



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTANDARIZACIÓN DEL CULTIVO DE
QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS HUMANOS
PARA EL DESARROLLO DE SUSTITUTOS
BIOLÓGICOS DE PIEL, MEDIANTE TÉCNICAS DE
INGENIERÍA DE TEJIDOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

YUNUÉN ATZIN ÁVILA VERGARA



**DIRECTOR DE TESIS:
BIÓL. ANA MARÍA BRENA MOLINA
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Institucionales:

Este trabajo fue financiado por el Proyecto CONACyT SALUD-2013-201836. Agradezco el apoyo económico de la beca que me fue otorgada.

Al Proyecto CONACyT SALUD-2011-1-161687.

Al I.N.R., tanto al laboratorio de Biotecnología como el de la UITTC.

Al comité revisor de esta tesis:

Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Dra. María Cristina Velasquillo Martínez

Dr. David Garciadiego Cázares

Dr. Roberto Sánchez Sánchez

Biól. Ana María Brena Molina

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
-La piel, el mayor órgano del cuerpo humano.....	2
-Interacción entre la capa epidérmica y dérmica.....	5
-Daños en la piel.....	6
-Quemaduras.....	7
-Cultivos de células epidérmicas y dérmicas.....	9
-Ingeniería de tejidos y los Sustitutos biológicos de piel.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
HIPÓTESIS.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	14
METODOLOGÍA.....	15
-Procuración y transporte de la muestra.....	15
-Preparación del tejido.....	16
-Separación de las capas de la piel.....	17

-Procesamiento de la capa epidérmica y obtención de queratinocitos humanos.....	19
-Procesamiento de la capa dérmica y obtención de fibroblastos humanos.....	20
-Conteo celular.....	21
-Cultivo celular de queratinocitos.....	22
-Cultivo celular de fibroblastos.....	24
-Expansión celular de queratinocitos y fibroblastos humanos.....	24
-“Feeder layers”.....	25
-Viabilidad celular.....	26
-Técnica para la obtención del inmunofenotipo celular.....	27
-Proliferación de cultivos celulares.....	30
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	57

RESUMEN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y consiste en dos capas principales: epidermis y dermis, tanto los queratinocitos como los fibroblastos son los componentes celulares más abundantes en cada capa respectivamente, estas células se comunican entre sí, funcionan en conjunto y dependen una de la otra. Existen múltiples razones por las cuales hay daño en la piel, entre las más comunes están las quemaduras. Una quemadura es aquella lesión en un organismo producida por una variación de calor, mediada por un agente causal determinado y cuyos aspectos histológicos varían enormemente. Las quemaduras pueden clasificarse por profundidad en diferentes grados. Existen distintos tratamientos para el paciente quemado, entre ellos se encuentra el uso de sustitutos biológicos, los cuales son desarrollados por bioingeniería de tejidos para auxiliar en la reparación del tejido dañado. En el presente trabajo se estandarizó el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos humanos obtenidos de remanentes de piel de cirugías plásticas para en un futuro poder desarrollar sustitutos biológicos mediante técnicas de ingeniería de tejidos dentro del Laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación. Para esto se siguieron los siguientes objetivos particulares: 1) Establecer la técnica para el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos humanos obtenidos de remanentes de piel de cirugías de abdominoplastías de donadores sanos 2) Establecer la técnica de cultivo de queratinocitos y fibroblastos humanos a partir de tejido remanente de cirugías de abdominoplastías 3) Cultivar queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro* 4) Determinar la viabilidad de queratinocitos y fibroblastos humanos en cultivos *in vitro* 5) Valorar la proliferación de queratinocitos y fibroblastos en cultivos *in vitro* 6) Caracterizar el fenotipo celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos en cultivos *in vitro*.

Se obtuvieron 10 muestras de piel de remanentes de cirugías de abdominoplastías, a las cuales se les retiró el tejido graso y utilizando disepa se separaron las capas epidérmica y dérmica. Una vez separadas las capas, los queratinocitos fueron aislados de la capa epidérmica utilizando tripsina-EDTA mientras que los fibroblastos fueron aislados de la capa dérmica utilizando colagenasa tipo I. Se hicieron cultivos *in vitro* de los dos tipos celulares así como pruebas de viabilidad utilizando el kit LIVE/DEAD, pruebas para la obtención del fenotipo celular utilizando el siguiente panel de anticuerpos: CK10 y CK5 para queratinocitos y antígeno de superficie del fibroblasto para fibroblastos así como pruebas de proliferación para queratinocitos utilizando la detección de Ki-67.

Palabras clave: cultivo celular, queratinocitos, fibroblastos, ingeniería de tejidos.

INTRODUCCIÓN

La piel, el mayor órgano del cuerpo humano

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano. Además de proporcionar un recubrimiento para los tejidos blandos, sirve de barrera protectora contra lesiones, invasión bacteriana y desecación, regula la temperatura corporal, recibe sensaciones continuas del ambiente (p. ej., tacto, temperatura, dolor), excreta mediante las glándulas sudoríparas y absorbe la radiación ultravioleta (UV) del sol para la síntesis de vitamina D (Gartner y Hiatt, 2002).

La piel consiste en tres capas, la *epidermis* que es la capa más externa, la *dermis* una capa gruesa de tejido conectivo y el Tejido subcutáneo (Fig. 1).

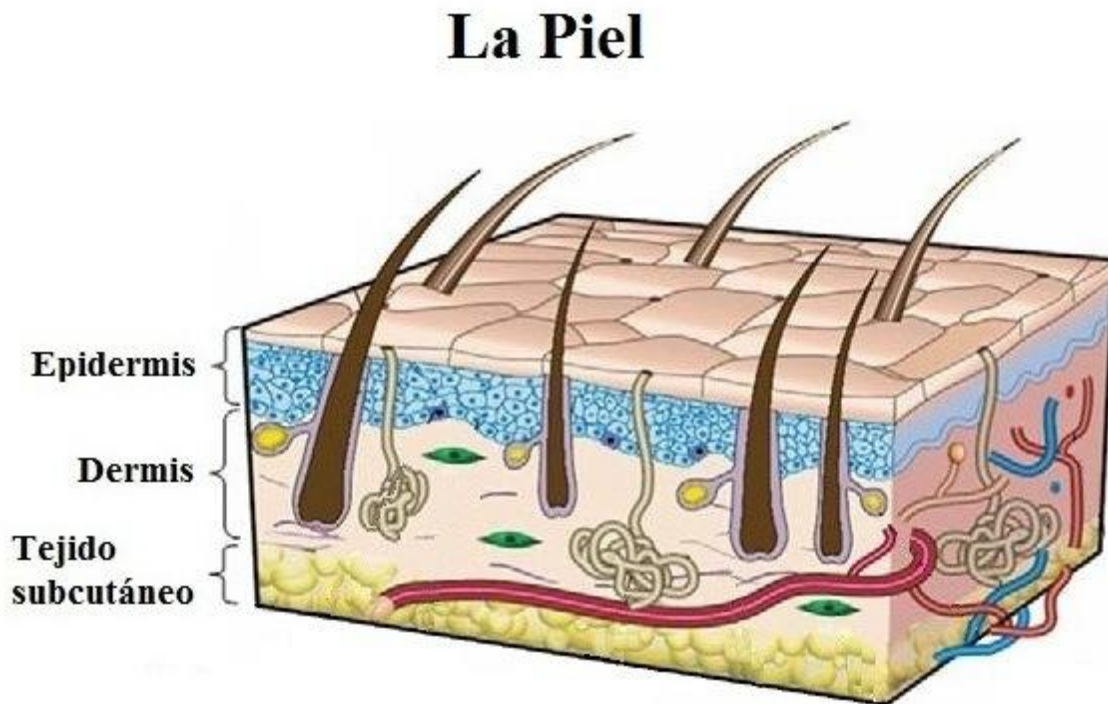


Figura 1. Esquematación de la piel mostrando sus tres capas principales: epidermis, dermis y tejido subcutáneo. Modificada de Böttcher-Haberzeth et al., 2009.

La epidermis está formada por un epitelio escamoso plano estratificado y queratinizado, proveniente del ectodermo (Gilbert, 2005). El principal componente celular de la epidermis es el queratinocito. Los queratinocitos se encuentran dispuestos en cinco capas identificables, cada una de ellas consiste en una etapa distinta del ciclo de renovación celular de la epidermis en donde hay migración de la capa más profunda hasta la más externa (Fig. 2). Las capas que componen la epidermis son (Gartner y Hiatt, 2002):

- Capa basal o estrato basal (germinativo). Esta capa es la única que se encuentra en división celular y se compone por células cúbicas a cilíndricas que se dividen por mitosis, se separa de la dermis por una membrana basal. Esta capa es importante en el proceso de renovación del epitelio, también se encuentran presentes células de Merkel (pueden servir como mecanorreceptores) y melanocitos (producen pigmento de melanina que confiere una coloración oscura a la piel).

- Capa espinosa o estrato espinoso. Es la capa más gruesa de la epidermis, cuyas células son polimorfas y se conocen como células espinosas, cuentan con un núcleo grande, actividad mitótica, se interdigitan entre sí y forman puentes celulares y gran número de desmosomas, poseen prolongaciones que le dan un aspecto espinoso a la capa, también tienen gránulos de recubrimiento de membrana; en conjunto con la capa basal forman la capa de Malpighi que está encargada del recambio de queratinocitos de la epidermis, aquí se pueden encontrar también células de Langerhans (células presentadoras de antígeno).

- Capa o estrato granuloso. Esta capa forma gran parte de la capa superficial de la epidermis, en ella los queratinocitos aún conservan sus núcleos, las células contienen gránulos de queratohialina grandes y gruesos, y gránulos de recubrimiento de la membrana.

- Capa o estrato lúcido. Es una capa clara y delgada de queratinocitos sin núcleo ni organelos, las células contienen filamentos de queratina y eleidina agrupados en forma densa, tiene una apariencia clara.

- Capa o estrato córneo. Está compuesta por células queratinizadas aplanadas muertas, contiene queratinocitos sin núcleo ni organelos a los cuales se les conoce como células escamosas-córneas, que perderán sus desmosomas y se descamarán.

Epidermis

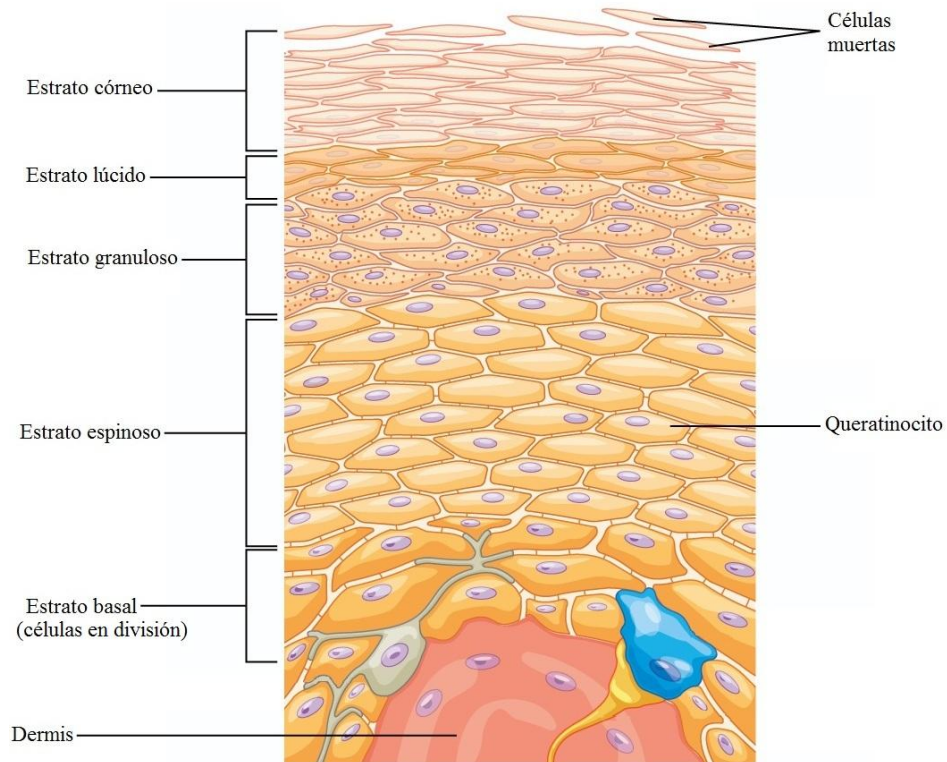


Figura 2. Esquematización de las capas que conforman el tejido epidérmico. Modificado de OpenStax CNX (<http://cnx.org>).

Por debajo de la epidermis e interdigitada con ésta se encuentra la segunda capa, la dermis.

La dermis es la región de la piel situada debajo de la epidermis, se deriva del mesodermo y está compuesta de tejido conectivo denso, irregular y formado principalmente por colágena (Fig. 3). Contiene en mayor parte fibras de colágena tipo I y redes de fibras elásticas, que apoyan a la epidermis y unen la piel a la hipodermis subyacente. Su componente celular principal es el fibroblasto, el cual es generalmente fusiforme (Gilbert, 2005; Pollard et al., 2008). La dermis se divide en dos capas:

-Capa superficial o papilar. Esta se encuentra interdigitada de manera directa con la epidermis formando rebordes (papilas), se separa de ésta por una membrana basal. Se compone de un tejido conectivo laxo, contiene fibras de colágena de tipo III y fibras elásticas.

-Capa reticular. Es la capa más profunda y mucho más densa. Se compone de tejido denso, irregular que contiene fibras gruesas de colágena tipo I, y fibras elásticas gruesas. Contiene también

estructuras derivadas de la epidermis, las cuales también llegan hasta la hipodermis, entre las cuales se incluyen: glándulas sudoríparas, folículos pilosos y glándulas sebáceas. También se pueden encontrar capilares, vasos sanguíneos y mecanorreceptores en las partes profundas de la dermis (Gartner y Hiatt, 2002).

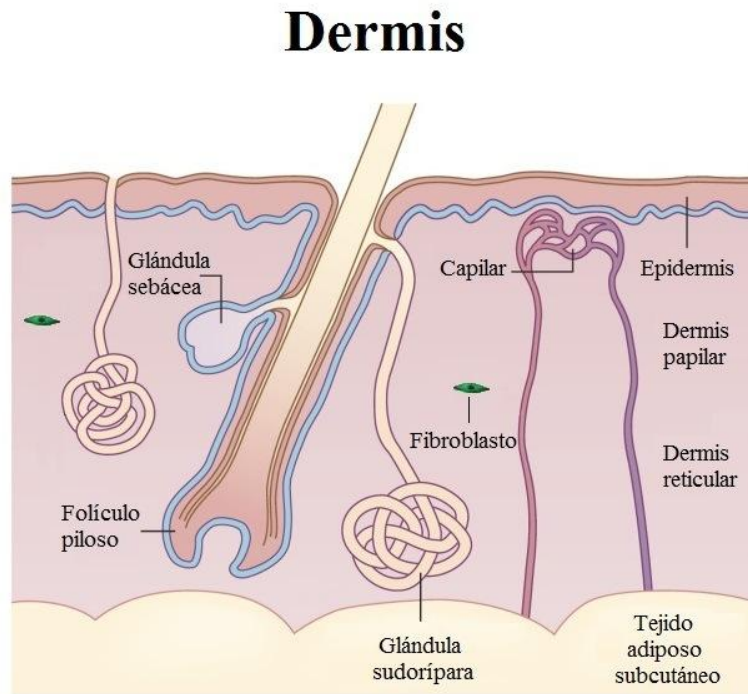


Figura 3. Esquematización de los componentes del tejido dérmico. Se observa el fibroblasto como componente principal. Modificado de Medical Books Online (<http://www.cixip.com>).

Por debajo, unida a la dermis se encuentra la tercera capa, la hipodermis o tejido subcutáneo.

El tejido subcutáneo o hipodermis es un tejido conectivo adiposo, laxo o denso según la localización y la persona; sustenta la dermis y la epidermis, al igual que le da movilidad a la piel, constituye una especie de fascia para la misma, y a diferencia de las otras dos capas, la hipodermis no se encuentra unida con tanta firmeza. Su componente principal es el adipocito, que tiene forma redondeada. (Gilbert, 2005; Pollard et al., 2008)

Interacción entre la capa epidérmica y dérmica

La capa epidérmica y dérmica, son distintas y tienen funciones diferentes, sin embargo, se ha observado que pueden trabajar en conjunto e incluso puede depender una de la otra. Por ejemplo, la epidermis, no cuenta con vasos sanguíneos, por lo que necesita recibir nutrientes de la dermis que sí los tiene, a través del líquido tisular (Gilbert, 2005). La epidermis y la dermis también interactúan en sitios específicos para crear las glándulas sudoríparas y los apéndices cutáneos: pelos, escamas, o plumas (según la especie) (Gilbert, 2005; Pollard et al., 2008).

Existen algunos factores de crecimiento que estimulan a los queratinocitos a desarrollarse, uno de éstos es el factor de crecimiento transformante α (TGF- α). El TGF- α es producido por los queratinocitos de la capa basal y estimulan su propia división (factor de crecimiento de tipo autócrino). Aunque los queratinocitos pueden producir sus propios factores de crecimiento, también necesitan de otros producidos por los fibroblastos, como lo es el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) también conocido como factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF7), que es un factor de crecimiento producido por los fibroblastos de la dermis (factor de crecimiento de tipo parácrino). El KGF es recibido por los queratinocitos basales de la epidermis y regula su proliferación. Los fibroblastos crecen mayormente gracias a los factores de crecimiento de fibroblasto (FGF's), presentes también en el proceso de curación de heridas (Gilbert, 2005).

Daños en la piel

Cuando hay un daño agudo en un tejido, se produce en el cuerpo una respuesta para sanar la herida. El daño en el tejido provoca la coagulación de la sangre, la agregación de plaquetas y la migración al sitio de la herida de leucocitos, incluyendo neutrófilos y macrófagos.

Inicialmente, el coágulo de sangre está compuesto de fibrina y fibronectina, que proveen de un andamio para la migración de las células y las plaquetas agregadas, que liberan factores de crecimiento en el tejido que se encuentra alrededor. En el transcurso de tres días se ha contraído la herida y acumulado gran cantidad de neutrófilos, los cuales fagocitan y matan microorganismos; así como macrófagos, los cuales producen y secretan factores de crecimiento en la herida. Aunque después de 24 horas de haberse provocado la herida, se inicia una migración de células epidérmicas a lo largo de la interface entre el coágulo y el tejido normal que lo rodea, las células no han alcanzado a invadir el coágulo incluso a los tres días. Sin embargo, a los tres días, fibroblastos y

células endoteliales en la periferia de la herida se activan para expresar las integrinas apropiadas para migrar sobre la fibrina y fibronectina, y secretar factores de crecimiento. Las células epidérmicas también participan en esta liberación de factores de crecimiento a los tres días. En condiciones fisiológicas normales la herida continúa sanando a los cinco días, con un crecimiento de tejido granular compuesto de fibroblastos, macrófagos adicionales, y nueva vasculatura. Las células epidérmicas que se encontraban migrando, cambian su dirección y migran sobre el tejido que está formándose. Muchos factores de crecimiento liberados por las plaquetas y secretados por los macrófagos durante la primera fase de sanación que se encuentran en la matriz provisional, estimulan a las células del tejido conforme se mueven a la herida. A esto se le suman los factores de crecimiento ahora secretados por las propias células tisulares, incluyendo las células epidérmicas, fibroblastos, y células endoteliales al igual que los macrófagos, formándose finalmente una cicatriz (Clark et al., 2007). Todo este proceso puede ser resumido y dividido en una fase inflamatoria, una fase de granulación con síntesis de tejido conectivo nuevo y el cierre epitelial de la herida, y finalmente una fase de cicatrización y remodelación una vez que la barrera epidérmica se ha restablecido (Werner et al., 2007).

Existen múltiples razones por las cuales hay daño en la piel, que van desde desórdenes genéticos, hasta traumas agudos o heridas crónicas. Entre los traumas más comunes encontramos a las quemaduras (Shevchenko et al., 2010).

Quemaduras

Una quemadura es aquella lesión en un organismo producida por una variación de calor, mediada por un agente causal determinado y cuyos aspectos histológicos varían enormemente (Gallardo et al., 2000). En la valoración clínica de una quemadura influyen los siguientes factores para evaluar con toda precisión: Profundidad de la herida, extensión de la quemadura, localización de la quemadura, el agente causal y las lesiones asociadas (Groeber et al., 2011; Gallardo et al., 2011) (Figura 4). Por profundidad, las quemaduras se clasifican en:

-*Epidérmicas* (tipo I). Caracterizadas por destrucción de la capa más superficial de la piel. Presentan eritema, dolor intenso sin formación de ampollas.

-*Dérmicas superficiales* (tipo II a). Afectan a la capa más superficial de la dermis. Es característica la formación de ampollas. Al desbridar las ampollas se observa un fondo eritematoso. Son dolorosas, y conserva la piel los folículos pilosos y las glándulas sebáceas.

-*Dérmicas profundas* (tipo II b). Afectan a las capas más profundas de la dermis. Se conservan escasos restos de folículos pilosos y glándulas sebáceas. El fondo es moteado con áreas eritematosas y otras nacaradas. Las lesiones se extienden a capas más profundas de la dermis, quedando pocas células vivas. No forman ampollas, son exudativas y con un marcado aspecto rojizo, siendo muy dolorosas.

-*Subdérmicas superficiales* (tipo III). Su apariencia oscila, dependiendo del mecanismo de producción, entre el aspecto carbonáceo y el blanco nacarado. Son indoloras por la completa destrucción de las terminaciones nerviosas y siempre son subsidiarias de tratamiento quirúrgico precoz.

-*Subdérmicas profundas* (tipo IV). Son las quemaduras que sobrepasan espacio dérmico/epidérmico y dañan estructuras subyacentes, grasas, tendones, músculo y hasta estructuras óseas. Son igual indoloras y subsidiarias de cirugía precoz.

Grados de quemadura en la piel

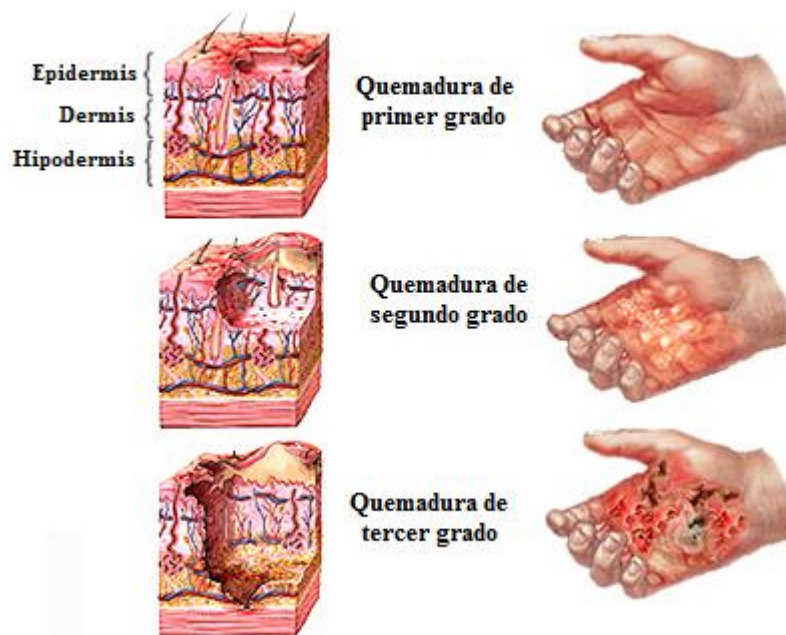


Figura 4. Esquema clásico de los tres grados de quemadura. Modificado de “Animated Dissection of Anatomy for Medicine” (www.adam.com).

En cuanto a la extensión de la quemadura si existen lesiones por encima de un 40%-50% de superficie quemada existe una alta incidencia de morbilidad (Freddi & Kestens, 2001).

En los últimos años la mortalidad en pacientes con quemaduras de un grado profundo ha disminuido debido a los autoinjertos, injertos de piel cadavérica, así como el uso de diferentes sustitutos de piel (Drago, 2010), sin embargo este último recurso con resultados satisfactorios no siempre está al alcance de nuestras instituciones de salud.

Debido a esta problemática, se requiere la elaboración de sustitutos biológicos que resulten más económicos que las versiones comerciales, por lo que se necesita realizar cultivos de células de piel que son la base de dichos sustitutos.

Cultivos de células epidérmicas y dérmicas

El primer intento de mantener queratinocitos en cultivo data del año 1898, cuando Ljunggren logró mantener fragmentos de piel por periodos prolongados y transplantarlos de nuevo en los donadores. Más tarde Carrel y Burrows en 1910, Hadda en 1912, y Kreibich en 1914, mostraron que los fragmentos de piel en un sustrato podrían ser incubados en un medio adecuado para producir un brote de células epiteliales y conectivas. Los medios utilizados en los primeros experimentos consistían en soluciones salinas simples con o sin glucosa, enriquecidos con fluidos biológicos tales como suero o líquido ascítico el cual parecía necesario para que el cultivo resultara exitoso. Posteriormente se modificaron los medios de soluciones salinas, agregándoles aminoácidos o péptidos, lo cual fue el inicio para la estandarización de medios (Andreassi, 1992). El cultivo de explantes fue investigado a profundidad durante la década de los 60's.

En el año de 1975 Rheinwald y Green cultivaron queratinocitos humanos sobre células 3T3 irradiadas (línea celular establecida de fibroblastos), donde agregaron hidrocortisona a los cultivos, cabe mencionar que éste fue el primer cultivo en serie de queratinocitos humanos exitoso (Rheinwald y Green, 1975). Barlow y Pye (1990) elaboraron un cultivo de queratinocitos humanos que es descrito desde su extracción de la piel hasta su cultivo; estos queratinocitos fueron sembrados utilizando células 3T3 (línea celular de fibroblastos de ratón usadas principalmente para

cultivo de queratinocitos), donde se habló de densidades específicas de cultivo de queratinocitos, y de una densidad considerada óptima para pasar las células. Se utilizó una mezcla modificada de medio Dulbecco-Vogt y Ham's F12, y al siguiente cambio de medio se utilizó un suplemento con Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), obteniendo resultados satisfactorios (Barlow y Pye, 1990). En 2009, Guo y Jahoda cultivaron explantes (fragmento de tejido que se coloca en un cultivo para obtener células de piel) para la obtención de queratinocitos humanos, las células se expandieron, y expresaron y mantuvieron su fenotipo aún después de hacer pases; las células de los explantes se cultivaron sobre células 3T3 tratadas con Mitomicina-C; el método desarrollado resultó para el autor, fácil y simple, y en caso de querer un cultivo solamente de queratinocitos, un método confiable para tener una contaminación mínima por fibroblastos (Guo y Jahoda, 2009).

Debido a la necesidad de remover posibles contaminantes animales, se han desarrollado múltiples métodos libres de medio y de "feeder layer" (fibroblastos mitomizados sobre los que se cultivan los queratinocitos, éstos sirven como "capa alimentadora"); en el 2013, Lamb y Ambler hicieron cultivos de queratinocitos aislados de piel, y obtuvieron como resultado que los queratinocitos sin suero y sin feeder no logran satisfactoriamente formar una epidermis estratificada y madura, mostrando que el suero tiene factores que favorecen la estratificación. En el mismo año (2013), Rasmussen y colaboradores realizaron cultivos donde muestran protocolos para el aislamiento, y cultivo en serie de queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos así como el uso de estos tipos celulares para la generación de tejido de piel estratificado; se utilizó como capa alimentadora para el cultivo de queratinocitos células 3T3, así como suero fetal bovino y medio DMEM. Tauzin y colaboradores (2014) realizaron cultivos para el desarrollo de un sustituto de piel con membrana amniótica humana donde los queratinocitos son extraídos con tripsina-EDTA y se cultivaban en frascos de cultivo.

Ingeniería de tejidos y los Sustitutos biológicos de piel

Los sustitutos desarrollados por bioingeniería de piel ofrecen una protección para la pérdida de fluidos y la contaminación además de conferir componentes de la matriz dérmica, citocinas y factores de crecimiento que resultan en una mejora de la respuesta natural de la sanación de la herida (Groeber, 2011). La ingeniería de tejidos es una herramienta importante en la elaboración de sustitutos biológicos. Ésta une conocimientos muy diversos, acerca de las células, su ambiente

celular, y biomateriales, combinado con algunos aspectos bioquímicos y biomédicos con el fin de mejorar o regenerar tejidos y su función física-biológica (Lanza et al., 2000).

Se sabe que los tejidos biológicos están formados por células, una matriz extracelular, y sistemas de señalización complejos; todo esto a su vez hace que el tejido pueda funcionar, construirse y diferenciarse. Para poder llevar esto a cabo en cultivos *in vitro* y que éstos a su vez ayuden en la generación de sustitutos biológicos, es necesario contar con condiciones similares. De esta manera existen tres pilares en la ingeniería de tejidos: células, andamios y factores de crecimiento, sin alguno de éstos no es posible desarrollar un sustituto (Lanza et al., 2000).

La ingeniería de tejidos también tiene limitaciones, por ejemplo, la incorporación de células en algún tejido prostético puede proveer las señales necesarias para la construcción de un tejido, sin embargo la variedad de dichas señalizaciones puede ser limitada, es muy difícil imitar completamente algunas interacciones complejas; sin embargo, las posibilidades de crear sustitutos pueden ser grandes. En un principio, los cirujanos que intentaban reconstruir alguna parte del cuerpo, improvisaban una reparación anatómica utilizando algún tejido u órgano del mismo paciente (autólogo); ésta práctica sigue siendo usada en algunos casos o por algunos médicos, y aunque es un método efectivo, debido a diversos factores, fue necesario la fabricación de sustitutos biológicos, donde la ingeniería de tejidos tuvo su nacimiento. La idea de generar mejoras en la naturaleza mediante productos fabricados por el hombre fue en aumento, sobretodo durante la Segunda Guerra Mundial, por el descubrimiento y la habilidad de elaborar nuevos materiales sintéticos. Polímeros sintéticos, tales como el Nylon, el poliuretano, polipropileno, entre otros, que originalmente no fueron diseñados para el uso en el cuerpo humano, fueron introducidos por proveedores de material médico a practicantes de cirugía, para reconstruir partes del cuerpo que fueran deficientes, viejas, dañadas o genéticamente defectuosas. Muchos materiales de la post-guerra incluso estuvieron durante mucho tiempo vigentes. Con el tiempo, los sustitutos fueron elaborándose con el uso de componentes biológicos (Lanza et al., 2000).

Se han elaborado reconstrucciones de diversos tejidos desde la década de los 80's; estos tejidos incluyen piel, arterias, glándula tiroidea, etcétera. También se han elaborado sustitutos para reconstrucción de hígado, mandíbula, córnea, entre otros. Otros tipos de sustitutos que se han utilizado han sido provenientes de otros individuos (alogénico) o de otras especies animales, tales como el cerdo en los transplantes de piel (xenogénico), pero esto también ha tenido sus limitaciones, ya sea debido a la falta de donadores, en el caso de la piel de cerdo debido a la apariencia distinta, o incluso a causa de algún rechazo por parte del cuerpo del paciente. Debido a

todo esto, se ha hecho necesario el estudio y la fabricación de partes corporales para satisfacer su demanda (Lanza et al., 2000).

Estos sustitutos biológicos, pueden ser utilizados de manera permanente o temporal, y ayudar al mismo organismo a repararse así mismo, mejorando la calidad de la reparación de la parte dañada (Clark et al., 2007).

Los sustitutos biológicos de piel se injertan al paciente con la finalidad de recuperar la funcionalidad y apariencia de la zona herida. Por ejemplo, en caso de tratarse de una herida en gran parte del cuerpo, un sustituto biológico puede ayudar al paciente a reducir la formación de cicatrices que en este caso estarían en una parte extensa de la piel. Existen en el mercado, sustitutos biológicos de piel comerciales (Böttcher-Haberzeth, 2010), algunos de ellos son:

- Epicel® (Genzyme Corp.). Se trata de un autoinjerto epidérmico cultivado; queratinocitos autólogos crecidos en presencia de fibroblastos murinos. Sirve como reemplazo epidérmico celular.
- Epidex™ (Euroderm GmbH). Es un autoinjerto epidérmico; células foliculares de cabello autólogas. Sirve de reemplazo epidérmico celular.
- Myskin™ (Celltran Ltd.). Es un autoinjerto epidérmico cultivado; queratinocitos autólogos crecidos en la presencia de fibroblastos murinos irradiados. Reemplazo epidérmico celular.
- ReCell® (Clinical Cell Culture (C3), Ltd.). Se trata de células autólogas epidérmicas en suspensión. Sirve de reemplazo epidérmico celular.
- AlloDerm® (LifeCell Corp.). Aloinjerto donado de dermis humana acelular. Sustituto dérmico elaborado con Bioingeniería.
- Dernaft® (Advanced BioHealing Inc.). Andamio bio-absorbible de malla de poliglactina sembrada con fibroblastos humanos alogénicos neonatales. Sustituto dérmico elaborado con Bioingeniería.
- Integra® (Integra LifeSciences Corp.). Sustituto dérmico elaborado con Bioingeniería. Se trata de una capa delgada de polisiloxano (silicón), colágena tipo I de tendón bovino, y glicosaminoglicano (sulfato de condroitina-6) de tiburón.
- Matriderm® (Dr. Suwelack Skin & Health Care AG). Sustituto dérmico elaborado con Bioingeniería. Compuesto de colágena tipo I, III, V y elastina dérmicas bovinas.

- Apligraf® (Organogenesis Inc.), Sustituto dermo-epidérmico elaborado con ingeniería. compuesto de queratinocitos humanos alogénicos neonatales; colágena bovina tipo I que contiene fibroblastos alogénicos humanos neonatales.
- OrCel® (Forticell Bioscience, Inc.). Sustituto dermo-epidérmico elaborado con ingeniería. Compuesto de queratinocitos alogénicos humanos neonatales sobre parte no porosa de esponja, cubierta en gel; esponja de colágena bovina que contiene fibroblastos alogénicos humanos neonatales.

Para la regeneración de tejidos por medio de ingeniería de tejidos se requiere elaborar una producción de células del tipo perdido a través de cultivos. Los elementos básicos necesarios para que se pueda llevar a cabo el cultivo de tejidos son: células, andamios y factores de crecimiento. Sin alguno de estos tres componentes principales no podría llevarse a cabo un cultivo *in vitro* y expansión celular de ningún tejido.

Al igual que esto, las interacciones que existen entre los dos tipos celulares más importantes y abundantes de la piel (queratinocitos y fibroblastos) son fundamentales, ya que ambas capas están en constante comunicación para su formación, crecimiento y regeneración.

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar el aislamiento y cultivo de queratinocitos y fibroblastos humanos obtenidos de remanentes de cirugías plásticas para el desarrollo de sustitutos biológicos de piel, mediante técnicas de ingeniería de tejidos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la técnica para el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos humanos obtenidos de remanentes de piel de cirugías plásticas de donadores sanos.
2. Establecer la técnica de cultivo de queratinocitos y fibroblastos humanos a partir de tejido remanente de cirugías plásticas.

3. Cultivar queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro*.
4. Determinar la viabilidad de queratinocitos y fibroblastos humanos en cultivos *in vitro*.
5. Valorar la proliferación de queratinocitos y fibroblastos en cultivos *in vitro*.
6. Caracterizar el fenotipo celular de los queratinocitos y fibroblastos humanos en cultivos *in vitro*.

HIPÓTESIS

Se obtendrán cultivos viables de queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro* aislados de remanentes de cirugías plásticas.

JUSTIFICACIÓN

Según datos del I.N.E.G.I, México tiene una población de 112 millones de habitantes, de los cuales el 62% ha sufrido algún tipo de accidente, del cual el 5.7% ha sufrido y tenido que ser internado por quemaduras (Orozco-Valerio et al., 2012; I.N.E.G.I., 2001). En los últimos años se han realizado esfuerzos para crear sustitutos biológicos que imiten la piel humana, aunque la gran mayoría de éstos están compuestos únicamente por una capa epidérmica, estos pueden mejorar si se les adiciona una capa dérmica que contenga fibroblastos.

En el laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ) se pretende desarrollar un sustituto biológico dermo-epidérmico (sbD-E) que contenga los dos tipos celulares de la piel, queratinocitos y fibroblastos humanos cultivando ambos tipos celulares sobre un andamio a base de amnios humano radioesterilizado que pueda ser aplicado a pacientes con quemaduras de tercer grado que ingresen al CENIAQ. Por ello se pretende en una

primera etapa, la estandarización del aislamiento y cultivo de los dos principales tipos celulares que componen la piel: queratinocitos y fibroblastos.

METODOLOGÍA

En el transcurso de Agosto de 2013 a Agosto de 2014 se obtuvieron 10 muestras de piel de remanentes de cirugías de reducción de abdomen, abdominoplastías. Para el procesamiento de dichas muestras y aislamiento de los dos tipos celulares principales de la piel (queratinocitos y fibroblastos) se estandarizó el protocolo siguiente:

Procuración y transporte de la muestra

Los 10 remanentes de piel fueron obtenidos con previo consentimiento informado del paciente. La muestra fue procurada por el médico cirujano y depositada en medio de transporte compuesto de: DMEM/F-12 (Gibco® No. Cat. 11330-032) + 10% Antibiótico-Antimicótico 100 X (Gibco® No. Cat. 15240062) manteniendo una temperatura de 4°C (figura 5). La muestra fue transportada a la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa (UITTC y MR) del Instituto Nacional de Rehabilitación (I.N.R.).



Figura 5. Medio de transporte conteniendo un remanente de piel de abdominoplastía.

Se recomienda comenzar el procesamiento de la muestra el mismo día en que es procurada, ya que así se obtiene mayor viabilidad celular. El aislamiento de queratinocitos y fibroblastos humanos de los remanentes de piel se realizó en condiciones de esterilidad.

Preparación del tejido

1. Dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific Class II A/B3 Biological Safety Cabinet Mod. 1284) se colocó una caja Petri estéril de vidrio e instrumental a utilizar, así como la muestra de piel contenida en el medio de transporte. La muestra se retiró del contenedor con ayuda de pinzas de disección y se colocó en la caja de Petri. Se retiró el exceso de tejido adiposo que contenía la muestra con tijeras de disección. Se realizó un corte estilo “falda hawaiana” al tejido de piel (figura 6).



Figura 6. Muestra de piel sin tejido adiposo, con corte estilo “falda hawaiana” en caja de Petri de vidrio estéril.

2. La muestra fue medida y pesada, y posteriormente colocada en un tubo cónico para centrífuga de 50 mL (Falcon No. Cat. 352070).
3. La muestra fue sometida a tres lavados de manera vigorosa con PBS 1X (Gibco® No. Cat. 10010023) + 10% Antibiótico-Antimicótico 100 X (Gibco® No. Cat. 15240062) durante 5

minutos cada uno. Finalizado el lavado se procedió a preparar la muestra para el paso de la separación de las capas de piel.

Separación de las capas de la piel

1. En un tubo cónico de 50 ml fue preparada la solución de Dispasa (Gibco® No. Cat. 17105-041) (3mg/ml) + PBS 1X (Gibco® No. Cat. 10010023), filtrando a 0.22 μ , antes de ser utilizada. La dispasa es una enzima que ayuda a separar las capas dérmicas, disocia suavemente una variedad amplia de tejidos, libera las células con el mínimo daño a las mismas, manteniendo generalmente la integridad de la membrana celular; actúa rompiendo la fibronectina, colágena IV y en menor medida la colágena I. (figura 7).

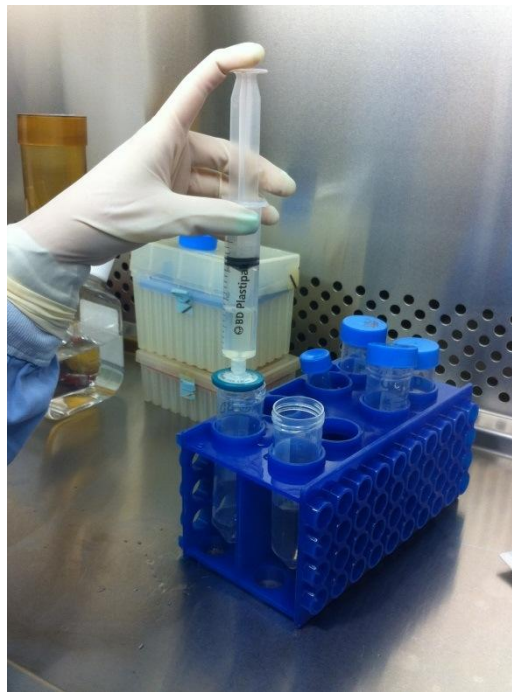


Figura 7. Filtración de la solución de dispasa a 0.22 μ .

3. El remanente de piel previamente lavado con PBS y Antibiótico-Antimicótico 10% fue colocado en la solución de Dispasa-PBS 1X. y puesto dentro de un agitador orbital (MRC, Orbital Shaker Incubator, Mod. TU-400), manteniendo el tubo en agitación a 210 rpm durante 1 hora a 37°C (figura 8).



Figura 8. Tejido remanente de piel en solución de dispasa dentro de un agitador orbital.

4. Transcurrido el tiempo de digestión en dispasa, se observó la separación de la capa epidérmica y dérmica, alcanzando a ver el desprendimiento de láminas de tejido muy fino (estilo “capa de cebolla”) del resto de tejido, estas láminas son el tejido epidérmico, la capa dérmica se observa como un tejido más grueso de tono blanquecino (figura 9).

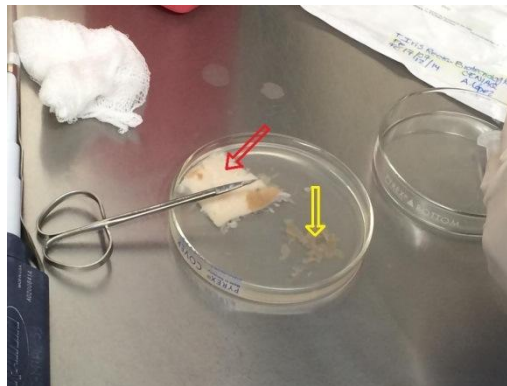


Figura 9. Separación de la capa epidérmica y dérmica. La flecha amarilla señala las láminas epidérmicas desprendidas mientras que la flecha roja señala el tejido dérmico, tejido grueso en tono blanquecino.

5. Una vez separadas ambas capas, se llevó a cabo en procedimientos separados el aislamiento de queratinocitos de la capa epidérmica y el aislamiento de fibroblastos de la capa dérmica.

Procesamiento de la capa epidérmica y obtención de queratinocitos humanos

1. Una vez obtenida la capa epidérmica, ésta fue colocada dentro de un tubo eppendorf estéril de 2 mL (Eppendorf® Safe-Lock microcentrifuge tube No. Cat. 0030 124.332) adicionándole 1 mL de tripsina-EDTA 0.25% 1X (Gibco® No. Cat. 25200056). Posteriormente se colocó en un Thermomixer (Eppendorf® Thermomixer Compact Mod. 5350) donde se mantuvo en constante agitación a 300 r.p.m durante 1 hora a 37°C (figura 10).

La tripsina, es una enzima con una acción digestiva fuerte, que es utilizada para la disociación celular en pases de cultivos, y disociación primaria de tejidos.



Figura 10. Tejido epidérmico en tripsina dentro de agitador “thermomixer”.

2. Transcurrido el tiempo de incubación en tripsina, ésta fue inactivada con medio DMEM/F-12 (Gibco® No. Cat. 11330-032) / 2.5% Suero Fetal Bovino Inactivado (Gibco® No. Cat. 16000044) 1:1.
3. Una vez inactivada la solución, las láminas de tejido epidérmico que no fueron disgregadas fueron utilizadas para realizar cultivos en explante, colocándolas sobre “feeder layers”. La solución inactivada se centrifugó a 2500 rpm durante 6 minutos.

*Las láminas de tejido epidérmico se colocaron sobre fibroblastos mitomizados (feeder layers) adicionándoles medio DMEMF12 / 2.5% de SBF

4. Una vez centrifugadas las células, se les retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de medio DMEM/F-12 (Gibco® No. Cat. 11330-032) + 2.5% Suero Fetal Bovino Inactivado (Gibco® No. Cat. 16000044) (“medio suplementado”), se procedió a realizar el conteo celular.

Procesamiento de la capa dérmica y obtención de fibroblastos humanos

1. Una vez separada la dermis, ésta fue colocada en una caja de Petri estéril (figura 11). Con ayuda de tijeras de disección el tejido fue disgregado mecánicamente en fragmentos pequeños, los cuales se colocaron en un tubo de 50 mL conteniendo solución de colagenasa I (Worthington Biochemical Corporation, No. Cat. LS004194) para su disgregación enzimática.

La solución de colagenasa se utilizó al 1%, para lo cual se diluye en medio DMEM/F-12 + colagenasa tipo I (Worthington Biochemical Corporation) [100 mg/mL]. La muestra se mantuvo en agitación a 210 rpm a 37°C en un agitador orbital (MRC, Orbital Shaker Incubator, Mod. TU-400) durante toda la noche. La colagenasa actúa rompiendo la colágena existente en la matriz donde están embebidos los fibroblastos, así estos son liberados y se pueden aislar de la dermis.



Imagen 11. Tejido dérmico (flecha naranja) en proceso de disgregación mecánica.

2. Transcurrido el tiempo en solución de colagenasa I, el tejido dérmico debió de haberse disgregado en su totalidad, por lo cual la solución con el tejido se filtró a 70u. Se neutraliza la acción de la colagenasa I 1:1 con medio DMEM/F-12 10% S. F. B. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 2500 rpm durante seis minutos.
3. Finalizada la centrifugación, se desechó el sobrenadante cuidando el botón celular, éste se resuspendió en 1 mL de medio DMEM/F-12 (Gibco® No. Cat. 11330-032) + 10% Suero Fetal Bovino Inactivado (Gibco® No. Cat. 16000044) + 1% Antibiótico-Antimicótico 100 X (Gibco® No. Cat. 15240062) (medio suplementado) para proceder con el conteo celular.

Conteo celular

El conteo celular es un procedimiento en donde se calcula la cantidad de células contenidas en un volumen determinado mediante la toma de una alícuota de dicha suspensión de la cual se desee saber el número celular. Las células se mezclan con un colorante (azul tripano) que penetra únicamente las células cuya membrana no se encuentre íntegra, tiñéndolas de azul, diferenciándose de las células vivas que se observan transparentes. Dicho procedimiento se lleva a cabo con ayuda de un hemocitómetro o cámara de Neubauer, que es una pequeña placa de vidrio (portaobjetos esmerilado) y un cubreobjetos especial, que tiene grabada una cuadrícula en su parte central (González-Morán, 2008).

El procedimiento llevado a cabo para realizar el conteo celular fue el mismo tanto para queratinocitos como para fibroblastos así como para los diferentes pases llevados a cabo y para la criopreservación. El procedimiento de conteo celular fue el siguiente:

1. Con una micropipeta (Rainin pipet-lite, Serie I0103959A) se tomó una alícuota de 10ul de células en suspensión colocándolas en un pozo de una placa de 96 y mezclándola con 10ul de azul tripano, de esta mezcla se tomaron 10u, los cuales fueron colocados sobre el hemocitómetro o cámara de Neubauer.
2. En un microscopio óptico fue colocada la cámara de Neubauer y se procedió a realizar el conteo celular utilizando los 4 cuadrantes laterales sacando un promedio. Se hizo un conteo

de viabilidad por exclusión, contando tanto células vivas como células muertas, mientras que la forma de incluir las células en la cuantificación fue que estuvieran dentro del cuadrante lateral (figura 12).



Figura 12. Cámara de Neubauer con mezcla de azul tripano y células. Los cuadrantes utilizados para realizar el conteo celular son los que se encuentran marcados en negro.

3. Para realizar el cálculo total de células en 10u se utilizó la siguiente fórmula:

$$\# \text{ final de células contadas} * 2 * 10,000 * \text{no. de mililitros en resuspensión}$$

final de células contadas: El promedio final de los cuatro cuadrantes.

2: Se multiplica por dos, ya que una parte de la suspensión dentro del hemocitómetro fue de las células en suspensión y la otra de azul tripano.

10,000: La constante utilizada para el hemocitómetro.

No. de mililitros en suspensión: Son los mililitros totales de donde se tomó la alícuota de 10u de células en suspensión.

La cantidad de mililitros en donde se resuspenden las células depende del tamaño del botón celular.

Cultivo celular de queratinocitos

Los queratinocitos humanos se cultivaron de dos formas:

- a) Queratinocitos aislados del tejido epidérmico
- b) Láminas de tejido epidérmico, no disgregado, “cultivo en explante”.

Los queratinocitos humanos se sembraron utilizando una capa alimentadora o “feeder layer”, colocando las células aisladas sobre ésta o las láminas de tejido dérmico.

Para llevar a cabo estos cultivos es necesario tener preparadas cajas de cultivo con “feeder layers”, más adelante se describe qué son y cómo se realizan estas “feeder layers”.

a) Procedimiento para el cultivo de queratinocitos humanos aislados de la capa epidérmica:

1. Una vez obtenida la cantidad total de células contenidas en el botón celular, se hizo el cálculo para el cultivo de queratinocitos a una densidad celular de 50,000 cel/cm².
2. Se tomó la alícuota de la suspensión que contenía la cantidad de queratinocitos para sembrar a la densidad deseada y se cultivó sobre una capa de fibroblastos mitomizados o “feeder layer”, los cuales sirven a los queratinocitos como capa alimentadora.
3. Se adicionó medio DMEM/F-12 / 2.5% SFB y con movimientos ligeros de vaivén se esparcieron las células de manera uniforme en la caja de cultivo.
4. Las cajas de cultivo se colocaron dentro de un incubador (Heraeus HERAcell 240 Incubator, DK-51019557), manteniendo el cultivo a 37°C con una atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 95% de humedad.
5. Después de tres días se hizo el primer cambio de medio. Se probaron tres medios de cultivo diferentes: un medio universal DMEM/F-12, y dos medios comerciales, Epilife (No. Cat. M-EPICF-500 Gibco®) que es para células epiteliales y medio 154 (No. Cat. M-154CF-500 Gibco®) que es específico para cultivo de queratinocitos. Estos tres medios fueron suplementados con 1% de HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplement Gibco® No. Cat. S0015).

b) El procedimiento para el “cultivo en explante” de queratinocitos fue el siguiente:

1. Las láminas de tejido epidérmico que no se alcanzaron a disgregar fueron utilizadas para la obtención de queratinocitos. Se colocó la lámina de tejido dérmico con ayuda de pinzas de disección en pozos y/o cajas de cultivo con “feeder layer” con el fin de que los queratinocitos embebidos en la matriz, “bajen” y puedan anclarse a la caja de cultivo. Estos tejidos en cultivo son denominados *explantes*.
2. Se adicionó medio DMEMF12 /2.5% SFB evitando mover la caja de cultivo, ya que el roce de las láminas de tejido con las “feeder layers” puede provocar que los fibroblastos mitomizados se desprendan de la caja.
3. Las cajas de cultivo se colocaron dentro de un incubador (Heraeus HERAcell 240 Incubator, DK-51019557) manteniendo el cultivo a 37°C con una atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 95% de humedad.

Cultivo celular de fibroblastos

1. Una vez obtenido el conteo celular final los fibroblastos se sembraron en cajas de cultivo a una densidad de 10,000 cel/cm². Se tomó una alícuota de la suspensión en donde se contenía la cantidad de fibroblastos para sembrar a la densidad deseada.
2. Se le adicionó medio suplementado: DMEMF12 al 10% de S. F. B. y 1% de antibiótico-antimicótico a las cajas de cultivo y con movimientos ligeros de vaivén se esparcieron las células de manera uniforme en la caja de cultivo.
3. Las cajas de cultivo se colocaron dentro de un incubador, manteniendo el cultivo a 37°C con una atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 95% de humedad.

Expansión celular de queratinocitos y fibroblastos humanos

Una vez alcanzada la confluencia celular deseada se llevó a cabo el pase celular. Para queratinocitos se llevó a cabo cuando se encontraban a una confluencia del 60% mientras que para los fibroblastos fue de 100%. La expansión celular se realizó de la siguiente manera para ambos tipos celulares:

1. Dentro de la campana de flujo se retiró el medio de cultivo.
2. Se hicieron dos lavados con PBS 1X aproximadamente por 20 segundos, alcanzando a enjuagar la totalidad de la caja de cultivo. Se retiró el PBS 1X.
3. Se adicionó tripsina-EDTA a las cajas de cultivo, para queratinocitos se utilizó a una concentración de 0.25%, dejando actuar durante 5 minutos a 37°C; para fibroblastos se utilizó con una concentración 1:4 diluida con PBS 1X, dejando actuar durante 10 minutos a 37°C.
4. Transcurrido el tiempo en tripsina-EDTA se observaron las cajas de cultivo para corroborar que las células se hayan desprendido de esta. Si las células no se han alcanzado a desprender por completo de la caja de cultivo, se dan unos ligeros golpecitos alrededor de ésta para facilitar su desprendimiento. Una vez observado el desprendimiento total de las células de la caja de cultivo se adiciona medio DMEM/F-12 suplementado para inactivar la acción de la tripsina, con un volumen 1:1.
5. Las células fueron resuspendidas con el pipetor tratando de dispersarlas mediante la presión del medio contra las paredes de la caja de cultivo, se tomó toda la suspensión para colocarla en un tubo para centrífuga.
6. Se centrifugó la suspensión con las células a 2500 r.p.m durante 6 minutos.
7. Transcurrido el tiempo de centrifugación, se decanta el sobrenadante cuidando el botón celular o “pellet”. Se adicionó 1 ml de medio con el que se cultivó posteriormente, se homogenizó la suspensión y se procedió a realizar el conteo celular (como lo indica el protocolo anteriormente).
8. El cultivo celular y la densidad celular utilizada en ambos tipos celulares fue la misma que se utilizó en el procedimiento de aislamiento.

“Feeder layers”

Para que los fibroblastos sirvan como capa alimentadora, es necesario inhibirles el crecimiento para que no compitan con los queratinocitos por los recursos y el espacio, esto se logra utilizando Mitomicina “C”.

La mitomicina “C” actúa en las células inhibiendo la síntesis de DNA, donde reacciona covalentemente con el DNA, formando enlaces cruzados entre las hebras complementarias de DNA. Esta interacción previene la separación de dichas hebras, inhibiendo así la replicación de DNA.

El procedimiento que se siguió para mitomizar los fibroblastos fue el siguiente:

1. Se utilizaron cultivos de fibroblastos en confluencia, se les retiró el medio de cultivo que contenían y se les adicionó PBS 1X con el cual se realizaron dos lavados haciendo ligeros movimientos de vaivén durante 10 segundos. Se retiró el PBS.
2. Se adicionó Mitomicina “C” (Sigma-Aldrich No. Cat. M4287) (preparada con PBS a una concentración de 10µg/mL), en cantidad suficiente para cubrir las células, y se incubó a 37°C durante 4 horas.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la mitomicina “C”, y se realizaron tres lavados con PBS 1X. Una vez mitomizados, los fibroblastos se tripsinizaron siguiendo el protocolo ya descrito y se sembraron a una densidad de 15,000 células/cm². Se adicionó medio suplementado con 10% de suero fetal bovino.
4. Las “feeder layers” se conservaron por dos semanas en incubación.

Viabilidad celular

La viabilidad celular es un método por el cual se determina simultáneamente la proporción de células vivas y muertas en un cultivo *in vitro*, mediante la tinción de dichas células con agentes fluorescentes distintos (verde y rojo). Puede ser utilizada para monitorear la salud de los cultivos, cuantificar las células vivas y muertas, sin necesidad de tripsinizar, también es útil para comparar diferentes condiciones de cultivo.

En el presente trabajo, la viabilidad celular se llevó a cabo para diferenciar las células vivas y muertas en el cultivo *in vitro* y obtener un porcentaje de viabilidad de los cultivos.

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el Kit LIVE/DEAD® Viabilidad/Citotoxicidad (Molecular Probes® No. Cat. L-3224), el cual consiste en dos reactivos que permiten diferenciar fácilmente las células vivas de las muertas, tiñendo de color verde fluorescente únicamente las vivas con la calceína, y de rojo fluorescente las muertas con el homodímero de etidio.

El protocolo que se siguió fue de acuerdo con las especificaciones del fabricante Molecular Probes de la siguiente manera:

1. En la campana de flujo se retiró el medio de cultivo de la caja, se hicieron 2 lavados con PBS 1X.
2. Previamente en un tubo eppendorf se preparó la solución de calceína/homodímero, colocando 1 mL de solución de Hanks (Gibco® HBSS No. Cat. 14170-112) + 0.5 uL de calceína-AM y 1 uL de homodímero de etidio-1 (EthD-1).
3. La solución de calceína-homodímero de etidio se adicionó a los cultivos *in vitro* a los cuales se les iba a hacer la prueba de viabilidad. Se incubó a 37°C durante 45 minutos.
4. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró la solución del cultivo.
5. Se realizaron dos lavados con PBS 1X a los cultivos *in vitro*.
6. Se procedió a observar en el microscopio invertido con fluorescencia.
7. Se tomaron fotografías de la viabilidad en los cultivos *in vitro*.

Técnica para la obtención del Inmunofenotipo celular

Existen proteínas específicas para distintos tipos celulares y para diferentes especies, que pueden servir para determinar el fenotipo de las células sembradas en un cultivo. Esto puede realizarse con pruebas de inmunohistoquímica/inmunofluorescencia, donde se intentan localizar proteínas del tipo inmunoglobulina G. Ésta técnica se basa en la alta especificidad y afinidad de los anticuerpos para reconocer proteínas y unirse a ella. Se utilizan dos anticuerpos: el anticuerpo primario y el secundario. A los cultivos fijados se les agrega el anticuerpo primario, que responde y se une a alguna proteína presente específicamente en el tipo celular buscado; éste anticuerpo debe estar

creado en una especie diferente a la del cultivo. Posteriormente se agrega un anticuerpo secundario que se une específicamente al extremo libre del anticuerpo primario, produciendo una señal fluorescente (González-Morán, 2008).

Se realizaron inmunofluorescencias para la obtención del inmunofenotipo de los cultivos de queratinocitos y fibroblastos.

a) Obtención de inmunofenotipo de queratinocitos

Para los queratinocitos se utilizaron dos tipos de citoqueratina. Las citoqueratinas son una amplia familia de proteínas del citoesqueleto encontradas en las células epiteliales. Para los queratinocitos se utilizó citoqueratina 5 y citoqueratina 10. La citoqueratina 5, se une a la proteína de filamento citoqueratina 5 (CK5) humana, en la piel ésta se encuentra en las células basales de la epidermis; la citoqueratina 10 reacciona con otra proteína de filamento que es la citoqueratina 10 (CK10) humana, que en la piel se ha observado en todas las capas celulares suprabasales de la epidermis, incluyendo el estrato córneo. Estos anticuerpos se adhieren al citoesqueleto de las células epidérmicas (queratinocitos).

b) Obtención de inmunofenotipo de fibroblastos

Para fibroblastos se utilizó un antígeno para proteína de superficie de fibroblasto, el cual en la piel reconoce una proteína encontrada en la superficie de fibroblastos humanos.

El procedimiento para la obtención del inmunofenotipo celular fue el siguiente:

Fijación

1. Se retiró el medio de cultivo que contenían las células.
2. Se hicieron lavados con PBS 1X, dos veces.
3. Se adicionó PFA al 4% a las células y se refrigeraron durante 5 minutos a 4°C.
4. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el PFA y se lavó tres veces con PBS 1X durante 5 minutos. Las células se guardaron hasta su uso para las pruebas de inmunofenotipo a 4°C con PBS 1X.

Bloqueo

Éste paso es necesario para saturar o bloquear las áreas libres en donde pueda haber una unión inespecífica del anticuerpo, debido a la fijación u otro factor, evitando coloración de fondo y/o falsos positivos (González-Morán, 2008).

1. Se retiró el PBS 1X que contenían las células fijadas.
2. Se agregó una solución con PBS 1X + Suero Fetal Bovino 1% + tritón 0.1% (“solución de bloqueo”), la cual se dejó durante 20 minutos, no sólo para llevar a cabo el bloqueo, sino para permeabilizar las células para facilitar el acceso del anticuerpo y bloquear interacciones proteína-proteína no específicas.

Incubación con anticuerpo primario

1. Se retiró la solución de bloqueo.
 2. Se incubó el anticuerpo primario a 4°C, durante 24 horas (solución de bloqueo/Anticuerpo primario).
 - La proporción utilizada tanto para citoqueratina 5 (Abcam® Anti-Cytokeratin 5 Antibody No. Cat. ab24647) como para citoqueratina 10 (Abcam® Anti-Cytokeratin 10 Antibody No. Cat. ab111447) fue de 1:100. La detección de CK5 y CK10 se hizo por separado.
 - Para fibroblastos se utilizó el antígeno de superficie de fibroblasto (Abcam® Anti-fibroblast Surface Protein Antibody No. Cat. ab11333) en una proporción 1:50.
- Los anticuerpos primarios fueron incubados durante 24 horas a 4°C.

Preparación para el anticuerpo secundario

1. Después de 24 horas en incubación del anticuerpo primario, las células se lavaron con PBS 1X + 0.1% de tritón durante 10 minutos tres veces y manteniendo agitación.

Incubación con anticuerpo secundario

1. Se adicionó el anticuerpo secundario:

- Para queratinocitos se utilizó: Alexa fluor 594 (Molecular Probes® Alexa Fluor 594 Antibody No. Cat. A-11005) (solución de bloqueo/Anticuerpo secundario) tanto para CK5 como CK10 en una proporción de 1:300.

- Para fibroblastos se utilizó Alexa fluor 488 (Molecular Probes® Alexa Fluor 488 Antibody No. Cat. A-11001) (400 uL de solución de bloqueo/1.5uL de anticuerpo secundario).

Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 2 horas, evitando el contacto con la luz.

2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X/ 0.1% de tritón, manteniendo constante agitación.

3. Se retiró la solución de PBS/tritón.

5. Se agregó DAPI (BioLegend® DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) No. Cat. D1306), suficiente para cubrir las células.

6. Se realizaron tres lavados con PBS 1X durante 10 minutos manteniendo agitación, y se procedió a tomar las fotos.

Proliferación de cultivos celulares

Al igual que la prueba de viabilidad, las pruebas de proliferación resultan importantes para observar la salud de cultivos, monitorear condiciones de cultivo (medios, suplementos, entre otros). Se realizaron pruebas de inmunofluorescencia para marcar las células que se encontraban en proliferación con Ki67.

El antígeno Ki67 es una proteína nuclear la cual se expresa en todas las partes activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis), pero está ausente en las células en reposo (G0). En contraste a otras proteínas asociadas al ciclo celular, el antígeno Ki67 está consistentemente ausente en células inactivas y no es detectable durante el proceso de reparación del DNA. De tal manera, la presencia de Ki67 está estrictamente asociada al ciclo celular y confinada en el núcleo, sugiriendo un papel importante en el mantenimiento y/o regulación del ciclo de división celular.

Estas técnicas funcionan bajo el mismo principio que las descritas anteriormente, aunque reconocen proteínas diferentes.

El procedimiento para obtención de proliferación en cultivos celulares que se utilizó fue el siguiente:

Fijación

1. Se retiró el medio de cultivo que contenían las células.
2. Se realizaron lavados a las células con PBS 1X dos veces.
3. Se retiró el PBS 1X y se adicionó PFA al 4%. Se refrigeraron durante 5 minutos a 4°C.
4. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el PFA 4% y se lavó tres veces con PBS 1X durante 5 minutos. Las células se guardaron hasta su uso para la prueba de proliferación, a 4°C con PBS 1X.

Bloqueo

1. Se retiró el PBS 1X que contenían las células fijadas.
2. Se agregó una solución con PBS 1X + Suero Fetal Bovino 1% + tritón 0.1% (“solución de bloqueo”), la cual se dejó durante 20 minutos, para permeabilizar las células y bloquear interacciones proteína-proteína no específicas.

Incubación con anticuerpo primario

1. Se retiró la solución de bloqueo.
2. Se incubó el anticuerpo primario a 4°C, durante 24 horas (solución de bloqueo/Anticuerpo primario).

Para queratinocitos se utilizó como anticuerpo primario de proliferación Ki67 (BioLegend® Purified Anti-Human Ki-67 No. Cat. 350501) en una proporción de 1:100 a 4°C.

El anticuerpo primario fue incubado durante 24 horas a 4°C.

Preparación de las células para el anticuerpo secundario

1. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS 1X + 0.1% de tritón durante 10 minutos tres veces y manteniendo agitación a 65 rpm.

Incubación con anticuerpo secundario

1. Se adicionó el anticuerpo secundario:

Para queratinocitos se utilizó: para Ki67, Alexa fluor 488 (Molecular Probes® Alexa Fluor 488 Antibody No. Cat. A-11001) como anticuerpo secundario.

Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 2 horas, evitando el contacto con la luz.

2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X /0.1% de tritón, manteniendo constante agitación.

3. Se retiró la solución de PBS/ tritón.

4. Se agregó DAPI (BioLegend® DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) No. Cat. D1306), suficiente para cubrir las células.

5. Se realizaron tres lavados con PBS 1X durante 10 minutos manteniendo agitación, y se procedió a tomar las fotos.

RESULTADOS

Se procesaron un total 10 muestras de piel (remanentes de cirugías plásticas), y se realizaron cultivos de queratinocitos y fibroblastos.

1. Se estableció la técnica para el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos humanos obtenidos de remanentes de piel de cirugías plásticas de donadores sanos. Esta técnica se describe a detalle en la metodología seguida en el presente trabajo (Figura 13).

Aislamiento de queratinocitos y fibroblastos humanos de los remanentes de abdominoplastías

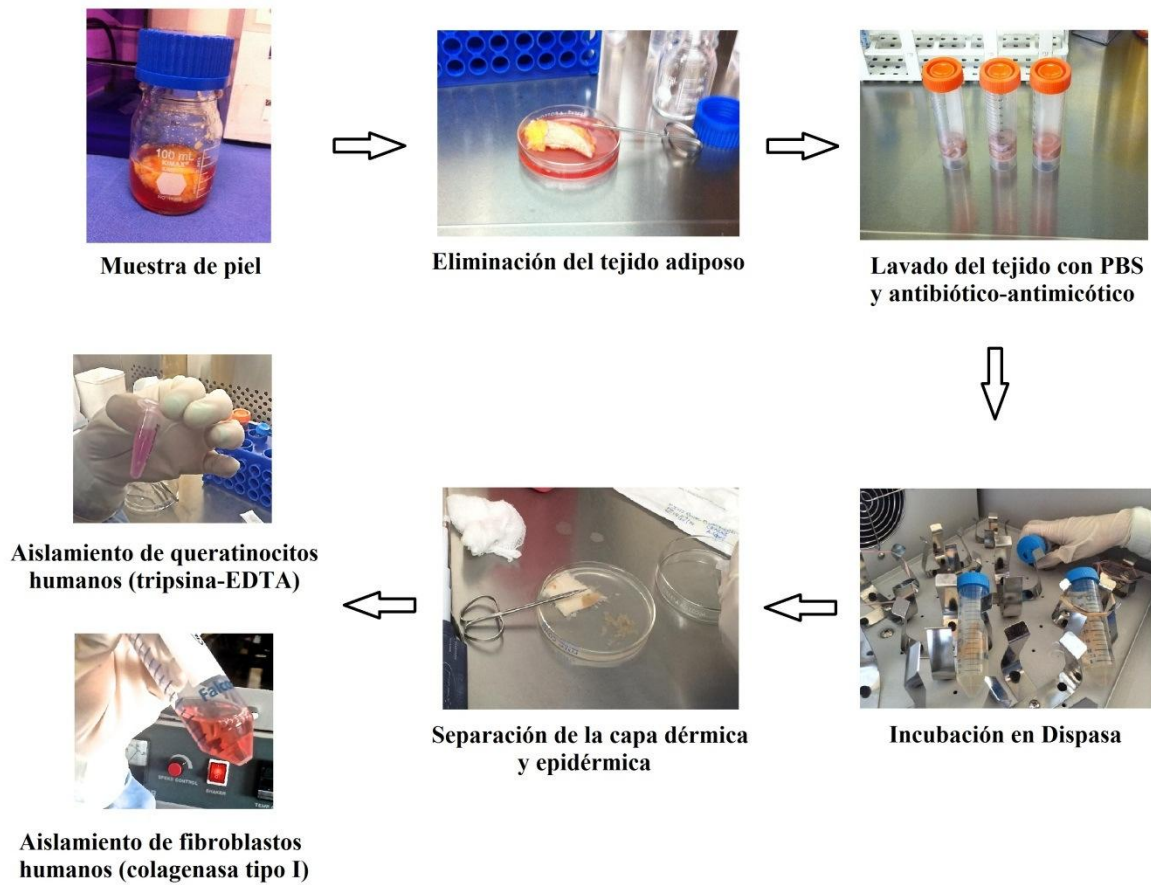
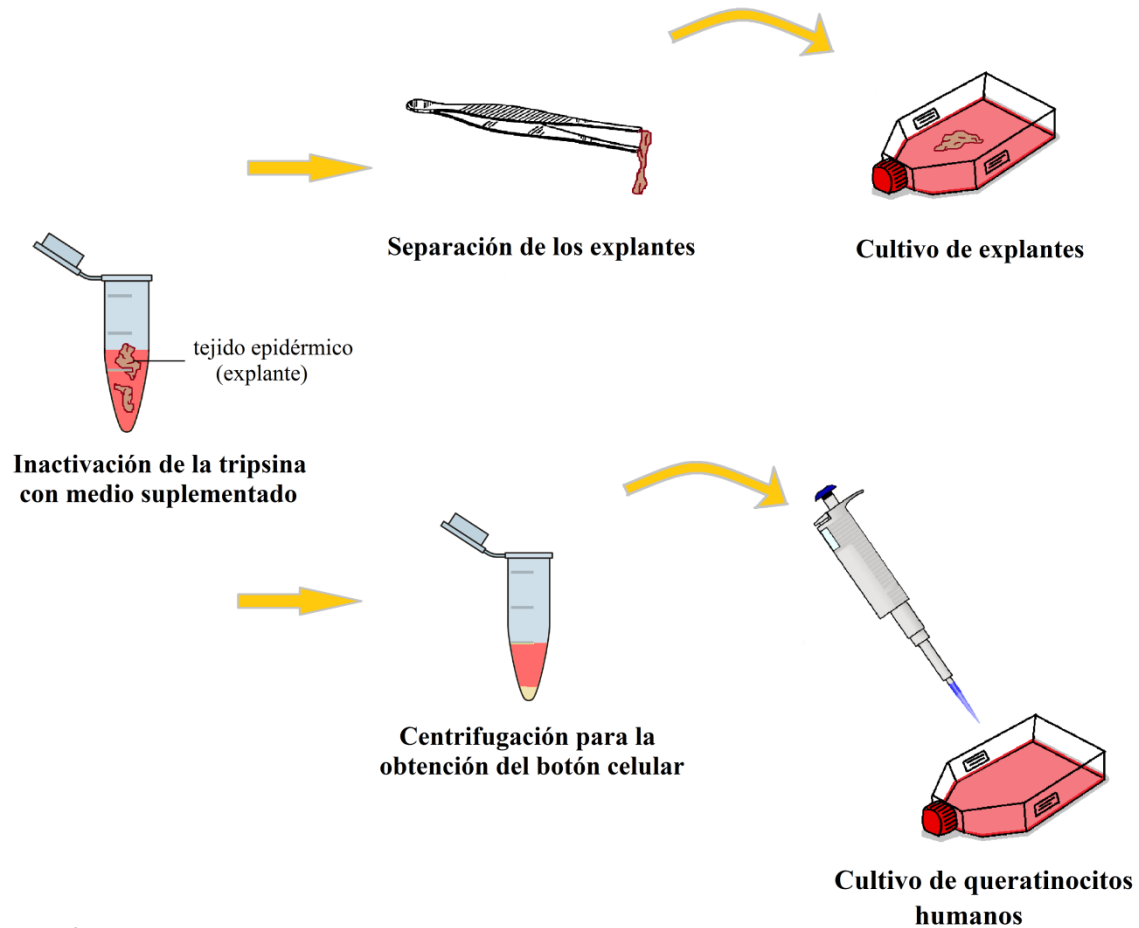


Figura 13. Técnica para el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos humanos.

2. Se estableció la técnica de cultivo de queratinocitos y fibroblastos humanos a partir de tejido remanente de cirugías plásticas (Figura 14).

Cultivo de queratinocitos y fibroblastos humanos de remanentes de abdominoplastías

Queratinocitos



Fibroblastos

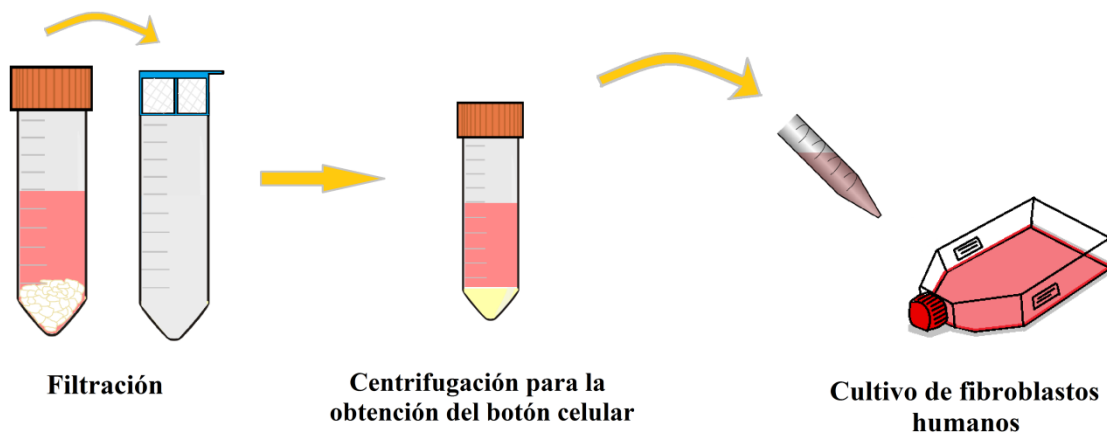


Figura 14. Técnica de cultivo de queratinocitos y fibroblastos humanos. Original.

3. Se logró el cultivo de queratinocitos y fibroblastos

3.1 Los cultivos de queratinocitos humanos sobre “feeder layers” se hicieron de dos formas: a) cultivo de células aisladas y b) cultivo en explante. También se realizaron cultivos de queratinocitos sin “feeder layer”, obteniendo un crecimiento más lento en comparación con los cultivos sobre “feeder layer”.

Los queratinocitos aislados fueron cultivados a una densidad de $50,000\text{cel}/\text{cm}^2$. Los cultivos con cada uno de ellos fueron monitoreados cada tres días. Se tomaron fotografías de los cultivos a 8 días en cultivo a un aumento de 10X, en campo claro con ayuda del programa AxioVision. En la figura 15 se muestran las imágenes de los cultivos de queratinocitos sobre “feeder layer” a 8 días en cultivo con tres medios distintos. En A se muestra el cultivo de queratinocitos sobre “feeder layer” con medio DMEM/F-12 y en B cultivo de queratinocitos sin “feeder layer” con el mismo medio, la morfología celular se ve distinta, en el cultivo sobre “feeder layer” se observan células redondas y con un tamaño menor que las sembradas sin “feeder layer”, donde se puede ver una morfología de tipo triangular y con un tamaño mayor al de los queratinocitos cultivados sobre “feeder layer”, también se alcanza a ver una confluencia total en las cajas de cultivo con “feeder layer” mientras que la confluencia es menor en las cajas de cultivo sin “feeder layer”.

En C se muestra el cultivo de queratinocitos aislados cultivados sobre “feeder layer” con un medio para células epiteliales, Epilife, en D se observa el cultivo de queratinocitos aislados sin “feeder layer” con el mismo medio. En la figura C la morfología celular se ve de un tamaño mayor que en la figura D, mientras que su morfología es de tipo triangular; muy parecida a lo que se observa en cultivo sin “feeder layer” y con medio DMEM/F-12. La figura D muestra unas células de tamaño menor que en C, pero con una morfología heterogénea, ya que muchas células son de tipo redondo y otras son de tipo triangular, la confluencia que se muestra no varía significativamente entre una caja y otra, es decir entre las células sembradas con Epilife con o sin “feeder layer”, pero si se compara con las células sembradas con medio DMEM/F-12 sin “feeder layer” (Fig. B) se pueden observar similitudes, mientras si las comparamos con las células sembradas en DMEM/F-12 con

“feeder layer” (Fig. A), se observa que C y D tienen una confluencia menor al 100% y con una morfología similar entre A y D pero no entre A y C.

En la figura E se muestra el cultivo de queratinocitos aislados cultivados sobre “feeder layer” con medio M154 y en F cultivo de queratinocitos aislados sin “feeder layer” con el mismo medio. Cabe mencionar que este medio es un medio de cultivo comercial específico para cultivo de queratinocitos y se puede observar que a 8 días es el medio en donde aún con “feeder layer” (Fig. E) no se tienen células adheridas y que sin “feeder layer” se tiene una confluencia muy baja si se compara con A, B, C, y D. También se puede observar que la “feeder layer” de la figura E se ha perdido conforme los días pasan. Se piensa que esta pérdida de fibroblastos puede deberse a que este medio es un medio selectivo para el crecimiento de queratinocitos únicamente.

Cultivos de queratinocitos sembrados con diferentes medios

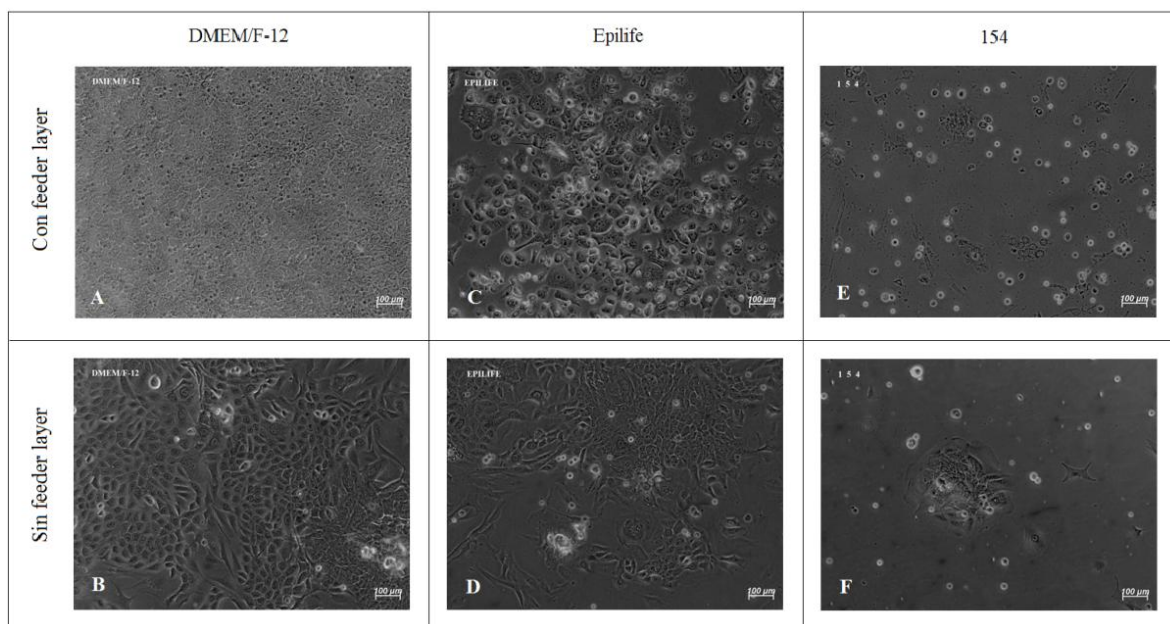


Figura 15. Cultivo de queratinocitos humanos aislados de epidermis a 8 días de cultivo. Microfotografía en campo claro, aumento 10X. A) Cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sobre “feeder layer” sembrados con DMEM/F-12. B) Cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sin “feeder layer” sembrados con DMEM/F-12. C) Cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sobre “feeder layer” sembrados con Epilife. D) Cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sin “feeder layer” sembrados con Epilife. E) Cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sobre “feeder layer” sembrados con M154. F) Cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sin “feeder layer” sembrados con M154.

3.2 Los cultivos de fibroblastos humanos se realizaron a una densidad de $10,000 \text{ cel/cm}^2$, se sembró con medio DMEM/F-12 suplementado. La siguiente figura (16) muestra una fotografía del cultivo *in vitro* de fibroblastos humanos en expansión cultivados con medio DMEM/F-12 al 10% S. F. B. y 1% de Antibiótico-Antimicótico, tomada a los 3 días en cultivo a un aumento de 10X, en campo claro con ayuda del programa AxioVision.

Cultivo de fibroblastos

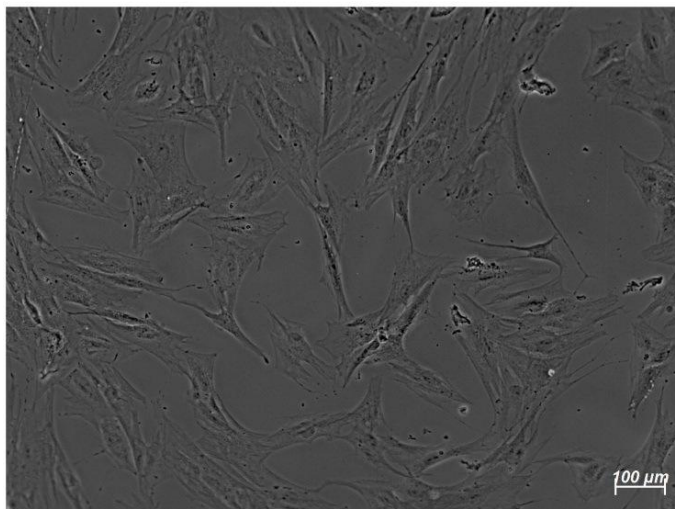


Figura 16. Cultivo *in vitro* de fibroblastos humanos a 3 días de cultivo, sembrados con medio DMEM/F-12 al 10% S. F. B. Microfotografía en campo claro, aumento 10X.

4. Se determinó la viabilidad de queratinocitos y fibroblastos humanos en cultivos *in vitro*.

4.1 Una vez logrados los cultivos de queratinocitos *in vitro*, la viabilidad de éstos se realizó utilizando el Kit LIVE/DEAD® Viability/Citotoxicity. Se realizó esta prueba a los cultivos de queratinocitos sembrados con DMEM/F-12 + 1% HKGS sobre “feeder layer”, ya que fue el cultivo celular que se observó con un mayor crecimiento y por el cual finalmente se optó. Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio Zeiss Axio Observer con fluorescencia, usando el programa AxioVision a ocho días de cultivo. En los cultivos *in vitro* se puede observar una coloración en verde fluorescente de las células vivas, mientras que las células muertas se observan con una coloración en rojo (Figura 17).

Viabilidad en cultivo de queratinocitos

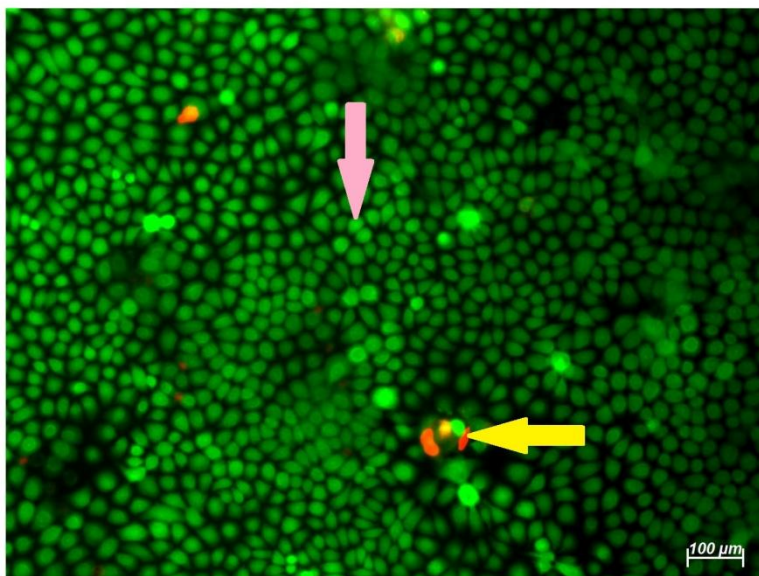
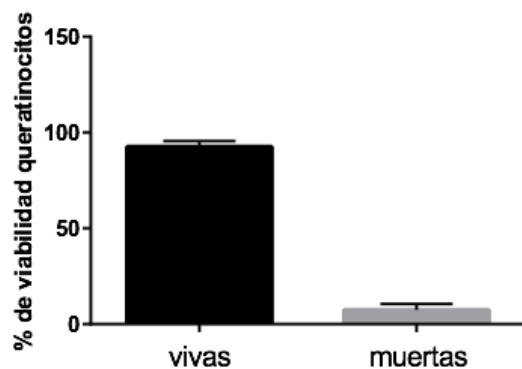


Figura 17. Prueba de viabilidad para queratinocitos a 8 días de cultivo, sembrados con medio DMEM/F-12 + HKGS 1X sobre "feeder layer". Microfotografía aumento 10X. Flecha rosa indicando células teñidas con Calceína-AM, flecha amarilla indicando células teñidas con homodímero de etidio-1.

4.1.1 Los resultados de la viabilidad de los cultivos *in vitro* de queratinocitos fueron analizados cuantitativamente con el programa Image J en donde se realizaron conteos de un campo determinado por triplicado. Con los datos obtenidos en este programa se hizo el análisis estadístico con el programa GraphPad Prism 6, obteniendo la siguiente gráfica de viabilidad:

Viabilidad del cultivo de queratinocitos *in vitro*



Gráfica 1. En esta gráfica se observa el porcentaje de viabilidad obtenido cuantitativamente de los cultivos de queratinocitos humanos *in vitro*, sembrados con medio DMEM/F-12 + HKGS 1X sobre “feeder layer”. El porcentaje de células vivas en promedio es de 92.55 % y 7.45 % de células muertas, datos con un error estándar de 0.79.

4.2 La viabilidad de los cultivos de fibroblastos *in vitro* se realizó utilizando el Kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity. Las microfotografías fueron tomadas a tres días de cultivo, en un microscopio Zeiss Axio Vision Observer con fluorescencia, utilizando el programa AxioVision. En los cultivos *in vitro* se puede observar una coloración en verde fluorescente de las células vivas, mientras que las células muertas se observan con una coloración en rojo (figura 18).

Viabilidad en cultivo de fibroblastos

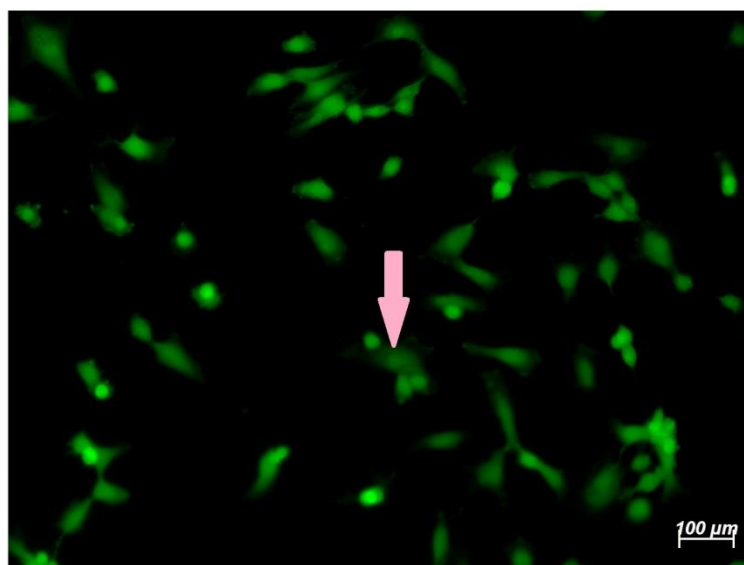
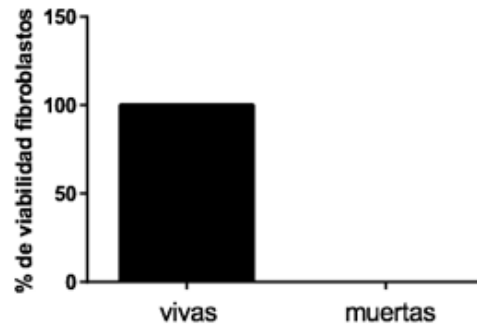


Figura 18. Viabilidad del cultivo de fibroblastos sembrados con DMEM/F-12 + S. F. B. 10% + Antibiótico-Antimicótico 1%. Flecha en rosa muestra fibroblastos marcados con Calceína-AM, no se observan células teñidas con homodímero de etidio-1.

4.2.1 Los **resultados de la viabilidad de los cultivos *in vitro*** de fibroblastos fueron analizados cuantitativamente con el programa Image J en donde se realizaron conteos de un campo determinado por triplicado. Con los datos obtenidos en este programa se hizo el análisis estadístico con el programa GraphPad Prism 6, obteniendo la siguiente gráfica de viabilidad:

Viabilidad del cultivo de fibroblastos *in vitro*



Gráfica 2. Se observa en esta gráfica el porcentaje de viabilidad obtenido cuantitativamente de los cultivos de fibroblastos sembrados con DMEM/F-12 + S. F. B. 10% + Antibiótico-Antimicótico 1%. El porcentaje de células vivas es de 100 % y 0 % de muertas, con un error estándar de cero (0).

5. Se valoró la proliferación y se realizó una caracterización del fenotipo celular tanto de queratinocitos como de fibroblastos humanos en cultivos *in vitro*.

5.1 La caracterización fenotípica y proliferación de los cultivos *in vitro* de queratinocitos humanos se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos CK5 y CK10 como marcadores. El Ki67 se utilizó para medir la proliferación celular, mientras que el DAPI fue empleado como marcador de núcleos. Las siguientes imágenes muestran los cultivos de queratinocitos *in vitro* tanto cultivados sobre "feeder layer" como sin ésta, el inmunofenotipo obtenido y la proliferación mostrada por las células en cultivo.

Como se mencionó anteriormente para el cultivo de queratinocitos humanos se utilizaron tres medios diferentes: DMEM/F-12, Epilife y M154.

5.1.1 Caracterización fenotípica del cultivo de queratinocitos humanos sin "feeder layer".

En la figura 19 se muestra el cuadro comparativo del cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sembrados sin "feeder layer" a 8 días de cultivo, utilizando tres medios distintos y donde se muestra el marcaje para CK5, CK10 y Ki67. En A se observan queratinocitos sembrados sin "feeder layer" marcados con Ki67 (marcador de proliferación celular), donde se ve una gran cantidad de células positivas a este marcador; estas mismas células en B muestran que casi en su totalidad están marcadas para CK5, un marcador de queratinocitos basales; en C podemos ver la unión de las

figuras A y B donde puede verse que las células en proliferación están marcadas casi en su totalidad con CK5, por lo que podemos ver que tenemos queratinocitos basales en proliferación. En H se observan queratinocitos con medio Epilife, sin “feeder layer” marcados con Ki67, donde se puede observar un porcentaje menor a los sembrados con DMEM/-F12; en I tenemos queratinocitos sembrados con Epilife sin “feeder layer” marcados para CK5, donde al igual que en B, las células casi en su totalidad son positivas a CK5; en la figura J podemos ver la imagen H e I juntas, y se observa que las células en proliferación son las que fueron positivas a CK5, como también pasó en la figura C. En O tenemos queratinocitos sin “feeder layer” cultivadas con medio M154, donde las células en proliferación en porcentaje son muy similares a H, pero difieren mucho de A; en P se ven casi todas las células marcadas para CK5, tal como pasó con B e I; en Q se juntan las imágenes de O y P, y se pueden notar nuevamente que casi todas las células en proliferación son positivas a CK5.

En las figuras E, L y S se observan queratinocitos sin “feeder layer” y cultivados con medio DMEM/F-12, Epilife y M154 respectivamente, marcados con DAPI y CK10, donde se observa que la mayoría son positivas; L y S son parecidas mientras que E muestra menor cantidad de células teñidas; cabe mencionar que las células marcadas para CK5 superan a las de CK10. En F, M y T tenemos queratinocitos marcados para Ki67 y CK10 en medios DMEM/F-12, Epilife y M154, respectivamente, pero a diferencia de las marcadas con Ki67 y CK5, podemos ver una coincidencia un poco menor en cuanto a las células marcadas al mismo tiempo con ambos anticuerpos, sobretodo en el caso de DMEM/F-12 donde mucho menos células marcadas con Ki67 son positivas a su vez a CK10 (Fig. F). Finalmente podemos decir de manera rápida que los queratinocitos con DMEM/F-12 sin “feeder layer”, resultaron con una proliferación (Ki67) mayor a los que contienen Epilife y M154, mientras que estos últimos tuvieron una proliferación muy parecida. En el caso de las células positivas a CK5, en los tres medios se observó casi igual y se puede ver casi en su totalidad están teñidas. Las células con que se veían en proliferación eran en su mayoría células teñidas con CK5, en los tres medios. Por otro lado, en el caso de la CK10, se observó una gran cantidad de células positivas en los tres casos, pero en menor proporción en las de DMEM/F-12, y en general ligeramente menor en los tres medios a comparación de la CK5. Los cultivos con Epilife y M154 fueron parecidos en cuanto a la marcación para Ki67 y CK10, ya que en ambos casos, casi todas las células en proliferación fueron positivas para CK10, por otro lado, las que tenían DMEM/F-12 tuvieron una coincidencia un poco menor a los dos marcadores a la vez.

Caracterización fenotípica y proliferación de cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sin feeder layer

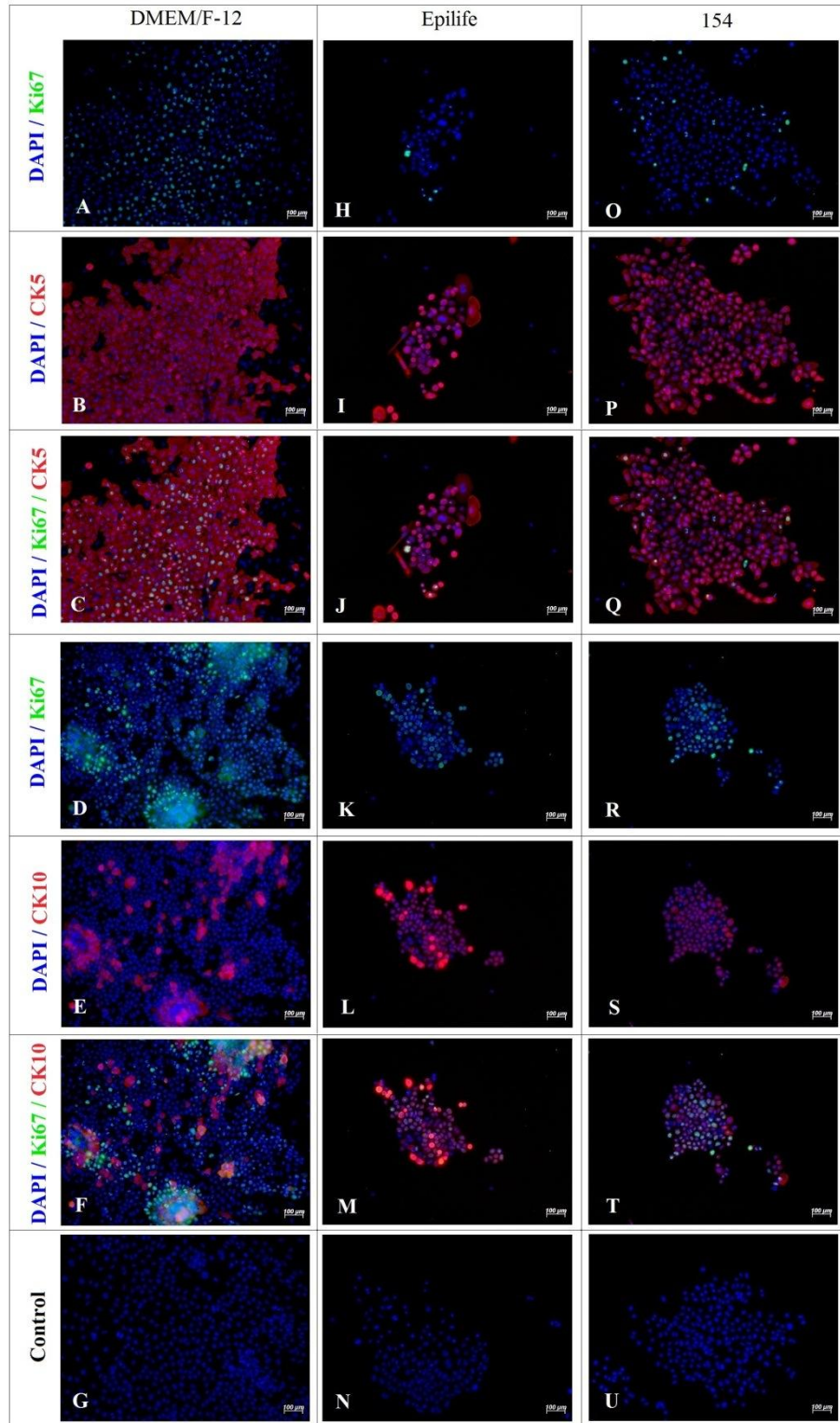


Figura 19. Inmunofenotipo y proliferación de queratinocitos humanos cultivados *in vitro* sin “feeder layer”, en tres diferentes medios de cultivo con 1% de HKGS. A) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. B) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a CK5 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. C) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK5 (rojo), núcleos teñidos con DAPI. D) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde), núcleos teñidos con DAPI. E) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a CK10 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. F) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK10, y núcleos teñidos con DAPI. G) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, control negativo, núcleos teñidos con DAPI. H) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. I) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a CK5 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. J) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK5 (rojo), núcleos teñidos con DAPI. K) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. L) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a CK10 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. M) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK10, y núcleos teñidos con DAPI. N) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, control negativo, núcleos teñidos con DAPI. O) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. P) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a CK5 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. Q) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK5 (rojo), núcleos teñidos con DAPI. R) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. S) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a CK10 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. T) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK10, núcleos teñidos con DAPI. U) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, control negativo, núcleos teñidos con DAPI.

5.1.2 Caracterización fenotípica del cultivo de queratinocitos humanos sobre “feeder layer”

En la figura 20 se muestra el cuadro comparativo del cultivo de queratinocitos humanos sembrados sobre “feeder layer” a 8 días de cultivo, utilizando tres medios distintos y donde se muestra el marcaje para CK5, CK10 y Ki67. En A se ven queratinocitos sembrados con “feeder layer” marcados con Ki67 y DAPI, cultivados con DMEM/F-12, con una cantidad muy pequeña en proliferación (Ki67). En H los queratinocitos con “feeder layer” y Epilife, muestran una cantidad aún más baja de proliferación. En O los queratinocitos con “feeder layer” y M154 no tienen ninguna célula marcada proliferando. Para el marcaje con CK5, las células en los tres medios (Fig. B, Y, P) dieron positivo casi en su totalidad. Las células con fueron parecidas, DMEM/F-12 y Epilife, ya que la mayoría de las células marcadas para Ki67 estaban teñidas para CK5, en el caso de M154 no hubo marcaje positivo a Ki67. Los queratinocitos marcados con CK10 fueron en su mayoría positivos en los tres medios, pero en menor cantidad que las marcadas con CK5. Con Ki67 y CK10 no se vio una coincidencia grande de células teñidas con ambos a la vez.

Caracterización fenotípica y proliferación de cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos sobre feeder layer

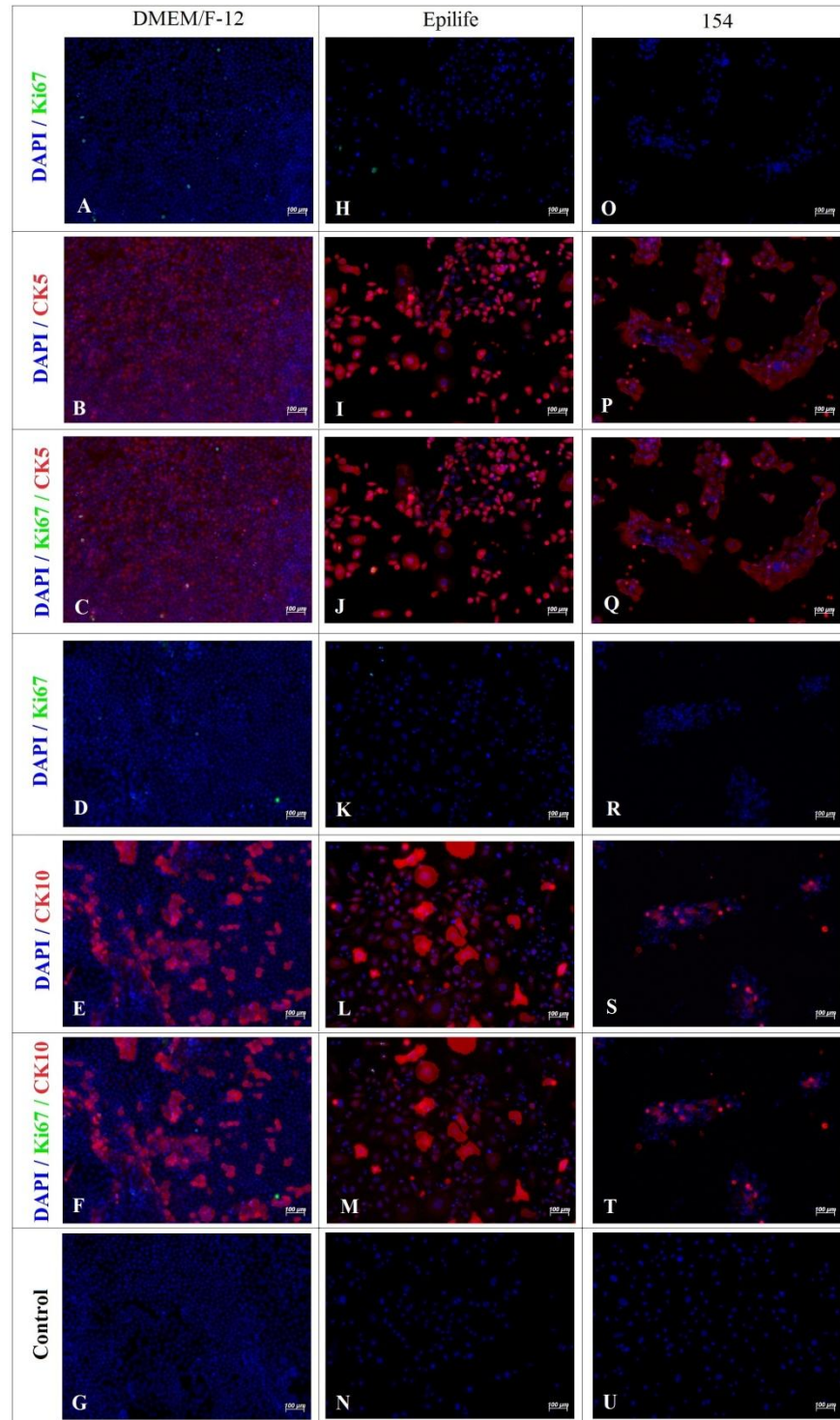


Figura 20. Inmunofenotipo y proliferación de queratinocitos humanos cultivados *in vitro* con “feeder layer”, en tres diferentes medios de cultivo con 1% de HKGS. A) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. B) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a CK5 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. C) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK5 (rojo), núcleos teñidos con DAPI. D) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde), núcleos teñidos con DAPI. E) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a CK10 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. F) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK10, y núcleos teñidos con DAPI. G) Cultivo en medio DMEM/F-12 - 1%HKGS, control negativo, núcleos teñidos con DAPI. H) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. I) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a CK5 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. J) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK5 (rojo), núcleos teñidos con DAPI. K) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. L) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a CK10 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. M) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK10, y núcleos teñidos con DAPI. N) Cultivo en medio Epilife - 1%HKGS, control negativo, núcleos teñidos con DAPI. O) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. P) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a CK5 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. Q) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK5 (rojo), núcleos teñidos con DAPI. R) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y núcleos teñidos con DAPI. S) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a CK10 (rojo) y núcleos teñidos con DAPI. T) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, positivos a Ki67 (verde) y CK10, núcleos teñidos con DAPI. U) Cultivo en medio 154 - 1%HKGS, control negativo, núcleos teñidos con DAPI.

5.1.3 Los resultados de la caracterización fenotípica y proliferación de los cultivos *in vitro* de queratinocitos humanos fueron analizados cuantitativamente con el programa Image J (Tabla 1). Para esto, se tomaron fotografías de los cultivos a analizar; las fotografías se introdujeron al programa para cuantificarlas con la ayuda de una marca en las células mientras se iban contando, y un contador que indicaba el número total de células. Se sacaron porcentajes de células marcadas con cada anticuerpo, obteniendo los siguientes resultados:

Porcentaje de queratinocitos positivos, sembrados sin feeder layer

	DMEM/F-12	Epilife	M154
Ki67	68.33	21.68	22.61
CK5	90.3	97.29	97.88
Ki67 y CK5	71.58	20.63	16.27
CK10	86.07	82.26	84.83
Ki67 y CK10	64.76	22.45	28.86

Tabla 1. Porcentaje de queratinocitos sembrados sin “feeder layer” positivos a Ki67, CK5 y CK10, en medios DMEM/F-12, Epilife y M154.

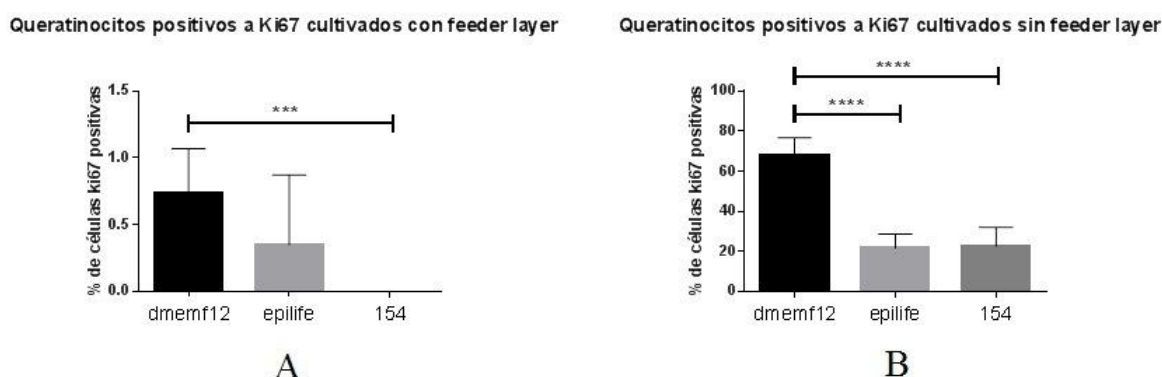
Porcentaje de queratinocitos positivos, sembrados con feeder layer

	DMEM/F-12	Epilife	M154
Ki67	0.74	0.35	0
CK5	89.44	95.29	93.01
Ki67 y CK5	0.63	0.27	0
CK10	80.23	84.3	83.18
Ki67 y CK10	0.15	0.07	0

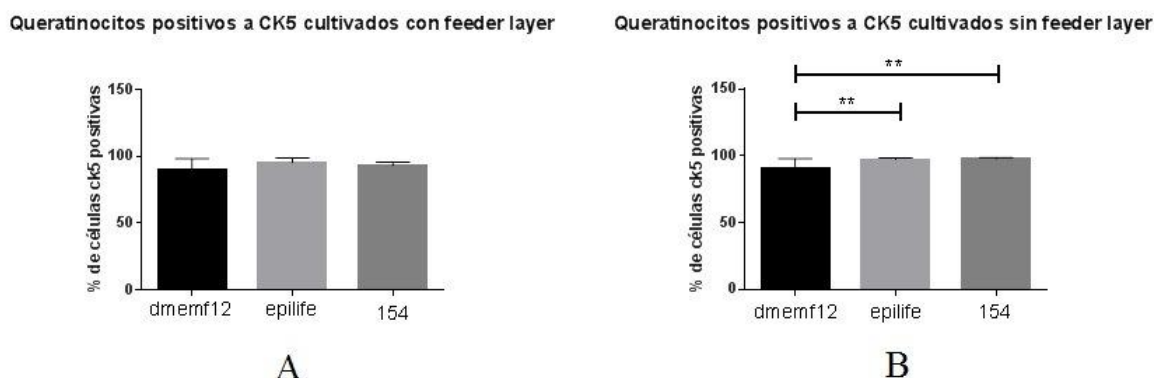
Tabla 2. Porcentaje de queratinocitos sembrados sobre “feeder layer” positivos a Ki67, CK5 y CK10, en medios DMEM/F-12, Epilife y M154.

Una vez que se obtuvieron los datos cuantitativos se hizo un análisis estadístico con el programa GraphPad Prism 6, de la expresión hacia los marcadores: CK5 (coloración en rojo), CK10 (coloración en rojo) y Ki67 (coloración en verde) en un campo determinado por triplicado.

Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica comparativa 3, en donde se ven los porcentajes de Ki67 en DMEM/F-12, Epilife y M154 con “feeder layer” y sin “feeder layer”. En A se ve la gráfica de los queratinocitos cultivados sobre “feeder layer”, donde sólo el 0.73% eran positivas en DMEM/F-12, el 0.35% en Epilife y el 0% en M154, siendo DMEM/F-12 con el que se presenta una mayor proliferación. En B se observa la gráfica para queratinocitos cultivados sin “feeder layer” en donde hay un porcentaje bastante mayor que en las células con “feeder layer”, con un 68.33% en DMEM/F-12, 21.68% en Epilife y 22.6% en M154.



En la gráfica comparativa 4 se ven los porcentajes de CK5 en DMEM/F-12, Epilife y M154 con “feeder layer” y sin “feeder layer”. En A se observa la gráfica de queratinocitos sembrados sobre “feeder layer”, donde en los tres medios se obtuvieron resultados muy similares, con 89.44% para DMEM/F-12, 95.29% para Epilife y 93.01% para M154. En B la gráfica muestra los porcentajes de queratinocitos sembrados sin “feeder layer”, que es similar al de A; en donde las diferencias entre los tres medios tampoco es grande, con un 90.3% en DMEM/F-12, 97.29% en Epilife y 97.88% en M154.



Gráfica 4. Comparación de los cultivos de queratinocitos humanos sembrados sobre “feeder layer” y sin ésta con diferentes medios con 1% de HKGS, y porcentaje de células marcadas con CK5. A) Cultivos de queratinocitos con “feeder layer” positivos a CK5; DMEM/F-12 89.44%, Epilife 95.29%, M154 93.01%. B) Cultivos de queratinocitos positivos a CK5 cultivados sin “feeder layer”; DMEM/F-12 90.3%, Epilife 97.29%, M154 97.88%.

En la gráfica 5 se observan porcentajes para Ki67 y CK5 en DMEM/F-12, Epilife y M154 con “feeder layer” y sin “feeder layer”. En A vemos queratinocitos sembrados sobre “feeder layer” que tienen un porcentaje de Ki67 y CK5 bajos, ya que las células observadas casi no muestran proliferación, siendo DMEM/F-12 las que tenían un porcentaje más grande (0.63%), Epilife con menos de la mitad (0.27%) y M154 con una expresión nula de ambos a la vez (0%). En B, queratinocitos sin “feeder layer”, podemos notar que la expresión de estos dos es bastante mayor al de los sembrados con “feeder layer”, siendo una vez más DMEM/F-12 nuevamente el que muestra un mayor porcentaje (71.58%), después Epilife (20.63%) y finalmente M154 (16.27%).

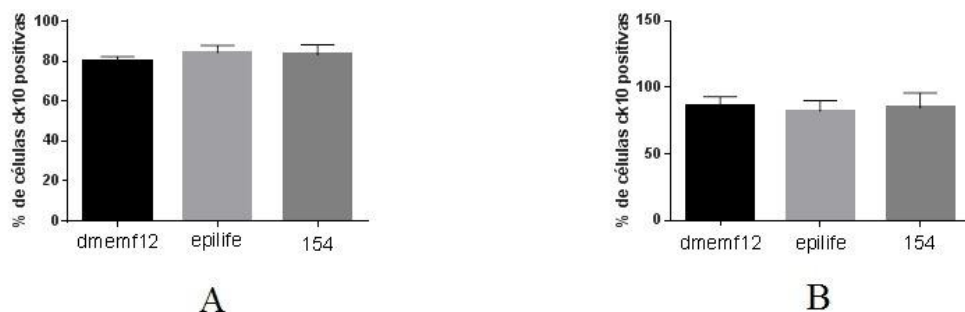
Queratinocitos positivos a Ki67 y CK5 cultivados con feeder layer Queratinocitos positivos a Ki67 y CK5 cultivados sin feeder layer



Gráfica 5. Comparación de los cultivos de queratinocitos humanos sembrados sobre “feeder layer” y sin ésta con diferentes medios con 1% de HKGS, porcentaje de células en proliferación (Ki67) y marcadas con CK5. A) Cultivos de queratinocitos con “feeder layer” positivos a Ki67 y CK5; DMEM/F-12 0.63%, Epilife 0.27%, M154 0%. B) Cultivos de queratinocitos positivos a Ki67 y CK5 cultivados sin “feeder layer”; DMEM/F-12 71.58%, Epilife 20.63%, M154 16.27%.

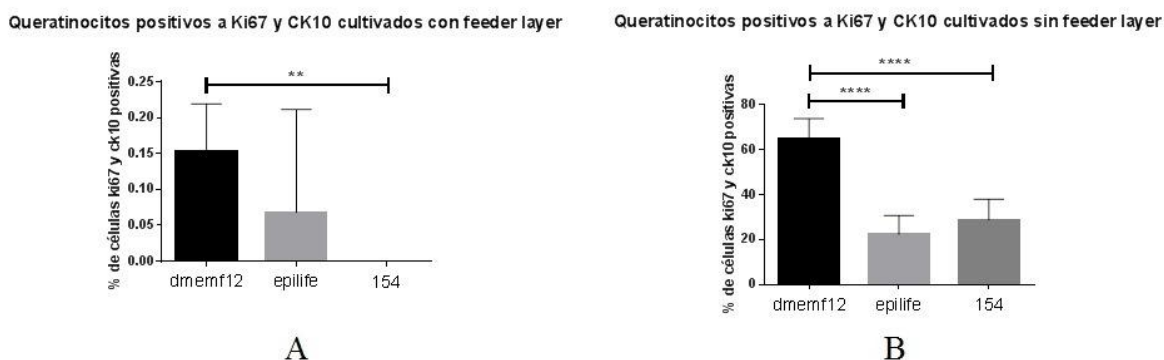
En la gráfica 6 vemos porcentajes de queratinocitos marcados para CK10, DMEM/F-12, Epilife y M154 con “feeder layer” y sin “feeder layer”. En A, los queratinocitos sobre “feeder layer” muestran un porcentaje de tinción alto en los tres medios, DMEM/F-12 con 80.23%, Epilife con 84.3% y M154 con 83.18%. En B los queratinocitos sembrados sin “feeder layer” tienen un porcentaje muy parecido al de las células con “feeder layer”, con un 86.07% en DMEM/F-12, 82.26% en Epilife y 84.83% en M154. En ambos casos los porcentajes fueron muy similares, con la mayoría de las células marcadas, pero en menor cantidad a los vistos con CK5.

Queratinocitos positivos a CK10 cultivados con feeder layer Queratinocitos positivos a CK10 cultivados sin feeder layer



Gráfica 6. Comparación de los cultivos de queratinocitos humanos sembrados sobre “feeder layer” y sin ésta con diferentes medios con 1% de HKGS, y porcentaje de células marcadas con CK10. A) Cultivos de queratinocitos con “feeder layer” positivos a CK10; DMEM/F-12 80.23%, Epilife 84.3%, M154 83.18%. B) Cultivos de queratinocitos positivos a CK10 cultivados sin “feeder layer”; DMEM/F-12 86.07%, Epilife 82.26%, M154 84.83%.

En la gráfica 7 se observan porcentajes para Ki67 y CK10 en DMEM/F-12, Epilife y M154 con “feeder layer” y sin “feeder layer”. En A vemos queratinocitos sembrados sobre “feeder layer” que tienen un porcentaje de Ki67 y CK5 bajos, ya que las células observadas casi no muestran proliferación, siendo DMEM/F-12 las que tenían un porcentaje más grande (0.15%), Epilife con menos de la mitad (0.07%) y M154 con una expresión nula (0%). En B, queratinocitos sin “feeder layer”, podemos notar que la expresión de estos dos es bastante mayor al de los sembrados con “feeder layer”, siendo una vez más DMEM/F-12 nuevamente el que muestra un mayor porcentaje (64.76%), el de menor porcentaje es Epilife (22.45%) y finalmente M154 (28.86%) con un porcentaje ligeramente mayor al de Epilife.



Gráfica 7. Comparación de los cultivos de queratinocitos humanos sembrados sobre “feeder layer” y sin ésta con diferentes medios con 1% de HKGS, y porcentaje de células en proliferación (Ki67) y marcadas con CK10. A) Cultivos de queratinocitos con “feeder layer” positivos a Ki67 y CK10; DMEM/F-12 0.15%, Epilife 0.07%, M154 0%. B) Cultivos de queratinocitos positivos a Ki67 y CK10 cultivados sin “feeder layer”; DMEM/F-12 64.76%, Epilife 22.45%, M154 28.86%.

5.2 La caracterización fenotípica de los cultivos *in vitro* de fibroblastos humanos se realizó mediante la técnica de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo antígeno de superficie del fibroblasto como marcador, mientras que el DAPI fue empleado como marcador de núcleos. Las siguientes imágenes muestran los cultivos de fibroblastos *in vitro* (figura 21). Podemos ver en A las células marcadas en su totalidad con el anticuerpo mencionado.

Caracterización fenotípica de cultivo *in vitro* de fibroblastos humanos

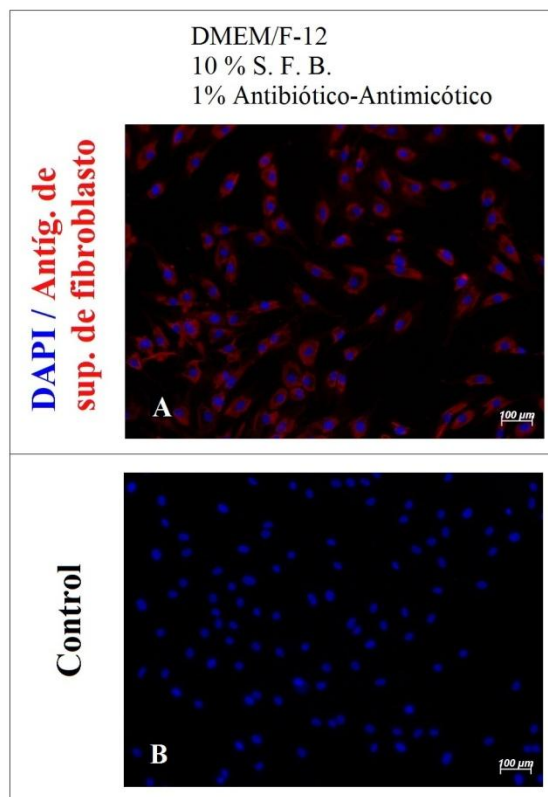
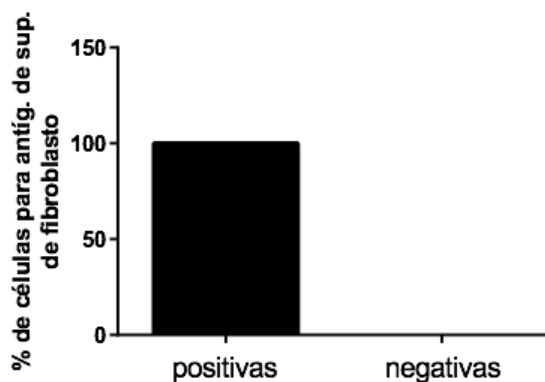


Figura 21. Expresión de antígeno de superficie de fibroblasto en fibroblastos humanos *in vitro* cultivados con medio DMEM/F-12 con 10% S.F.B y 10% Antibiótico-Antimicótico. Los núcleos se encuentran teñidos con DAPI. A) Cultivos de fibroblastos *in vitro* marcados inmunofenotípicamente con el “Antígeno de superficie de fibroblasto”, núcleos de cultivos de fibroblastos *in vitro* teñidos con DAPI. B) Control negativo, núcleos de cultivos de fibroblastos *in vitro* teñidos con DAPI.

5.2.1 Los resultados de la caracterización fenotípica y proliferación de los cultivos *in vitro* de fibroblastos humanos fueron analizados cuantitativamente con el programa Image J, en donde se realizaron conteos de la expresión hacia el anticuerpo: antígeno de superficie del fibroblasto (rojo) en un campo determinado por triplicado.

Una vez obtenidos los datos cuantitativos se hizo un análisis estadístico con el programa GraphPad Prism 6 obteniendo los siguientes resultados:

Fibroblastos positivos a antígeno de superficie de fibroblasto



Gráfica 8. Fibroblastos marcados con antígeno de superficie de fibroblasto, donde se muestra un 100% de células positivas a dicho anticuerpo.

DISCUSIÓN

La decisión de tomar biopsias de piel de remanentes de cirugías plásticas de reducción de abdomen (abdominoplastías) fue debido a que se obtiene un tejido suficientemente grande, el cual es tratado como desecho biológico, por lo cual se necesita únicamente el consentimiento informado del paciente para poder tomar dicho tejido y aislar tanto queratinocitos como fibroblastos (principales componentes de la piel) y utilizarlos en bioingeniería de piel para compensar la pérdida de este tejido principalmente en pacientes con quemaduras.

Para la realización de la técnica del **aislamiento de queratinocitos** se revisó la literatura y se realizaron pruebas preliminares para el aislamiento de los dos tipos celulares principales de la piel (queratinocitos y fibroblastos) así como para realizar los cultivos *in vitro*, ya que como citan Sorrel y Caplan (2009) hay diferentes modos de aislar estos tipos celulares del tejido, uno de ellos es utilizando tripsina-EDTA, otro es con termolisina y otro con dispasa, siendo este último el que se utilizó.

Se siguió primero la técnica de Barlow y Pye (1990) en donde se utilizaban 2.5 mg de dispasa disuelta en 1 mL de medio DMEM durante 48 horas a 4°C sin agitación, para separar la capa epidérmica de la dérmica. Este método se tomó como base, realizándole una modificación en la

concentración ya que se utilizaron 3mg/ml de dispasa, durante una hora a 37°C en agitación, lo cual resultó una condición óptima, ya que se desprende en su totalidad la capa epidérmica de la dérmica y fue por la que se optó para la separación de ambas capas.

La tripsina se utilizó como la enzima con la cual se disgregaría la epidermis, siguiendo el método planteado por Barlow y Pye (1990), ellos cortan mecánicamente este tejido para posteriormente colocarlo en tripsina al 0.25%. En el laboratorio a diferencia de los autores antes mencionados, no se realizó la disgregación mecánica desde un principio, únicamente se efectuó la disgregación enzimática (una vez separada la epidermis de la dermis); las láminas de tejido epidérmico colocadas en tripsina-EDTA se mantuvieron en agitación (300 r.p.m) a una temperatura de 37°C, con lo que se observó se obtenía un buen número celular viable, para los cultivos *in vitro* de queratinocitos. También se utilizaron las láminas epidérmicas las cuales no se alcanzaron a disgregar con la enzima para realizar cultivo en explante, lo que más adelante se discutirá si es efectivo para nuestros fines o no.

En cuanto a la técnica de aislamiento de fibroblastos, se probaron dos formas, la primera fue utilizando colagenasa I a una concentración de 10% con recuperaciones celulares cada 30 minutos, colocándolas en medio DMEM/F-12 suplementado al 10% con S. F. B. (para neutralizar la acción de la enzima), y realizando un conteo al final de las cuatro recuperaciones totales. Este método implica menos tiempo en la enzima, por lo que podía quedar un poco de tejido sin disgregar, este tejido sin disgregar (a diferencia de las láminas epidérmicas) no se utilizó en cultivo en explante, ya que los cultivos se contaminaban con mayor facilidad; también debido a que el método por explante en dermis no es tan eficiente como en epidermis ya que se obtiene un número celular bajo, debido a que el tejido conectivo donde se encuentran los fibroblastos se compone de una red de colágena, y los fibroblastos presentes se encuentran en una proporción más pequeña, por lo cual resulta difícil para estos atravesar esta red de colágena y adherirse a las cajas de cultivo, obteniendo cultivos *in vitro* de aproximadamente 20% de confluencia en cajas T25 a 3 semanas en cultivo.

La otra forma de aislamiento de fibroblastos fue realizada como en el trabajo de Noronha et al. (2014), donde se deja el tejido disgregado mecánicamente en colagenasa I al 1% durante toda la noche y en agitación a 37°C, lo cual implica un mayor tiempo, pero el tejido se alcanza a disgregar en su totalidad y el número celular obtenido es mayor. Comparando los resultados entre una y otra técnica se puede decir que no varía el número celular obtenido, pero se optó por dejarlo toda la noche ya que se utiliza una concentración menor de enzima (colagenasa I).

La técnica empleada para el cultivo de queratinocitos, como se mencionó, fue de acuerdo a dos metodologías: sobre “feeder layer” (capa alimentadora) y sin “feeder layer”.

Se utilizó la técnica de Barlow y Pye (1990), realizando pruebas de densidad celular para los fibroblastos que formarían las “feeder layers”, donde ellos mencionan que la confluencia empleada de fibroblastos fue de 50-70%, por lo que se probó con diferentes densidades, obteniendo la densidad óptima para “feeder layers” en 15000 cel/cm²; ésta densidad en las “feeder layers” permitió un crecimiento de manera óptima, observando que los queratinocitos se anclaban entre los espacios dejados por los fibroblastos mitomizados, permaneciendo cerca de ellos. Siguiendo la misma técnica de Barlow y Pye, los queratinocitos fueron cultivados por primera vez en medio DMEM F12 con 2.5% de SFB ya que esto permite, en el caso de los explantes, que los queratinocitos invadan la superficie de la caja de cultivo al desprenderse de la lámina de tejido epidérmico, y que estas células se adhieran a los fibroblastos adyacentes y puedan comenzar a colonizar la caja de cultivo; para el primer cambio de medio se colocó el factor de crecimiento para queratinocitos, ya que los autores mencionan que de ser añadido antes, los cultivos difícilmente se logran.

Las láminas epidérmicas de tejido no disgregado se colocaron sobre las capas alimentadoras, evitando en lo posible el movimiento de la caja de cultivo, ya que se observó que el roce de las láminas sobre los fibroblastos mitomizados los desprende.

Para los queratinocitos aislados del tejido, se siguió el mismo procedimiento, se cuantificaron y colocaron sobre “feeder layers”, Barlow y Pye utilizan una densidad de 12,500-25,000 cel/cm², argumentando que dicha densidad para cultivo *in vitro* de queratinocitos debe ser alta para que logren expandirse en la capa alimentadora; utilizando la misma idea se sembró a distintas densidades, partiendo de las utilizadas por estos autores, y llegando a la densidad óptima de 50,000 cel/cm². También estos autores mencionan que la densidad óptima para los queratinocitos sembrados sin “feeder layer” es de 62,500-125,000 cel/cm², ya que el número de células sembradas debe ser mucho mayor para que se logre la expansión; tras diversas pruebas se estableció la densidad de 100,000 cel/cm² como densidad óptima de sembrado sin “feeder layer”.

Para el cultivo de queratinocitos, éstos se obtuvieron tanto del aislamiento de células de la lámina de tejido epidérmico y cultivos en explante, para lo cual se probaron tres medios de cultivo distintos: a) un medio universal (DMEM/F-12), b) un medio para células epidérmicas (Epilife) y c) un medio específico para cultivo de queratinocitos (M154), a los cuales después del primer cambio de medio se les adicionó 1% de HKGS. Cabe mencionar que los medios fueron preparados sin

Antibiótico-Antimicótico, ya que se ha reportado que éste reduce el crecimiento de los queratinocitos.

En los queratinocitos aislados de piel humana sobre “feeder layer” y sin ésta, se observó que la mejor manera de cultivar queratinocitos aislados es utilizando una “feeder layer” con medio DMEM/F-12, a pesar de no ser un medio específico para este tipo celular como lo son Epilife y M154.

En cuanto a la técnica de cultivo para fibroblastos (a diferencia de la de queratinocitos) fue una tarea un poco más sencilla, ya que está muy bien documentada en la literatura. Según Rolin y colaboradores (2014), una vez que se tienen aislados los fibroblastos del tejido dérmico, deben ser contados y sembrados a una densidad de 25,000cel/cm² y cultivados con medio DMEM/F-12 con 10% S. F. B. y 1% de Antibiótico-Antimicótico, técnica que se empleó en el laboratorio variando la densidad a 10,000cel/cm², resultando en cultivos de fibroblastos viables alcanzando una confluencia de 100% en 10 días.

Una diferencia notoria que existe entre los queratinocitos y los fibroblastos, y que se observó durante la estandarización de ambos cultivos, es que los queratinocitos requieren de una capa alimentadora para poder crecer y dependen del FGF7 (factor de crecimiento de fibroblasto 7), mientras que los fibroblastos crecen fácilmente sin ayuda de una. Otro aspecto que se observó fue que para el tiempo en que los fibroblastos ya habían alcanzado una confluencia del 100%, los queratinocitos aún no alcanzaban la confluencia deseada del 60%, su crecimiento fue más lento. Cabe mencionar que en los queratinocitos se optó por este porcentaje para hacer los pases, debido a que mientras más tiempo permanecían en cultivo, las células iban diferenciándose, hasta el punto de desprenderse. Por lo anterior podemos decir que la obtención de fibroblastos es más fácil si se logra una disgregación en el tejido dérmico.

Se encontró sobre la **viabilidad de cultivos**, que se logran cultivos considerablemente viables tanto de queratinocitos como de fibroblastos humanos, los cuales pueden ser empleados en un futuro para cultivos sobre materiales biosintéticos en bioingeniería de piel.

El inmunofenotipo y proliferación de queratinocitos fueron analizados al mismo tiempo en las células cultivadas sobre “feeder layer” y sin ella, con medio DMEM/F-12, Epilife y M154, con el

fin de verificar si las células en cultivo eran queratinocitos, si estas estaban en proliferación y que medio era el óptimo para dichos cultivos.

Los cultivos de queratinocitos *in vitro* en las distintas condiciones de cultivo mostraron un porcentaje alto de células positivas a marcadores para queratinocitos humanos (CK5 y CK10), sin una diferencia significativa entre ellos, por lo que se podemos decir que en todas estas condiciones se obtiene el tipo celular deseado.

Los porcentajes de los queratinocitos humanos *in vitro* marcados para Ki67 (proliferación), fueron considerablemente más altos en los que fueron sembrados sin “feeder layer”. La diferencia entre el porcentaje de células en proliferación entre los cultivos sin “feeder layer” y con “feeder layer”, puede deberse a que los queratinocitos con “feeder layer” llegaron a confluencia antes y las células dejaron de proliferar y comenzaron a diferenciarse como pasaría en la vida de un queratinocito en la piel.

La determinación del inmunofenotipo de fibroblastos se hizo utilizando “Antígeno de superficie de fibroblasto”, donde se obtuvieron fibroblastos marcados positivos en su totalidad. Por lo que podemos decir que los cultivos de fibroblastos, a comparación de los de queratinocitos, no mostraron “contaminación” de otro tipo de celular.

CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos de remanentes de cirugías de abdominoplastías, así como su posterior cultivo *in vitro* y expansión celular. Los cultivos *in vitro* de queratinocitos fueron viables, positivos a los marcadores de proliferación. Los cultivos *in vitro* de queratinocitos mostraron un fenotipo celular positivo a CK5 y CK10, en tanto los cultivos *in vitro* de fibroblastos mostraron un fenotipo celular positivo al antígeno de superficie del fibroblasto.

PERSPECTIVAS

Ante la falta de zonas donadoras de los pacientes con quemaduras de tercer grado se emplean los sustitutos biológicos dermo-epidérmicos, los cuales no se encuentran en muchas ocasiones al alcance de los pacientes y cuando se encuentran disponibles afectan la economía familiar, entre otras. Por esto, el trabajo de estandarización realizado en la presente tesis es la base para la obtención de los principales tipos celulares de la piel (tejido tegumentario), los cuales se emplearán para el desarrollo de sustitutos biológicos heterólogos para el tratamiento de quemaduras de tercer grado de los pacientes del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación, los cuales serán desarrollados bajo los más estrictos estándares de calidad dentro de la unidad GMP del Laboratorio de Biotecnología.

El desarrollo de un sustituto biológico dermo-epidérmico heterólogo conlleva el uso y aplicación de distintas técnicas microbiológicas, de control de calidad, almacenamiento y distribución, ya sea de las células aisladas o constructos generados, dichas técnicas se encuentran establecidas para productos de grado médico en las diferentes NOM's, y serán desarrollados dentro del laboratorio de Biotecnología.

La relación que existe entre queratinocitos y fibroblastos se encuentra reportada en la literatura desde los años 60's y sigue siendo un tema de estudio importante ya que es la base para la investigación básica en el entendimiento del crecimiento, migración, proliferación de los dos tipos celulares principales del sistema tegumentario, las diferentes rutas de señalización que llevan a que estos tipos celulares se complementen y lo que podría ayudarnos a beneficiar los productos dérmicos en la clínica.

Por último, el andamio a utilizar para el desarrollo del sustituto biológico dermo-epidérmico para pacientes con quemaduras de tercer grado será un amnios humano radioesterilizado, al cual se le cultivarán las células de piel heterólogas aisladas, tema de estudio en próximos trabajos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andreassi, L. "History of keratinocyte cultivation". *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*. 1992; 18.
2. Barlow, Y., y Pye, R. J. "Keratinocyte Culture". *Methods in Molecular Biology*. Vol. 5. *Animal Cell Culture*. Ed. Humana Press. Clifton, New Jersey. 1990. pp: 83-97.
3. Böttcher-Haberzeth, S.; Biedermann, T.; y Reichmann, E. "Tissue engineering of skin". *Burns* 36 450–460. 2010.
4. Clark, A. F.; Ghosh, K.; y Tonnesen, M. G. "Tissue Engineering for Cutaneous Wounds". *Journal of Investigative Dermatology* (2007) 127, 1018–1029.
5. Drago, H.; Marin, G. H.; Sturla, F.; Roque G.; Martire, K.; Díaz-Aquino, V.; Lamonega, R.; Gardiner, C.; Ichim, T.; Riordan, N.; Raimondi, J. C.; Bossi, S.; Samadikuchaksaraei, A.; van Leeuwen, M.; Tau, J. M.; Nuñez, L.; Larsen, G.; Spretz, R.; y Mansilla, E. "The next generation of burns treatment. Intelligent films and matrix, controlled enzymatic debridement, and adult stem cells. Transplantation Proceedings" 42 245-349, 2010.
6. Freddi, O., y Kestens, G. "Quemaduras graves". *Medicina Intensiva*, Dr. Carlos Lovesio. Editorial El Ateneo, Buenos Aires. 2001.
7. Gallardo, R.; Ruíz, J. G.; Torres, R. M.; y Díaz, J. "Estado actual del manejo urgente de las quemaduras (I) fisiopatología y valoración de la quemadura". *Emergencias* 1 122-129, 2000.
8. Gartner, L. P., y Hiatt, J. L. "Texto Atlas de Histología". McGraw-Hill Interamericana. 2ª ed. México, D. F. 2002. pp: 311-319.
9. Gilbert, S. F. "Biología del Desarrollo". Ed. Médica Panamericana. 5ª ed. 2005. pp: 445-449.
10. González-Morán, M. G. "Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular". AGT Editor. 1ª ed. México, D. F. 2008. pp: 181, 253.
11. Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel M.; Hinder, S.; y Schenke-Layland, K. "Skin tissue engineering- *In vivo* and *in vitro* applications". *Advanced drug delivery review* 128 52-66, 2011.

12. Guo, A., y Jahoda, A. B. "An improved method of human keratinocyte culture from skin explants: cell expansion is linked to markers of activated progenitor cells". John Wiley & Sons A/S, *Experimental Dermatology*, 18, 720–726. 2009.
13. Instituto Nacional de Estadísticas, Geografía e Informática. Censo General de Población y vivienda, 2000 [CD Rom]. Aguascalientes, México, 2001.
14. Lamb, R., y Ambler, C. A. "Keratinocytes Propagated in Serum-Free, Feeder-Free Culture Conditions Fail to Form Stratified Epidermis in a Reconstituted Skin Model". 2013. *PLOS ONE* 8(1): e52494.
15. Lanza, R. P.; Langer, R.; y Vacanti, J. "Principles of Tissue Engineering". Academic Press. 2ª ed. 2000. pp: 3-15.
16. Noronha, S. M. R.; Noronha, S. A. A.; Klepp, G.; Ipolito, M. Z.; Ferreira, L. M.; y Gragnani, A. "Keratinocyte growth factor, interleukins (1 beta, 6, 8, 10, 12), and tumor necrosis factor alpha in culture medium of dermal fibroblast of burned patients". *Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 29 (supl. 1)*. 2014.
17. Orozco-Valerio, M. J.; Miranda-Altamirano, R. A.; Méndez Magaña, A. C.; y Celis, A. "Tendencia de mortalidad por quemaduras en México, 1979-2009". *Gaceta Médica de México*. 2012; 148:349-57.
18. Pollard, T. D.; Earnshaw, W. C., y Lippincot-Schwartz, J. "Cell Biology". International Edition. 2ª ed. Philadelphia, U. S. A. 2008. pp: 517, 519
19. Rasmussen, C.; Thomas-Virnig, C.; y Allen-Hoffmann, B. L. "Classical Human Epidermal Keratinocyte Cell Culture". *Epithelial Cell Culture Protocols*. 2ª ed. Springer Science+Business Media. 2012.
20. Rheinwald, J. G., y Green, H. "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells". *Cell*. 1975 Nov; 6(3):331-43.
21. Rolin, G., et al. "In vitro study of the impact of mechanical tension on the dermal fibroblast phenotype in the context of skin wound healing". *Journal of Biomechanics*. 2014.
22. Shevchenko, R. V.; James, S. L.; y James, S. E. "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction". *The Royal Society Interface*. 2010.

23. Sorrell, J. M., y Caplan, A. I. "Fibroblasts—A diverse population at the center of it all". *International Review of Cell and Molecular Biology*, 276, 161-214. 2009.
24. Tauzin, H.; Rolin, G.; Viennet, C.; Saas, P.; Humbert, P.; y Muret, P. "A skin substitute based on human amniotic membrane". Springer Science+Business Media Dordrecht. 2014.
25. Werner, S.; Krieg, T.; y Smola, H. "Keratinocyte-Fibroblast Interactions in Wound Healing". *Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 127. 2007.