol (usualmente al 15%) y el DMSO. De éstos, el glicerol es el agente preferido, debido a que no es tóxico como el DMSO y a que penetra en los tejidos lentamente. Sin embargo, a concentraciones mayores al 15%, el glicerol destruye la viabilidad del tejido (De *et al.*, 2008). Esto sugiere la ausencia total de viabilidad en la piel conservada en glicerol al 85% en este estudio, a pesar de haber mostrado la mejor preservación de la estructura tisular.

La piel, o más específicamente, su matriz extracelular, también puede utilizarse como una cobertura biológica acelular no viable (De *et al.*, 2008 y Richters *et al.*, 2008), con el fin de evitar la deshidratación y la pérdida de calor. Así, por ejemplo, la preservación del tejido en glicerol al 85% es un método económico que resulta en piel acelular pero con su estructura tridimensional intacta, con las fibras de colágeno y elastina bien preservadas. Esta matriz acelular funciona como una matriz de soporte que puede ser utilizada como cobertura temporal para el tratamiento de lesiones en la piel. Los fibroblastos y los vasos capilares del receptor pueden migrar y colonizar el tejido injertado, integrándolo a la dermis propia. Además, con el tiempo, el colágeno del tejido injertado es reemplazado por colágeno propio (Richters *et al.*, 2008).



Cabe mencionar que, debido a las dificultades para trabajar con piel cadavérica humana, especialmente debido a su gran valor clínico, en este trabajo se empleó piel animal proveniente de un cerdo doméstico para alimentación. Histológicamente, se puede observar que el tejido empleado es muy similar a la piel humana; además, se debe considerar que los xenoinjertos (cuando el donante es de una especie distinta a la del receptor) también se pueden usar como sustitutos dérmicos en humanos (Richters *et al.*, 2008).

## Consideraciones finales

A diferencia de la donación y trasplante de órganos, lamentablemente la donación de tejidos ha recibido poca atención del público, por lo que la disponibilidad de piel humana para trasplante sigue siendo limitada a nivel internacional (Kagan *et al.*, 2005). Sin embargo, según se ha divulgado en la prensa nacional en Costa Rica, para marzo de 2013, el Banco Nacional de Tejidos del Hospital Nacional de Niños (Costa Rica) había recibido donaciones de 36 donantes cadavéricos, con lo cual se han tratado 30 pacientes desde junio de 2010. Además, para 2013 este Banco contaba con aproximadamente 14 000 cm<sup>2</sup> de piel cadavérica almacenada, lo cual podría cubrir la necesidad de trasplantes durante ese año (*La Prensa Libre*, 2013).

Por otro lado, en Costa Rica, el Banco Nacional de Tejidos del Hospital Nacional de Niños y el Banco de Ojos, ambos de la Caja Costarricense del Seguro Social, son los únicos entes que actualmente almacenan tejidos para trasplantes en el país. El Banco Nacional de Tejidos almacena mayoritariamente piel cadavérica, mientras que el Banco de Ojos se dedica principalmente al almacenamiento de córneas. Esto implica que no existen en el país bancos que almacenen otros tejidos de gran demanda, como lo son el hueso y el cartílago, por lo que deben ser importados o extraídos de emergencia de forma usualmente autóloga en el momento en que se requieren, lo cual evidencia la necesidad de ampliar los programas de bancos de tejidos. Además, cabe mencionar que en el país es muy limitada la información global respecto a la cantidad, localización, tipo e histocompatibilidad de los tejidos almacenados. Instituciones de investigación y formación de recurso humano como el ITCR pueden contribuir al desarrollo de protocolos, técnicas y herramientas tecnológicas que solventen estas necesidades y trasladarlas a los profesionales en salud, que finalmente pueden hacer accesibles todos estos aspectos ventajosos a los pacientes para mejorar su calidad de vida.

Finalmente, se debe considerar que los aloinjertos proveen únicamente una cobertura temporal, preparando la zona receptora para una cobertura permanente de piel autóloga (De *et al.*, 2008). En este sentido, el uso de autoinjertos epidérmicos cultivados *in vitro*, una estrategia desarrollada y aplicada clínicamente a nivel internacional desde la década de 1980, se postula como una alternativa eficiente para mejorar la recuperación de los pacientes con lesiones en la piel. Se ha demostrado que estos equivalentes epidérmicos permiten la reepitelización de la epidermis e incluso de la piel completa (Brychta *et al.*, 2002). Al respecto, el ITCR cuenta con un laboratorio especializado para la elaboración de láminas de piel reconstruida mediante ingeniería de tejidos, la cual se ha utilizado para el tratamiento exitoso de pacientes con diversas lesiones en la piel (datos no publicados).

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Organismo Internacional de Energía Atómica y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR por el apoyo financiero que permitió la ejecución de este trabajo. Además, agradecemos al Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo, España) por la capacitación otorgada a la M.Sc. Maritza Guerrero Barrantes para el aprendizaje de los protocolos descritos en este trabajo.

## Bibliografía

- Brychta, P., Adler, J., Rihová, H., Suchánek, I., Kaloudová, Y. & Koupil, J. (2002). Cultured epidermal allografts: Quantitative evaluation of their healing effect in deep dermal burns. *Cell and Tissue Banking*, 3, 15-23.
- Cardiff, R. D., Muller, C. H. & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2(6), 655-8.
- De, A., Mathur, M. & Gore, M. A. (2008) Viability of cadaver skin grafts stored in skin bank at two different temperatures. *Indian J. Med. Res.* 128, 769-771.
- Hautier, A., Sabatier, F., Stellmann, P., Andrac, L., Nouaille De Gorce, Y., Dignat-George, F. & Magalon, G. (2008). Assessment of organ culture for the conservation of human skin allografts. *Cell Tissue Banking*, 9, 19-29.
- Kagan, R. J., Robb, E. C. & Plessinger, R. T. (2005). Human skin banking. *Clin. Lab. Med.* 25, 587-605.
- La Prensa Libre. (14 junio, 2013). *36 ticos han donado su piel. La Prensa Libre*. Obtenido de: <http://www.prensalibre.cr/lpl/nacional/79553-36-ticos-han-donado-su-piel.html>
- Lobo Gajuwala, A. (2003). Tissue banking in India: Gamma-irradiated allografts. *Cell and Tissue Banking* 4, 203-211.
- Pollack, J. R. (2011). Banking tissue specimens for research. En: F. M. Dirbas y C. E. H. Scott-Conner (Eds.), *Breast Surgical Techniques and Interdisciplinary Management*. New York: Springer.
- Richters, C. D., Pirayesh, A., Hoeksema, H., Kamperdijk, E. W. A., Kreis, R. W., Dutrieux, R. P., Monstrey, S. & Hoekstra, M. J. (2008). Development of a dermal matrix from glycerol preserved allogeneic skin. *Cell Tissue Banking* 9, 309-315.
- Ross, M. H. & Pawlina, W. (2010). *Histology: A Text and Atlas*. 6 ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Suso Vergara, S. & Segur Vilalta, J. M. (2009). Banco de tejidos del aparato locomotor. En: *Manual de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. Sociedad de Cirugía Ortopédica y Traumatología. 2 ed. Tomo 1. Madrid: Editorial Médica Panamericana.

## Cronograma 2015

	Vol. 28-1	Vol. 28-2	Vol. 28-3	Vol. 28-4	Vol. 29-1	Vol. 29-2	Vol. 29-3
Recepción de artículos	Mayo - julio 2014	Agosto - octubre 2014	Noviembre 2014 - enero 2015	Febrero - abril 2015	Mayo - julio 2015	Agosto - octubre 2015	Noviembre 2015 - enero 2016
Evaluación de expertos y aprobación	Agosto - setiembre 2014	Noviembre - diciembre 2014	Febrero - marzo 2015	Mayo - Junio 2015	Agosto - setiembre 2015	Noviembre - diciembre 2015	Febrero - marzo 2016
Revisión de estilo y corrección	Octubre 2014	Febrero 2015	Abril 2015	Julio 2015	Octubre 2015	Enero 2016	Abril 2016
Diagramación y correcciones finales	Enero 2015	Marzo 2015	Mayo - junio 2015	Agosto - setiembre 2015	Noviembre - diciembre 2015	Febrero - marzo 2016	Mayo - junio 2016
Publicación del número	Febrero 2015	Mayo 2015	Julio 2015	Octubre 2015	Febrero 2016	Abril 2016	Julio 2016



Editorial Tecnológica  
de Costa Rica

## Instrucciones para publicar en

La revista *Tecnología en Marcha* es publicada por la Editorial Tecnológica de Costa Rica, con periodicidad trimestral. Su principal temática es la difusión de resultados de investigación en áreas de Ingeniería. El contenido de la revista está dirigido a investigadores, especialistas, docentes y estudiantes universitarios de todo el mundo.

1. Los artículos deberán ser originales, inéditos y no pueden participar simultáneamente en otros procesos de publicación.
2. La extensión de los trabajos debe oscilar entre 10 y 20 páginas de 21,59 x 27.94 cm (8,5 x 11 pulgadas). Se debe presentar en un documento de Microsoft Word, con interlínea de espacio y medio, en una columna, en letra Times 12 pts.
3. Los títulos de los artículos deben ser sencillos, claros, cortos y estar en español e inglés.
4. Es necesario indicar claramente el nombre y los dos apellidos del autor, nacionalidad, profesión, teléfonos, correo electrónico, dirección exacta, lugar de trabajo y país de origen de dicha entidad.
5. Las palabras clave deben presentarse en español y en inglés. Además, el resumen debe estar compuesto por 250 palabras y aparecer en ambos idiomas.
6. Las imágenes se deben enviar en un archivo aparte del documento principal. En caso de ser escaneadas, la resolución mínima es de 300 ppi. Los formatos permitidos son: .jpg, .tiff, .eps, .psd y .ai.
7. Las fórmulas y ecuaciones matemáticas deben realizarse con el editor de ecuaciones de Word.
8. En lo pertinente, se usará el Sistema Internacional de Unidades.
9. La bibliografía debe aparecer al final del documento, ordenada alfabéticamente por el apellido del autor y de acuerdo con el formato APA (American Psychological Association) edición 2010.
10. Los documentos deberán enviarse a las direcciones electrónicas [editorial@itcr.ac.cr](mailto:editorial@itcr.ac.cr) o [alamirez@itcr.ac.cr](mailto:alamirez@itcr.ac.cr)
11. La Comisión editorial no dará trámite de edición al artículo que no cumpla con estos requisitos.

### Nota importante

Los originales serán sometidos a un proceso editorial que se desarrollará en varias fases. En primer lugar, serán objeto de una evaluación preliminar por parte de los miembros del Comité Editorial, quienes determinarán la pertinencia de su publicación. Una vez establecido que cumple con los requisitos temáticos y formales indicados en estas instrucciones, será enviado a dos pares académicos externos para decidir en forma anónima (doble ciego) si debe publicarse, si necesita cambios o si se rechaza. En caso de que ambos llegaran a discrepar, el artículo será enviado a un tercer evaluador, para tomar la decisión. Los resultados del dictamen académico serán inapelables en todos los casos. En caso de que el artículo sea aprobado para su publicación, el autor autoriza a la Editorial Tecnológica de Costa Rica para que lo incluya en la revista y pueda editarlo, reproducirlo, distribuirlo, exhibirlo y comunicarlo en el país y en el extranjero mediante medios impresos y electrónicos bajo la licencia *Creative Commons*.

# Instructions to publish in

The journal *Tecnología en Marcha* is published by the Editorial Tecnológica de Costa Rica every three months. It focuses mainly in disseminating the results of research of engineering areas. The journal's contents are intended for researchers, experts, teachers and university students around the world.

1. All articles must be originals, unpublished, and cannot be simultaneously used in other processes.
2. Papers may be 10-20 pages long (8.5 x 11 in, or 21.59 x 27.94 cm). All documents must be submitted in MS Word, 1.5 line spacing, using Times 12 pts. font and in one column.
3. Article titles must be simple, clear, short, and be included in both Spanish and English.
4. The name and (two) last names of the author should be clearly indicated, along with their profession, telephone numbers, email, physical address, place of work (organization, department, school), and where the organization is based.
5. The key words must be included in both Spanish and English. Furthermore, the abstract must be 250 words long, and should also be submitted in both languages.
6. The images must be delivered in a separate document. If scanned, the minimum resolution is 300 ppi. The formats allowed are .jpg, .tiff, .eps, .psd, and .ai.
7. Mathematical equations and formulas must be done with MS Office's Equation Editor.
8. Where necessary, use the International System of Units.
9. Bibliography will be included at the end of the document, arranged in alphabetical order based on the authors' names, and in keeping with the 2010 edition of the APA (American Psychological Association) format.
10. Papers should be sent to the following emails: [editorial@itcr.ac.cr](mailto:editorial@itcr.ac.cr), or [alramirez@itcr.ac.cr](mailto:alramirez@itcr.ac.cr)
11. The Editorial Committee will only consider for publication the articles meeting the above requirements.

## Important note

All originals will be subject to an editorial process consisting of several phases. First, a preliminary assessment will be done by members of the Editorial Committee, the Director, and the editors, who will jointly determine whether the article would make a relevant publication. After determining that an article meets the thematic and formal requirements established in these Instructions, it will be sent to two outside academic peers who will decide anonymously (double-blind) whether it should be published, if it needs any changes, or whether it should be turned down. In case of disagreement between these peers, the article will be sent to a third evaluator in order to reach a decision. In no case may the results of this decision be appealed. If the article is accepted for publication, the author authorizes the Editorial Tecnológica de Costa Rica to edit, reproduce, distribute, exhibit and communicate at the country and abroad through print media and electronic equipment under the *Creative Commons* license.