



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

COMPARACIÓN DE DOS POBLACIONES DE
FIBROBLASTOS *IN VITRO* Y SOBRE UN ANDAMIO A
BASE DE AMNIOS HUMANO RADIOESTERILIZADO
MEDIANTE TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

OSWALDO GONZÁLEZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS:

BIÓL. ANA MARÍA BRENA MOLINA



2017



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.

1. Introducción	1
Dermis	2
Diferencias en la matriz extracelular	4
Proteínas de la Matriz Extracelular	6
El fibroblasto	6
El origen embrionario de los fibroblastos	8
Los miofibroblastos	10
Los miofibroblastos en la cicatrización de heridas	13
Origen de los miofibroblastos en la herida	17
Regulación de miofibroblastos por fuerzas mecánicas	18
La ingeniería de tejidos y el desarrollo de sustitutos de piel.	19
Sustitutos de piel	19
Membrana amniótica humana (HAM)	22
Amnios Humano Radioesterilizado (AHR)	23
2. Antecedentes	24
3. Planteamiento del problema	27
4. Hipótesis	27
5. Objetivo general	28
6. Objetivos particulares	28
7. Material Y Método	29
Transporte de la muestra	30
Preparación del tejido	

	31
Separación de las capas de la piel	32
Procesamiento de la capa dérmica	33
Obtención de fibroblastos humanos	34
Conteo celular	35
Cultivo celular In vitro	36
Subcultivos	37
Cultivo celular sobre un AHR	37
Viabilidad celular In vitro y sobre un AHR	38
Inmunofenotipo celular	39
Proliferación celular	40
Análisis de imagen	43
8. Resultados	44
I. Aislamiento y expansión de fibroblastos humanos de biopsias de piel de prepucio y abdomen	44
II. Cultivo de fibroblastos humanos de prepucio y abdomen sobre AHR para la generación de constructos	46
III. Análisis del inmunofenotipo de los constructos generados.	49
9. Discusión	57
10. Conclusiones	62
11. Referencias	63

Resumen

Los fibroblastos son el tipo de células mesenquimales más importantes en el tejido conectivo que depositan la colágena y las fibras elásticas de la matriz extracelular. Los fibroblastos dérmicos representan una población heterogénea de células definida en función de su ubicación dentro de la dermis y son los responsables de la remodelación del tejido después de una lesión al establecer una red de colágena que formara la cicatriz. El objetivo de este trabajo es la generación de un constructo con fibroblastos humanos aislados de biopsias de piel en condiciones *in vitro*. Para determinar el inmunofenotipo celular de los constructos se seleccionaron tres anticuerpos monoclonales. Los fibroblastos de abdomen y prepucio sobre el AHR son 70% y 67% positivas a Anti-Fibroblast Surface Protein Antibody respectivamente. Para Anti-Alpha Smooth Muscle Actin Antibody tenemos un 30% de células positivas (miofibroblastos) a este marcador en el constructo hecho con fibroblastos de abdomen, en comparación al 33% presente en el constructo constituido por fibroblastos de prepucio. La proliferación en los constructos se evaluó, específicamente en las células positivas a **α -sma**. Los porcentajes de miofibroblastos que se encontraban en proliferación fueron de 35% en el constructo de Fb.Ab. frente al 31% para el constructo de Fb.Pr. Estos resultados sugieren que el AHR reduce la presencia de miofibroblastos al ofrecer una lamina basal a la cual se adhieren las células, favorece la proliferación de los fibroblastos y su topología favorece la migración celular. Por lo que dos poblaciones son aptas para el desarrollo del constructo heterólogo de AHR+fibroblastos.

1. INTRODUCCIÓN

La piel, es el órgano más grande del cuerpo se describe típicamente en el contexto de tres capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis. **La epidermis**, es la región más externa de la piel que proporciona una barrera, con función inmunológica y fotoprotectora. Es una capa celular altamente organizada y estratificada que es capaz de autorrenovarse por un proceso continuo de proliferación y diferenciación, referido como queratinización.¹ **La dermis**, la capa intermedia, comprende tejido conectivo que proporciona integridad mecánica a la piel. Está compuesta principalmente de moléculas de la matriz extracelular (**ECM por sus siglas en inglés**) y contiene apéndices de la piel y los receptores para estímulos sensoriales. **La hipodermis** consiste predominantemente en un depósito subcutáneo de grasa que proporciona un aislamiento contra la pérdida de calor, pero también contiene las raíces foliculares del pelo. Además, la hipodermis es también una fuente de células troncales mesenquimales (Figura 1).²

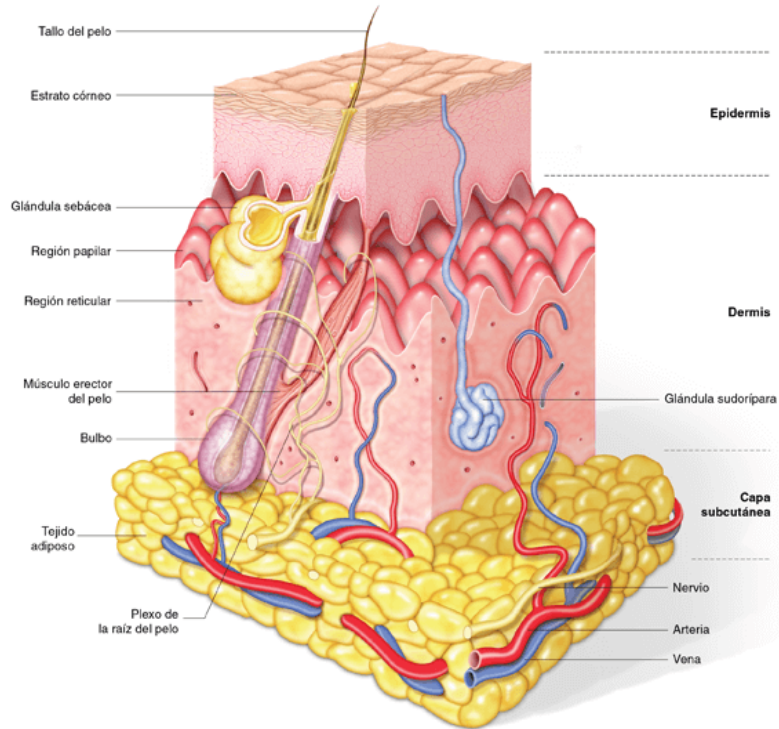


Figura 1. Estructura anatómica de la piel. Se observan las tres capas principales de la piel: la epidermis, la dermis y la hipodermis y los anexos cutáneos. [3]

La función más importante y bien reconocida de la piel es su papel como una barrera de permeabilidad, impidiendo la entrada de patógenos y partículas, la pérdida de agua del cuerpo por evaporación; Otra función importante es la regulación de la temperatura. Y también posee receptores del dolor, del tacto, además de otros receptores mecánicos. ²

Dermis

Contiene pocas células y predominantemente comprende matriz extracelular fibrosa, que proporciona estabilidad mecánica a la piel. Además, contiene terminaciones nerviosas, redes vasculares y células dérmicas. Está altamente innervada y vascularizada. Entre sus funciones por su composición de colágena tipo I y III es responsable de la resistencia mecánica de la piel.

Las fibras de elastina proporcionan elasticidad a la piel, la dermis ejerce control sobre la temperatura, la entrega de nutrientes, y el equilibrio de líquidos mediante el control del flujo sanguíneo.²

Las dos principales capas de la dermis son:

- **La dermis papilar (superior):** se compone de haces de fibras de colágena y fibras elásticas de oxitalán, celularmente se observa una mayor actividad en el estrato papilar en comparación al estrato reticular. Los capilares más importantes se extienden desde el plexo subpapilar y entre las papilas (proyectadas desde la dermis a la epidermis). El diámetro de las fibrillas de colágena en una dermis normal madura oscilan desde $53 \pm 3,0$ nm en este estrato.⁴ Por lo general, la parte superficial de la dermis papilar se organiza en estructuras en forma de cresta, las papilas dérmicas, que contienen componentes microvasculares y neurales que sostienen la epidermis.⁵ Las papilas dérmicas amplían en gran medida el área superficial para las interacciones epitelio-mesénquima y la entrega de moléculas solubles a la epidermis.
- **La dermis reticular (inferior):** Esta es la parte más gruesa y profunda responsable de la durabilidad y anclaje de los apéndices de la piel. La dermis reticular se caracteriza por haces entrelazados de fibrillas de colágena de gran diámetro. El diámetro de estas fibrillas en una dermis normal madura oscilan entre $82 \pm 4,9$ nm (Figura 2).⁴

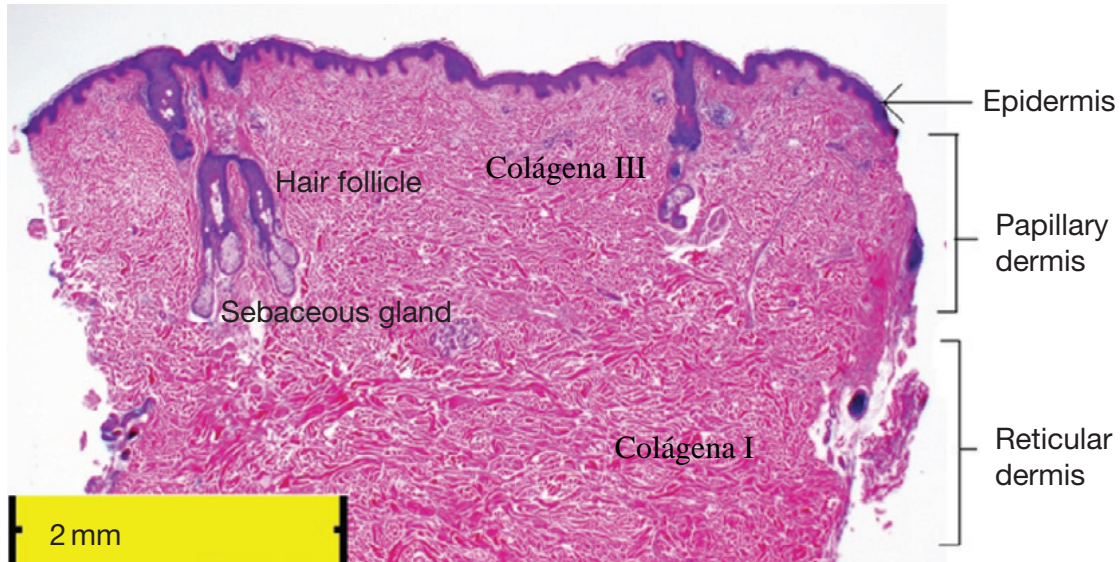


Figura 2. Estructura de la dermis. Tinción tricrómica de Masson de la dermis humana normal. Se observa la estructura fina de las fibras de colágeno en la dermis papilar a diferencia de la estructura gruesa de las fibrillas de colágeno en la dermis reticular. [2]

Un plexo vascular superficial (*rete subpapillare*), demarca el límite inferior de la dermis papilar. La capa reticular de la dermis se extiende desde este plexo a un plexo profundo vascular (*rete cutaneum*), que sirve como el límite entre la dermis y la hipodermis (figura 3).⁶

Diferencias en la matriz extracelular

La dermis papilar y la dermis reticular difieren tanto en la composición como en la organización de sus respectivas matrices extracelulares. La dermis papilar se caracteriza por haces de fibras de colágeno delgadas, mal organizadas, que consisten principalmente en colágeno de tipo I y III, que contrastan con los fibrados gruesos y bien organizados de la dermis reticular (hecha de fibras gruesas de colágeno tipo I principalmente y elastina dispuestas paralelamente a la superficie de la piel).⁵

Los haces de fibras de colágena en la dermis papilar contienen más colágena tipo III que los de la dermis reticular.⁷ Otras moléculas de la matriz también se distribuyen diferencialmente entre la dermis papilar y reticular (Tabla 1).

Componente de matriz	Dermis papilar	Dermis reticular	Folículo piloso
Colágenas I y III	Alta tasa de tipo I a III	Baja tasa de III a I	Presente
Colágena IV	Presente en membrana basal	Ausente	Presente en papilas dérmicas
Colágena VI	Presente en unión dermo-epidérmica (DEJ)	Débilmente presente	Presente en vainas dérmicas
Colágena XII	Presente	Bajo a ausente	Alta expresión alrededor de la vaina folicular
Colágena XIV	Bajo a ausente	Presente	Baja expresión
Colágena XVI	Presente en la región DEJ	Ausente	Desconocido
Tenascina-C	Presente en la región DEJ	Ausente	Presente en vainas y papilas dérmicas
Tenascina-X	Débil en la región DEJ	Presente	No asociada
Versicano	Difuso en la región DEJ, presente en las fibrillas de la matriz	Presente en asociación con fibras elásticas	Presente en papilas dérmicas
Decorina	Presente	Presente	Desconocido

Tabla 1. Distribución de moléculas seleccionadas de matriz extracelular en compartimentos dérmicos. [6]

Proteínas de la Matriz Extracelular

La especie de glucosaminoglicanos (**GAG's**) presentes determina la estabilidad de la matriz y la relativa facilidad de movimiento de las células. Desde la etapa fetal y a través de la maduración, la dermis se compone cada vez más de GAG's sulfatados, lo que lleva a una mayor estabilidad. Los fibroblastos dérmicos secretan una gran cantidad de proteoglicanos y glicoproteínas en el espacio extracelular, en concreto, sulfatos de condroitina / sulfato de dermatan (biglicano, decorina y versicano), proteoglicanos de sulfato de heparán / heparán (sindecano y perlecano), y proteoglicanos condroitina-6 sulfato. Entre las moléculas producidas por los fibroblastos encontramos la colágena tipo I, proteínas matriz (fibronectina y tenascina entre otras), ácido hialurónico (HA), citocinas y factores de crecimiento.³

EL FIBROBLASTO

Los fibroblastos son células de origen mesenquimal y son el mayor componente celular presente en la dermis. Convencionalmente los fibroblastos se definen por su morfología fusiforme (huso), su crecimiento adhesivo en plásticos de cultivo de tejidos, la expresión de marcadores mesenquimales que incluyen vimentina y colágena I, y la falta de expresión de marcadores relacionados con otros linajes celulares específicos.⁸

Los fibroblastos dérmicos son un componente esencial de la piel, no sólo producen y organizan la matriz extracelular de la dermis, ellos también llevan a cabo interacciones dinámicas y recíprocas entre sí y con otros tipos celulares residentes: células epiteliales, células endoteliales, células neurales, células inflamatorias, adipocitos y células troncales mesenquimales, a través de comunicaciones celulares directas, interacciones célula-matriz y la secreción de factores solubles (factores de

crecimiento y citocinas) que juegan un papel crucial en la regulación de la fisiología de la piel.⁶

Los fibroblastos dérmicos representan una población heterogénea de células definida en función de su ubicación dentro de la dermis. Dos subpoblaciones de fibroblastos residen en capas dérmicas distintas: los papilares y reticulares.⁵ Un tercer grupo está asociado a los folículos pilosos, estos se encuentran en la región de la papila dérmica del folículo y a lo largo de su eje (Figura 3).⁹

Aunque tradicionalmente se consideraban una población estática de células que mantenían a la piel a través de la secreción y degradación de ECM, ahora se sabe que los fibroblastos juegan un papel importante en casi todos los procesos cutáneos a lo largo de la vida. En el embrión, los fibroblastos dirigen la morfogénesis de la piel, mientras que en el organismo maduro contribuyen a la homeostasis de la piel. Su participación en diversas condiciones fisiopatológicas, como la curación de heridas, la fibrosis, el envejecimiento, la psoriasis y el cáncer de piel, está empezando a ser comprendida.⁸

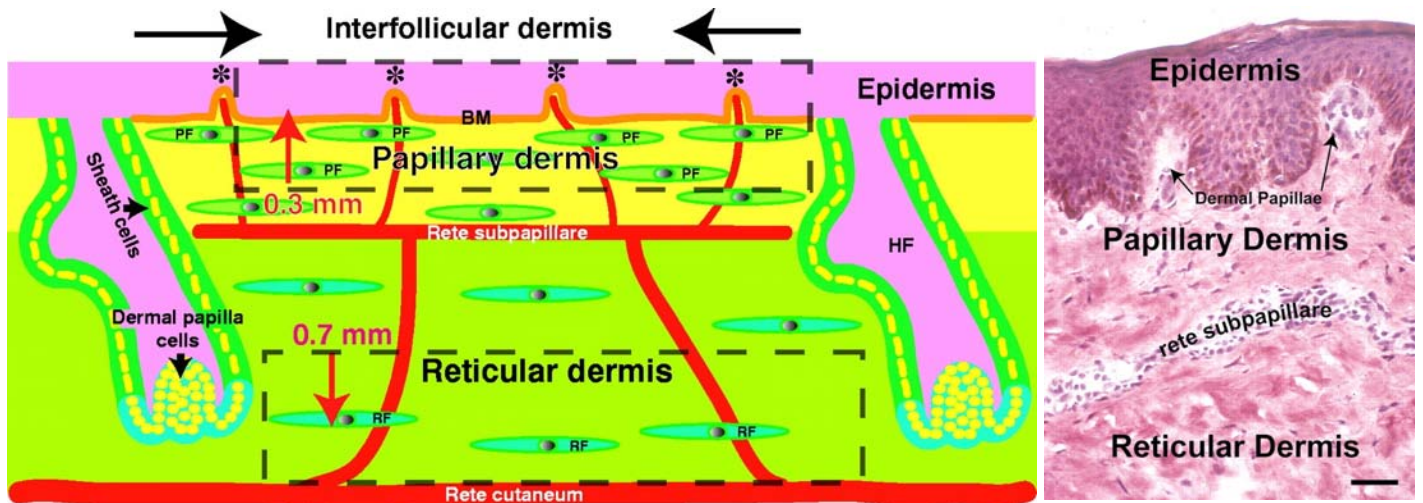


Figura 3. La piel humana adulta es un órgano estratificado que consiste en una epidermis que está unida a una dermis por una elaborada estructura de tejido conectivo, la membrana basal (BM). La superficie basal de la epidermis está indentada por componentes cutáneos y vasculares llamados papilas dérmicas (*). La dermis se divide en dos capas funcionales, la dermis papilar y la dermis reticular. Estas dos capas están separadas por un plexo vascular, el rete subpapillare. Este plexo es alimentado por otro plexo vascular, el rete cutaneum, localizado en la base de la dermis reticular. [Modificada de 6]

El origen embrionario de los fibroblastos

Los fibroblastos tienen múltiples orígenes embrionarios (Figura 4). Una característica que contribuye a su diversidad. Gran parte de la información sobre el origen de la dermis deriva de estudios embriológicos experimentales de embriones aviares y murinos que dejan dudas en cuanto a su relevancia para el desarrollo humano.

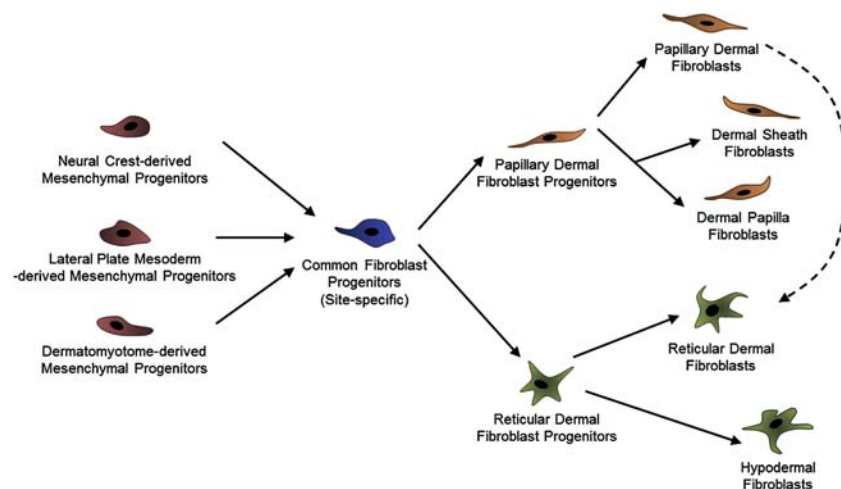


Figura 4. Múltiple origen embrionario de los fibroblastos. [8]

Los progenitores de los fibroblastos surgen de diferentes orígenes de desarrollo como la cresta neural, el mesodermo de la placa lateral y el dermato-miotomo dependiendo del sitio de la piel. Estos progenitores de fibroblastos sitio-específicos experimentan un compromiso de linaje con progenitores de fibroblastos dérmicos papilares y fibroblastos dérmicos reticulares que se diferencian adicionalmente para dar lugar a diferentes poblaciones de fibroblastos dentro de la piel.⁸

Los fibroblastos dérmicos en la región dorsal surgen del desarrollo del dermato-miotomo.^{10,11,12} Este tejido embrionario da lugar a la dermis, la hipodermis y la musculatura subyacente. La somatopleura proporciona células que migran y se diferencian en la dermis ventral. Por el contrario, los fibroblastos del cuero cabelludo y de la piel facial proceden de la cresta neural, al igual que otros tejidos mesenquimatosos de esta región, como el cartílago y el hueso.^{13,14,15}

Junto con el origen embrionario de las poblaciones de fibroblastos en desarrollo, su organización espacial dentro del embrión impulsa la formación de patrones y, en última instancia, da lugar a la formación de tejidos y sistemas de órganos.⁸ Estos patrones espaciales e información de posición subyace en la especialización celular y por lo tanto debe mantenerse a lo largo de la vida del ser vivo a medida que los tejidos experimentan renovación, reparación y regeneración. Los fibroblastos, al tener un origen variado presentan escasez de marcadores específicos para sus subpoblaciones.¹⁶ La [Figura 5](#) resume algunos de los marcadores moleculares que se usan para identificar fibroblastos y poblaciones relacionadas con fibroblastos.

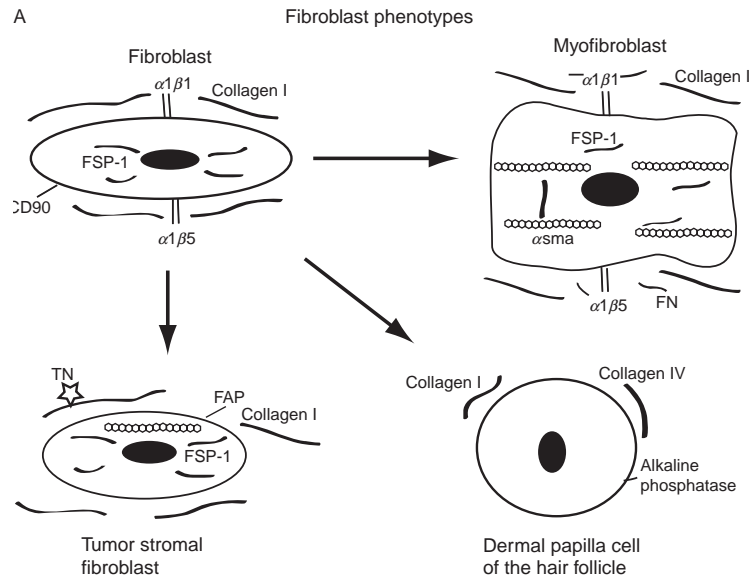


FIGURA 5. Diversidad de los fenotipos en fibroblastos. Se muestran ejemplos de moléculas celulares y ECM que caracterizan a estas células: integrina $\alpha1\beta1$ (se une a la colágena I), integrina $\alpha1\beta5$ (se une a fibronectina), FN (fibronectina), TN (tenascina), FSP-1 (proteína específica de fibroblastos-1), α -SMA (α -actina de músculo liso), FAP (proteína activadora de fibroblastos), CD90 (THY-1/CD90), fosfatasa alcalina (no específica), colágena I y colágena IV. [16]

LOS MIOFIBROBLASTOS

Los miofibroblastos se describieron por primera vez en la cicatrización de las heridas cutáneas, donde se planteó la hipótesis de que eran responsables del fenómeno de la contracción de la herida.¹⁷ Desde entonces, se han descrito células morfológicamente similares a miofibroblastos en muchos tejidos, predominantemente en estados patológicos donde su presencia sostenida es generalmente un marcador de fibrosis y cicatrización.¹⁸

Los primeros estudios identificaron a los miofibroblastos sobre la base de su morfología ultraestructural, con haces de microfilamentos prominentes en su citoplasma que los distinguen de fibroblastos de tejido quiescentes "normales".

Los miofibroblastos también poseen uniones de fibronexus (contactos membranales focales vía integrinas con conformación de un complejo de microfilamentos transmembranales), entre las células y la ECM circundante por lo que de alguna manera parecen compartir algunas de las características morfológicas de las células del músculo liso (**SMC**).¹⁹

Se han descrito muchos tejidos y patologías en las que se han identificado miofibroblastos, incluyendo cicatrices hipertróficas y queloides en la piel, hígado fibrótico como se observa en cirrosis hepática y otras patologías hepáticas, fibrosis renal y fibrosis pulmonar idiopática.²⁰

El papel de los miofibroblastos en la conducción de enfermedades fibróticas y el reciente hallazgo de que los miofibroblastos asociados al cáncer probablemente influyen en el crecimiento tumoral y se correlacionan con un mal pronóstico clínico, por lo que ha aumentado el interés por conocer su origen celular, su regulación y su papel en la reparación y la enfermedad.²¹

Actualmente se sabe que los miofibroblastos pasan por una etapa precursora de expresión de grandes fibras de estrés que no se ven en los fibroblastos quiescentes, haces prominentes de microfilamentos que permiten cierta contracción, pretensando y remodelando la ECM circundante.²²

Más tarde, los miofibroblastos completamente diferenciados expresan la proteína citoesquelética específica de células del músculo liso, α -Actina de músculo liso (**α -sma**), Que ahora se utiliza a menudo para definir el fenotipo de los miofibroblastos.²³ (Tabla 2).

Característica	Fibroblastos	Miofibroblastos
Forma	Fusiforme	Estrellada
Diámetro	Menores a $\sim 26\mu\text{M}$	Mayores a $\sim 38\mu\text{M}$
Proteínas del citoesqueleto	Vimentina Actinas F, α y β	α -Actina de músculo liso Desmina
Fibronexus	Ausente	Presente
Fibras de estrés	Ausentes	Presentes
Contractibilidad	Muy baja	Alta
Síntesis de matriz extracelular	Baja	Muy alta
Proliferación	Normal	Muy baja
Mitocondrias	Pocas	Muchas
Uniones intercelulares	Ausentes	Adherentes y Gap

Tabla 2. Diferencias principales entre fibroblastos y miofibroblastos. [24]

Estudios *in vitro* han demostrado que los fibroblastos normales pueden inducirse a adquirir el fenotipo de miofibroblastos exponiendo estas células a la forma fetal de fibronectina, que es altamente expresada en los sitios de la herida y al factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$).²⁵

La otra característica definitoria de los miofibroblastos es que no expresan el repertorio completo de marcadores de SMC, tales como la cadena pesada de miosina de músculo liso, n-caldesmona y la smootelina.^{26,27,28} Permitiendo que los miofibroblastos se distinguan de las SMC.

Por último, los miofibroblastos muestran uniones fibronexus con otras células y complejos de unión especializados con la ECM; Estas grandes adherencias focales maduras les permiten hacer adherencias fuertes, contraer y remodelar la ECM, y proporcionar un medio de transducción de fuerza mecánica en el tejido.^{29,30}

Los miofibroblastos en la cicatrización de heridas

Inmediatamente después de la herida, el proceso de cicatrización comienza, dando lugar a la restauración (parcial) del tejido lesionado. La cicatrización de la herida procede en tres fases dinámicas interrelacionadas que temporalmente se superponen. Estas fases se definen como la fase inflamatoria, la fase proliferativa (el desarrollo del tejido de granulación) y la fase de regeneración, incluyendo la maduración, la formación de cicatrices y la reepitelización (Figura 6).³¹

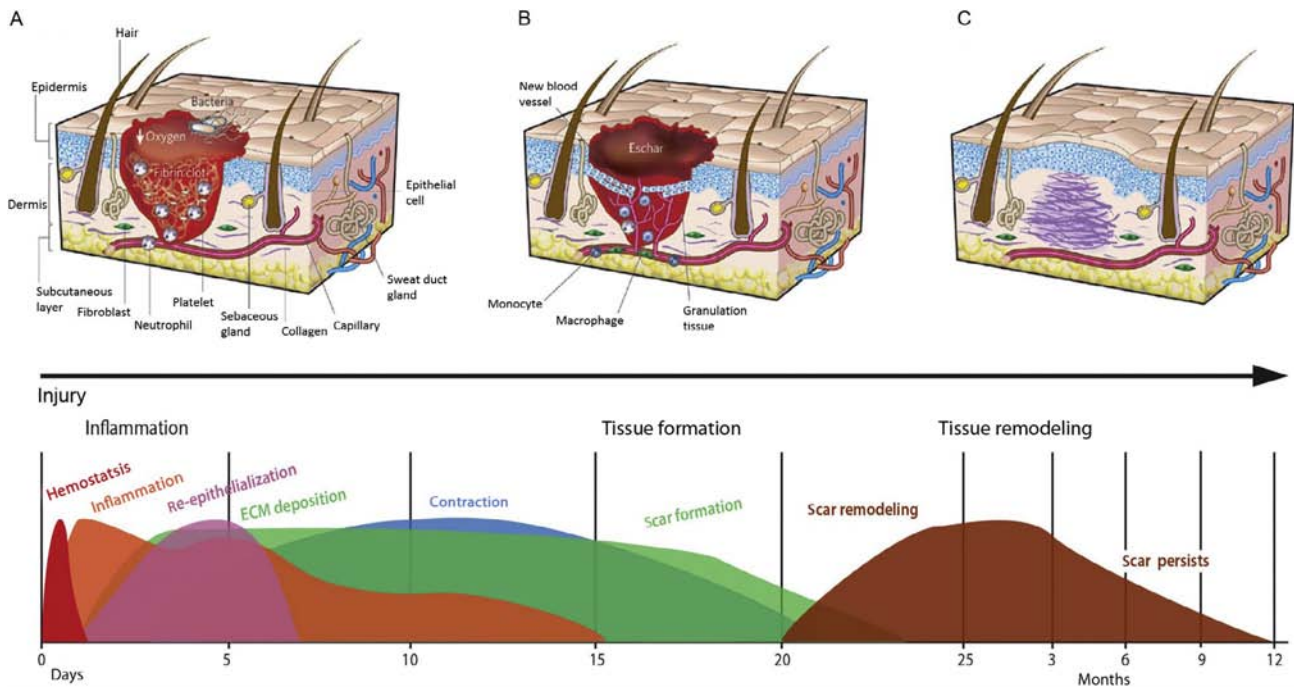


Figura 6. Fases de la cicatrización de heridas. (A) Hemostasia e inflamación, 0-48 h después de la lesión. Inmediatamente después de la herida durante la inflamación, se forma un coágulo de fibrina que contiene plaquetas degranuladas, células inflamatorias y muchos factores de crecimiento. (B) Reepitelización, 2-6 días después de la lesión, y nueva formación de tejido, 2-21 días después de la lesión. Los nuevos vasos sanguíneos se infiltran en el tejido de granulación fibroso del sitio de la herida. (C) Remodelación del tejido, hasta 1 año. Una región de colágena desorganizada, en su mayoría colágena I, es establecida por fibroblastos. Esta red densa de colágena formará la cicatriz. [32]

La fase inflamatoria comienza con el daño de los capilares, provocando la formación de un coágulo de sangre que consiste de fibrina y fibronectina. Esta matriz provisional colma la lesión y permite que una variedad de células migren hacia la lesión. Las plaquetas presentes en el coágulo liberan múltiples citocinas (**TGF- β** y **PDGF**), que participan en el reclutamiento de células inflamatorias, neutrófilos y macrófagos, pero también promueven el reclutamiento de fibroblastos y células endoteliales. La segunda etapa de cicatrización de heridas es la fase proliferativa, se caracteriza por angiogénesis, depósito de colágena, formación de tejido de granulación, epitelización y contracción de la herida.

La angiogénesis es crítica para el proceso de cicatrización, permite a los nuevos capilares suministrar nutrientes a la herida y contribuye a la proliferación de fibroblastos. Inicialmente la herida es hipóxica debido a la pérdida de perfusión vascular, pero con el desarrollo de una nueva red capilar, se restablece la perfusión vascular. La regulación de la angiogénesis en la herida representa un medio para mejorar la cicatrización en algunos casos, particularmente cuando la angiogénesis retardada o defectuosa está implicada en el deterioro de la cicatrización.³³

En el tejido de granulación, los fibroblastos son activados y adquieren la expresión de **α -sma** y se convierten en miofibroblastos. Estas células miofibroblásticas sintetizan y depositan los componentes ECM que eventualmente sustituyen a la matriz provisional. Estas células exhiben propiedades contráctiles, debido a la expresión de **α -sma** en haces de microfilamentos o fibras de estrés, desempeñando un papel importante en la contracción y maduración del tejido de granulación (Figura 7).³⁴

Actualmente, se acepta que la modulación miofibroblástica de las células fibroblásticas comienza con la aparición del protomiofibroblasto, cuyas fibras de estrés sólo contienen actinas citoplasmáticas de tipo γ y β . Los protomiofibroblastos generalmente evolucionan en miofibroblastos diferenciados, con fibras de estrés que contienen **α -sma**. La presencia de α -sma representa el marcador más fiable del fenotipo miofibroblástico.³⁵

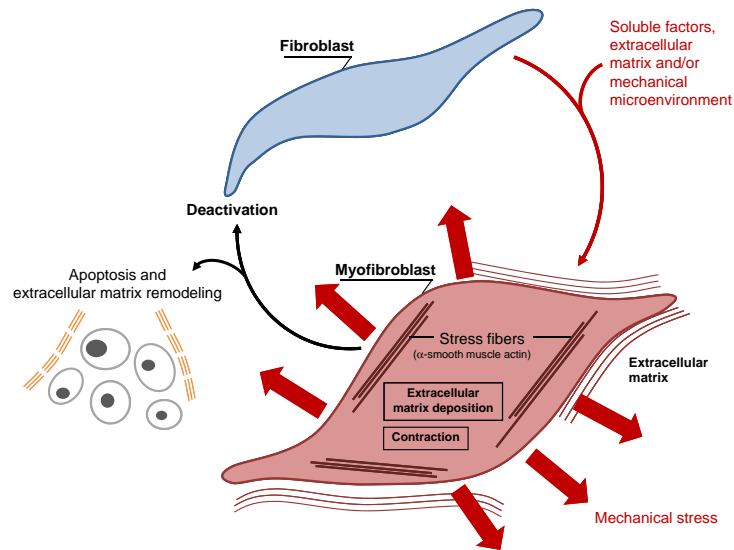


Figura 7. Evolución del fenotipo de los miofibroblastos. [36]

La tercera fase de cicatrización, la formación de cicatrices, implica una remodelación progresiva del tejido de granulación. Las enzimas proteolíticas, esencialmente las metaloproteinasas de la matriz (**MMP's**) y sus inhibidores (inhibidores tisulares de metaloproteinasas [**TIMPs**]) juegan un papel importante.³⁷

La síntesis de ECM no se detiene totalmente, solo se reduce considerablemente, y los componentes sintetizados se modifican a medida que se remodela la matriz. Progresivamente, la colágena tipo III, el principal componente del tejido de granulación, es reemplazado por la colágena tipo I, que es el principal componente estructural de la dermis. Por último, la elastina, que contribuye a la elasticidad de la piel y está ausente en el tejido de granulación, también reaparece.

En la fase de resolución de la cicatrización, el número de células se reduce drásticamente por la apoptosis tanto de las células vasculares como de los miofibroblastos.³⁸

Origen de los miofibroblastos en la herida

La principal fuente de miofibroblastos son fibroblastos de tejido conectivo local que son reclutados en la herida.³⁹ Los fibroblastos dérmicos localizados en los bordes de la herida pueden adquirir un fenotipo miofibroblástico y participar en la reparación tisular.⁴⁰ Sin embargo, también se ha tomado en cuenta la importancia de la heterogeneidad de las subpoblaciones de células fibroblásticas. Estas subpoblaciones residen en diferentes localizaciones dentro de la piel y tienen propiedades específicas de activación y desactivación. Estas subpoblaciones celulares pueden ser aisladas y exhibir, dependiendo de la naturaleza y edad de la piel original, diferencias fenotípicas distintas cuando se cultivan por separado.³⁶

En general, las células troncales mesenquimales (localizadas en la envoltura dérmica que rodea el exterior del folículo piloso frente a las células troncales epiteliales), los fibrocitos (células circulantes, entran en la piel lesionada junto con las células inflamatorias y pueden adquirir un fenotipo miofibroblástico), las células derivadas de la médula ósea (otro tipo de célula circulante) y las células derivadas de los procesos de transición epitelio y endotelio-mesenquima (este mecanismo se reconoce cada vez más como parte integral de la fibrogénesis tisular después de la lesión, pero parece desempeñar un papel limitado durante la reparación tisular normal), pueden representar fuentes alternativas de miofibroblastos cuando los fibroblastos locales no son suficientes para realizar la reparación y remodelación de los tejidos.³⁶

Regulación de miofibroblastos por fuerzas mecánicas

Se ha demostrado que las señales mecánicas desempeñan un papel en la diferenciación de miofibroblastos ya que la ECM que rodea a los fibroblastos en los tejidos dañados cambia su composición y su rigidez a medida que avanza la reparación tisular.⁴¹

La naturaleza contráctil de los miofibroblastos por sí misma conduce a un aumento de la rigidez y el estrés mecánico de la ECM a medida que progresa la cicatrización, dando lugar a un bucle de retroalimentación positiva donde el estrés aumentado señala la diferenciación de miofibroblastos y también aumenta la supervivencia de miofibroblastos. Por esta razón, la retroalimentación mecánica se considera importante en la conducción de condiciones patológicas tales como contracturas postlesión.⁴²

La señalización mecánica y el estrés modulan la diferenciación de miofibroblastos a través de una serie de vías y mecanismos. El estrés puede activar directamente la transcripción del gen de α -sma, puesto que se ha demostrado que la aplicación de la fuerza a través de los sitios de unión a integrina aumenta la actividad del promotor de α -sma.⁴³

La fuerza mecánica por sí sola no es generalmente suficiente para inducir la diferenciación de miofibroblastos, otros factores son necesarios para actuar en conjunto, específicamente **TGF- β 1**.

La señalización mecánica y la estimulación del **TGF- β 1** también aumentan la expresión génica de la colágena en los fibroblastos, haciendo hincapié en el papel que juegan estos factores en la estimulación de un fenotipo profibrótico, como se observa en los miofibroblastos activados.⁴⁰

El **TGF- β 1** también favorece la deposición de proteínas ECM sobre la degradación por la regulación positiva de TIMPs mientras que disminuye la expresión de las mismas MMPs.⁴⁴

LA INGENIERÍA DE TEJIDOS Y EL DESARROLLO DE SUSTITUTOS DE PIEL.

Millones de personas sufren de enfermedades y daños en la piel cada año, las heridas agudas y crónicas son los principales retos para la ingeniería de tejidos de piel. El factor clave en la reparación de los defectos cutáneos es promover el cierre de la herida para reducir las complicaciones causadas por trastornos del medio interno o la invasión de microorganismos. Sin trasplante oportuno, los pacientes pueden sufrir fácilmente la pérdida de fluidos, infecciones agudas e incluso sepsis que pueden amenazar sus vidas. Aunque la toma de autoinjertos es un tratamiento ampliamente utilizado en clínica, esta sujeto a disponibilidad. Una de las desventajas de tomar autoinjertos desde áreas donadoras, es que se generan lesiones cutáneas que generalmente son de espesor parcial que pueden retrasar el proceso de reepitelización. Por lo que se han propuesto alternativas como los sustitutos de piel.

Sustitutos de piel

Basada en los principios de la ingeniería de tejidos, la bioingeniería de constructos de piel consiste en células, factores bioactivos y biomateriales desarrollados en décadas pasadas que proporcionan un nuevo enfoque para la reparación de los defectos de piel de espesor total. En general, la ingeniería tejidos de piel debe cumplir con tres requisitos principales, es decir, la seguridad para los pacientes, la eficacia clínica y la conveniencia de la manipulación.⁴⁵

A diferencia de los autoinjertos que dependen de la disponibilidad de tejido sano en el paciente, los sustitutos de piel pueden adquirirse de otros humanos (alogénicos), animales (xenogénicos) o producirse enteramente en el laboratorio.

Entre los sustitutos de piel que existen se encuentran los biológicos (grupo heterogéneo de biomateriales que en combinación con células heterólogas y/o autólogas cubren y promueven la reepitelización de heridas cutáneas) y los sintéticos. Los primeros son más baratos y abundantes, además poseen una matriz extracelular natural. En cambio los sintéticos están formados por moléculas no biológicas o polímeros no presentes en la piel normal y que a pesar de carecer de una membrana basal, han demostrado tener cualidades específicas en el tratamiento de los pacientes. Sin embargo, al día de hoy no existe ningún sustituto de piel que pueda reemplazar todas las funciones de la piel humana, debido a que algunos están desprovistos de células y solo proveen el microambiente para que las propias células del paciente proliferen ([Tabla 3](#)).

Nombre comercial	fabricante	Composición	Aplicación
Integra®	Integra Life Science	Soporte de colágeno I y condritin sulfato, cubierta con una capa de silicona.	Quemaduras y remodelación de heridas de quemaduras, (Semipermanente).
Dermagraft®	Advanced Biohealing Inc.	Cultivo alogénico de fibroblastos de prepucio de neonatos criopreservados en una matriz (3D) de silicon/nylon, GAG's y colágena dermal porcina.	Indicado en el tratamiento de úlceras por pie diabético, (permanente).
Transcyte®	Advanced Biohealing Inc.	Cultivo alogénico de fibroblastos criopreservados de prepucio de neonatos en una malla de nylon, cubierta por colágeno porcino unida a una membrana de silicon.	Cobertura temporal de heridas de espesor total y parcial de pacientes quemados para antes del autoinjerto.
Hyalograft 3D®	Fidia Advanced Biopolymers	Cultivo autólogo de fibroblastos sobre ácido hialurónico	Segura, ayuda a una rápida formación de la membrana basal, específico para lesiones térmicas profundas, usado exitosamente en úlceras cutáneas por esclerodermia, (permanente).
Apligraf®	Organogenesis	Soporte de colágeno I bovino, sembrado con fibroblastos y queratinocitos neonatales, crecen en monocapa y posteriormente los queratinocitos estratifican.	Tratamiento de úlceras venosas y úlceras neuropáticas de espesor total.

Tabla 3. Algunos sustitutos de piel empleados en el tratamiento de heridas agudas y crónicas.

MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA (HAM)

Entre los sustitutos biológicos encontramos al amnios que es una membrana fetal delgada que tiene un espesor entre 0.02mm y 0.05mm, elástica, translúcida y semipermeable unida a la membrana coriónica. La capa externa, el corión, se compone de tejido coriónico trofoblástico y mesénquima. La capa interna, el amnios, consta de una sola capa de epitelio derivado ectodérmicamente y dispuesto uniformemente sobre la membrana basal, que es una de las membranas más gruesas que se encuentran en cualquier tejido humano, y una capa mesenquimal rica en colágeno.⁴⁶ (Figura 9)

La ECM del amnios tiene varios componentes como elástina, laminina, diferentes tipos de colágeno (I, III, IV, V, VI y VII), nidógeno, fibronectina, vitronectina, factores de crecimiento, hialuronano y proteoglicanos.^{47,48,49} Estos en la piel son abundantes además de ser responsables de la regulación y el mantenimiento del metabolismo normal de los fibroblastos, por lo que se sugiere su uso como andamio biológico para la ingeniería de tejidos de piel en comparación con otros productos biocompatibles.

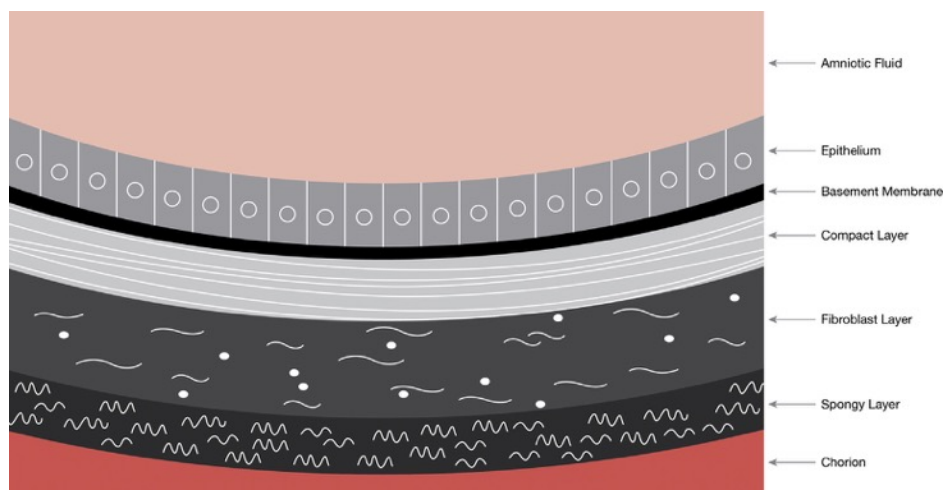


Figura 9. Estructura de la membrana amniótica humana. [47]

El amnios en su aplicación clínica se emplea: fresco, liofilizado, congelado y radioesterilizado. Se ha descrito que la membrana fresca preservada a 4-8 °C es mejor que la membrana congelada a -70°C. Sin embargo el uso del amnios humano radioesterilizado ofrece una mayor seguridad biológica a los pacientes, al encontrarse libre de bacterias, organismos fúngicos. Además del monitoreo mediante pruebas serológicas en el momento del parto y 6 meses después de éste antes de ser liberado para su aplicación en la clínica.

Amnios Humano Radioesterilizado (AHR)

El Banco de Tejidos Radioesterilizados del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (**BTR - ININ**) junto con el Sistema Mexicano de Salud, se han dado a la tarea de reducir la cantidad de tejidos importados. Esto se ha hecho mediante el procesamiento de tejidos esterilizados con radiación ionizante.

El banco es el resultado del fuerte apoyo que el país recibió del Organismo Internacional de Energía Atómica (**AIEA**), de 1997 a 2004. El 7 de julio de 1999 la secretaria de Salud emitió la licencia sanitaria al BTR-ININ. El ININ firmó posteriormente un convenio con el Hospital Materno Infantil-ISSEMYM (HMI) en la ciudad de Toluca, para la procuración, procesamiento, esterilización y uso de los tejidos.⁵⁰

El hospital que suministra el amnios (HMI), es responsable de la selección de donantes, pruebas serológicas (VIH 1 y 2, hepatitis B y C y Sífilis), procuración de amnios, limpieza preliminar y almacenamiento temporal. El BTR-ININ es responsable de: recepción, lavado, secado, corte, envasado y etiquetado, control microbiológico, esterilización con radiación gamma (γ) de Cobalto-60 a 25 kGy (la dosis determinada durante el control microbiológico), pruebas de esterilidad,

almacenamiento a temperatura ambiente y la distribución de tejidos de alta calidad para la aplicación clínica. Todas las actividades se realizan bajo riguroso control de calidad para cumplir con los requisitos del Sistema de Gestión de la Calidad (**SGC**) BTR-ININ, que fue certificado bajo ISO 9001: 2000 el 1 de agosto de 2003.⁵¹

2. ANTECEDENTES

Actualmente existen un sin número de trabajos que exploran las características del amnios como andamio biológico para su potencial uso en ingeniería de tejidos en el desarrollo de sustitutos de piel:

En el 2015 **Moreira-Rocha, S. C. y Maia-Baptista, C. J.**, basados en la morfología y propiedades bioquímicas, encuentran que el amnios humano tiene un número de características que lo hacen único para su aplicación en ingeniería de tejidos. Algunas de estas son: 1) efecto antiinflamatorio; 2) propiedades anti-bacterianas; 3) no inmunogénico y baja antigenicidad; 4) proporciona una ECM para la migración celular y la proliferación; 5) Promueve una mayor curación y mejora del proceso de cicatrización de heridas y por último 6) actividad anticicatrizante y antiadhesiva al reducir la actividad de las proteasas a través de la secreción de TIMP's y regulación negativa de TGF- β responsable de la activación de los fibroblastos previniendo así el riesgo de fibrosis. Además de las propiedades especiales, la disponibilidad, el bajo costo y su recuperación no invasiva lo convierten en un candidato ideal para su aplicación en este trabajo.⁵²

Por otro lado **Guo, Q. y su grupo** en 2012 muestran que las matrices naturales tridimensionales (3D) comerciales, presentan limitaciones en términos de sus propiedades biomecánicas y por consiguiente son incapaces de imitar las condiciones para que las células se adhieran como sucede en condiciones *in vivo* entre las células y la ECM que desempeña un papel crucial en la diferenciación, proliferación y migración celular, así como en la remodelación tisular. Por lo que proponen un método simple para producir una matriz amniótica humana acelular (AHAM) con propiedades biomecánicas conservadas y un potencial de adhesión favorable. En el lado estromal de la AHAM, siembran fibroblastos humanos de prepucio (HFFs), estos se adhieren y extienden con su morfología característica de huso, proliferan en multicapa, cubren completamente el AHAM y migran en línea recta. Sus resultados indican que la AHAM puede ser un candidato ideal como sustrato de adhesión y migración, así como otras funciones *in vitro* bajo una fuerza de tracción que imita el entorno *in vivo*.⁵³

Otro trabajo que explora el potencial como andamio del amnios es el de **Mahmoudi-Rad, M. y su grupo** en 2013, tienen como objetivo investigar la proliferación de fibroblastos humanos de prepucio sobre membrana amniótica humana, y el desarrollo de un sustituto temporal de piel. En este estudio investigan la adecuación de un andamio de amnios humano acelular para el cultivo de fibroblastos y, de este modo, generar un sustituto de piel para el tratamiento de heridas como quemaduras y úlceras crónicas. Ellos encuentran que los fibroblastos alogénicos cultivados tenían adherencia y viabilidad aceptables sobre el amnios, y obtienen un sustituto temporal de piel que puede utilizarse en heridas frescas antes de la reparación definitiva.⁵⁴

La membrana amniótica humana descelularizada y deshidratada (DDHAM) es una matriz extracelular (lamina basal) carente de células y por tanto de factores de crecimiento. En este estudio **Guo, X. et al.** 2016, examina el efecto de la unión celular a la DDHAM y las respuestas celulares inducidas. Los tipos celulares empleados fueron fibroblastos dérmicos humanos (HDF), queratinocitos epiteliales humanos (HEK) y células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC), los cuales desempeñan un papel crítico en el proceso de cicatrización de heridas. Además, se compara la DDHAM con una membrana amnios/corión humana deshidratada (dHACM), que contiene y libera factores de crecimiento y citocinas. Los HDF y HEK se cultivaron en la DDHAM y la dHACM, y se realizaron ensayos de proliferación e imagen celular para evaluar la unión de las células y su capacidad de proliferar sobre la DDHAM en relación con el dHACM. Además, examinan el efecto de los factores solubles liberados por la DDHAM y la dHACM sobre la supervivencia, unión y proliferación celular. Los autores también evaluaron el efecto de los factores solubles producidos por el cultivo de células en la DDHAM en ensayos funcionales *in vitro*, incluyendo la supervivencia celular y la migración de células endoteliales en un ensayo de angiogénesis de cierre de herida.

Sus resultados muestran que las células HDF y HEK se unieron fácilmente y proliferaron en la DDHAM, mientras que el dHACM no apoyó la unión celular ni la proliferación cuando se cultivó en las mismas condiciones. Los factores solubles secretados cuando se cultivaron HDF en la DDHAM aumentaron tanto la supervivencia de células endoteliales como la supervivencia de queratinocitos y la migración de células endoteliales en el ensayo de cierre de heridas. Por lo que concluyen: aunque DDHAM es sólo una matriz extracelular y sirve principalmente como un andamio, tiene señales suficientes para permitir la adhesión celular y la

proliferación. Además, los factores de crecimiento liberados como consecuencia de la adhesión celular favorecen la supervivencia y migración celular.⁵⁵

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el campo de la ingeniería de tejidos de piel, uno de los retos ha sido el hecho de poder restaurar la función de este órgano lesionado ya sea por enfermedades o traumatismos. En las últimas décadas el cultivo de células *in vitro* y el desarrollo e investigación en biomateriales está haciendo posible la producción de sustitutos de piel que puedan lograr restaurar la funcionalidad parcial o total de esta. Sin embargo, al día de hoy no existe ningún sustituto que pueda reemplazar todas las funciones de la piel humana, además de que generan resultados altamente variables su costo es muy elevado.

Por lo que en este estudio se propone comparar fibroblastos de abdomen (**Fb.Ab.**) contra fibroblastos de prepucio (**Fb.Pr.**) cultivados en condiciones *in vitro* sobre un AHR mediante la evaluación del inmunofenotipo celular, para el desarrollo de un constructo (AHR+Fibroblastos), ya que se sabe que los miofibroblastos, a diferencia de los fibroblastos dérmicos típicos, no apoyan adecuadamente la regeneración epidérmica o la formación de membrana basal en equivalentes de piel.

4. HIPÓTESIS

El AHR será el andamio óptimo para el cultivo de fibroblastos humanos de prepucio lo cual ayudará a la generación de un constructo que presente baja tasa/ presencia de miofibroblastos.

5. OBJETIVO GENERAL

Generación de un constructo con fibroblastos humanos aislados de biopsias de piel en condiciones *in vitro*.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Aislar y expandir fibroblastos humanos de biopsias de piel de prepucio y abdomen.
- II. Cultivar fibroblastos humanos de prepucio y abdomen sobre AHR para la generación de constructos:
 - ✓ AHR+Fb.Ab.
 - ✓ AHR+Fb.Pr.
 - ✓ Analizar las características biológicas de los fibroblastos en los constructos.
- III. Analizar el inmunofenotipo de los constructos generados.

7. MATERIAL Y MÉTODO

Se obtuvieron 6 muestras en total de piel de remanentes de cirugías de abdominoplastías y circuncisión. Se procuraron 3 muestras de prepucio en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), la edad de los donantes fue menor a 1 mes de vida. De las 3 muestras de abdominoplastías, las donantes fueron mujeres con una edad promedio de 34 años. Las muestras fueron proporcionadas con previa firma de Consentimiento Informado del paciente cumpliendo así con los siguientes aspectos éticos: Manejo de pacientes de acuerdo a Declaración de Helsinki de la *Asociación Médica Mundial (AMM)* -Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos versión 2013 ⁵⁶, Pautas Internacionales para la Evaluación Ética de los Estudios Epidemiológicos publicado por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) 1991 ⁵⁷, Guías de buena práctica clínica, Código Ético para el Personal Académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM 2005 ⁵⁸, Ley federal de protección de datos personales ⁵⁹ y la Ley general de salud.⁶⁰

Transporte de la muestra

La muestra procurada por el personal médico fue depositada en medio de transporte: DMEM-F12 (Gibco® Ref. 11320-033) + 10% Antibiótico-antimicótico (100X) (Gibco® Ref. 15240-062) a una temperatura de 4°C (Figura 10). La muestra se transportó al laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados (CENIAQ) del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).



Figura 10. Remanente de abdominoplastía en medio de transporte.

Preparación del tejido

Todas las muestras se procesaron manteniendo condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar (Thermo Scientific 1300 SERIES CLASS II Type A2); las muestras fueron procesadas antes de cumplir 24 horas después de haber sido procuradas para asegurar la máxima viabilidad celular (Figura 11).



Figura 11. Procesamiento de la muestra en condiciones de esterilidad. campana de flujo laminar (A) y muestra de abdomen (B).

En una caja petri estéril de vidrio se depositó la muestra manteniendo medio de transporte para mantenerla húmeda. Con la ayuda de unas pinzas de disección y tijeras se retiró el tejido adiposo en su totalidad y parte del tejido dérmico en el caso particular de los remanentes de abdominoplastias y, por otro lado, se retiró la mucosa epitelial de los remanentes de circuncisiones. Las muestras se depositaron en un tubo cónico de 50mL (Falcon® Ref. 352070), para posteriormente ser medidas y pesadas en una balanza analítica (OHAUS Adventurer® Pro AV264C).

Las muestras fueron sometidas a una serie de tres lavados de forma vigorosa con Buffer de fosfatos (PBS 1X) (Gibco® Ref. 10010-023) + 10% Antibiótico-antimicótico (100X) durante 5 minutos cada uno. Finalizados los lavados se removió el tejido dérmico remanente con la ayuda de tijeras de disección y con un bisturí se practicaron cortes a la muestra de piel para facilitar la acción de la enzima Dispasa, y lograr así, la separación de las capas de la piel.

Separación de las capas de la piel

En un tubo cónico de 50ml se preparó la solución de Dispasa (Gibco® Ref. 17105-041) (3mg/mL) diluida en Buffer de fosfatos (PBS 1X), la cual se filtró utilizando un filtro de 0.20µM (Corning® Ref. 431224) antes de ser utilizada. La muestra de piel fue depositada en la solución de Dispasa (3mg/mL) y colocada en un agitador orbital (Thermo Fisher, MaxQ 4000, Mod. 4330), manteniendo el tubo de la muestra en agitación a 210 rpm a 37°C durante 1h y 30min.

Transcurrido el tiempo de digestión del tejido en Dispasa, se observó la separación de la capa epidérmica y dérmica. Una vez separadas estas capas que conforman la piel, se procedió al aislamiento de los fibroblastos, principal componente celular del tejido dérmico ([Figura 12](#)).

*La dispasa es una enzima que se emplea para disociar una amplia gama de tejidos con el mínimo daño a las células, manteniendo generalmente la integridad de la membrana celular.



Figura 12. Separación de la dermis de la epidermis.

Procesamiento de la capa dérmica

La dermis fue colocada en una caja petri estéril y con ayuda de tijeras de disección, pinzas de disección y bisturí el tejido fue disgregado mecánicamente en fragmentos pequeños (Figura 13), los cuales se colocaron en tubo cónico de 50 mL con solución salina equilibrada de Hank's (HBSS) (Gibco® Ref.14170-161) + colagenasa de tipo II (Worthington Biochemical Corporation, Ref.S5B15572) al 1% para su disgregación enzimática. La dermis se mantuvo en agitación a 210rpm a 37°C toda la noche en el agitador orbital.

*La colagenasa es única entre las proteasas por su capacidad para degradar las fibrillas de colágeno nativo de triple hélice que comúnmente se encuentra en tejidos conectivos, como la piel, los tendones, los vasos sanguíneos y los huesos.

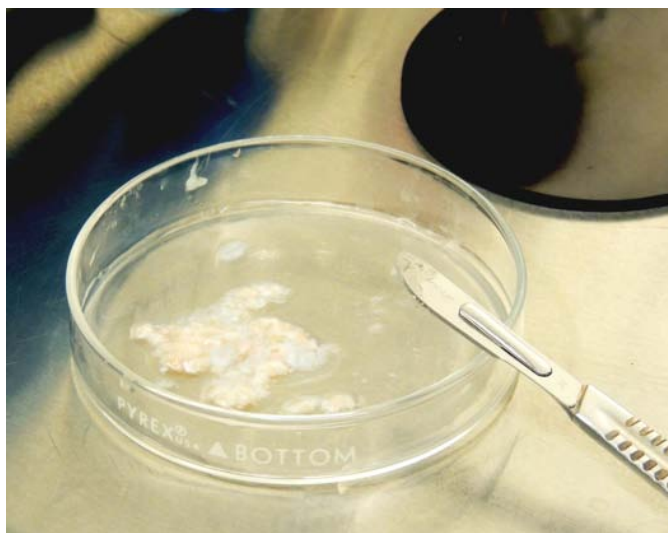


Figura 13. Disgregación mecánica de la dermis.

Obtención de fibroblastos humanos

Una vez transcurrido el tiempo en la solución de colagenasa II, el tejido dérmico se disgregó en su totalidad, la solución se filtró con un filtro celular 70 μ M (Falcon® Ref. 352350) para evitar pequeños fragmentos de tejido no disgregado. Se neutralizó la acción de la colagenasa II adicionando medio suplementado (DMEM-F12 + 10% Suero fetal bovino (FBS) (Gibco® Ref. 16000-044) + 1% Antibiótico-antimicótico (100X)) en relación 1:2. El tubo con el tejido dérmico disgregado se centrifugó (Centrifuge 5702, Eppendorf, Germany) a 1500rpm durante 5 minutos.

Finalizada la centrifugación se obtuvo un botón celular al fondo del tubo cónico, se desechó el sobrenadante con cuidado. Se adicionó 1mL de medio suplementado se resuspendió el botón celular y se procedió al conteo celular.

Conteo celular

Las células se mezclaron con el colorante azul tripano, el cual penetra únicamente en las células cuya membrana no esta integra, tiñéndolas de azul logrando así diferenciar las células vivas que se observan transparentes. Este procedimiento se realiza con una Cámara de Neubauer (hematocitómetro).

Se tomó una alícuota de 10 μ L de la suspensión de células y se mezclaron con 10 μ L de azul tripano con la ayuda de una micropipeta (Rainin PR-20, Ref. 17008650). Esta suspensión se colocó dentro de ambos lados del portaobjetos que conforma la cámara de Neubauer y se realizó el conteo celular bajo un microscopio óptico (Axio observer.A1 Research Microscope, Carl Zeiss, Germany). Se contaron los cuatro cuadrantes de ambos lados de la cámara y se sacó un promedio (Figura 14).

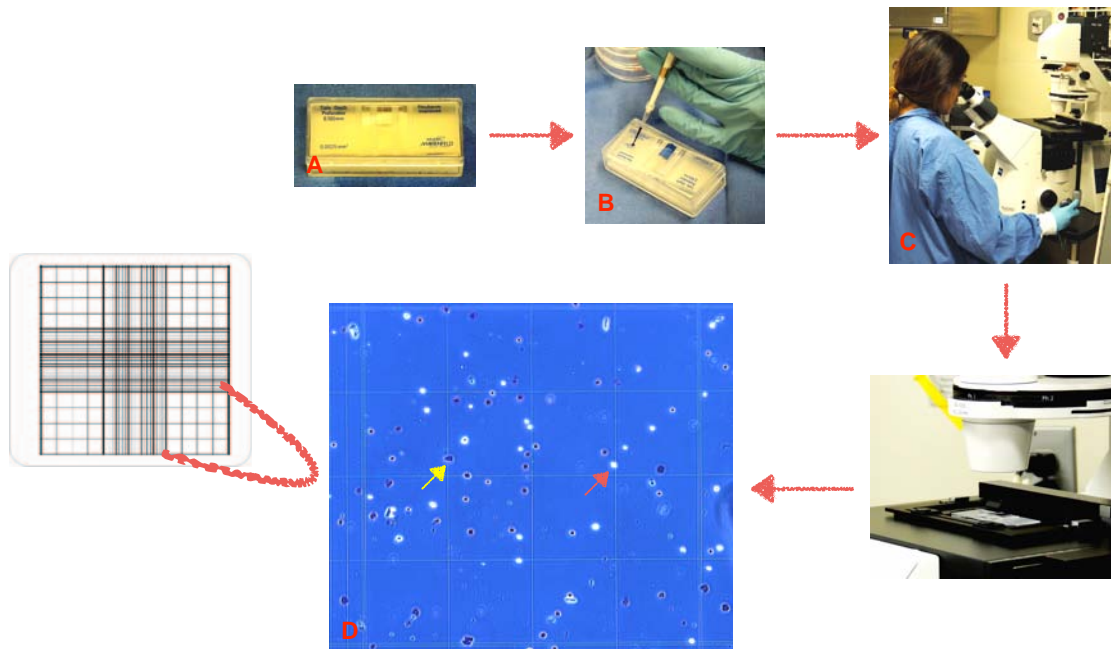


Figura 14. Conteo celular. Cámara de Neubauer (A), dilución de la suspensión de células con azul tripano y llenado de la cámara de Neubauer (B), observación al microscopio (C) y cuadrante de la cámara donde se distinguen claramente las células vivas (▶) de las células muertas (▶)(D).

Para hacer el cálculo total de células en 10µL se utilizó la siguiente formula:

$$(\bar{X}) (2) (10,000) (\text{\#mL de la suspensión})$$

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

\bar{X} .- Es el promedio
 $\sum X$.-Número de células contadas
 n .- Número de cuadrantes contados

Cultivo celular *In vitro*

Finalizado el conteo celular y conociendo el total de células, los fibroblastos se sembraron en cajas de cultivo celular de 75 cm² (Corning® 75cm² Cell Culture Flask, Ref. 430641U) a una densidad de 10,000 cel./cm² (cultivos primarios **C.p.**). Para esto se tomó una alícuota de la suspensión que contenía la cantidad de células para cubrir dicha densidad. Se adicionó medio DEMEM-F12 suplementado a las cajas de cultivo y con movimientos suaves oscilatorios se homogeneizaron de manera uniforme las células en toda la superficie de cultivo de la caja.

Las cajas se guardaron dentro de un incubador (NUAIRE™ Auto Flow, NU-4750), manteniendo los cultivos a una temperatura de 37 °C, humedad relativa del 95% y CO₂ al 5%. Una vez alcanzada la confluencia celular del 90-95% en los C.p. se llevó a cabo el subcultivo y siembra del AHR.

Subcultivos

Dentro de la campana de flujo laminar se retiró el medio de cultivo, posteriormente se hicieron 2 lavados con PBS 1X de 15 segundos cada uno, para enjuagar en su totalidad el medio de la caja de cultivo. Terminado el segundo lavado se retiró el PBS 1X para después adicionar tripsina-EDTA al 0.25% (1X) (Gibco® Ref. 25200-056) a las cajas de cultivo, se utilizó en relación 2:5 diluida con PBS 1X , la caja de cultivo se guardó dentro del incubador a 37°C por 6 minutos.

Concluido el tiempo en tripsina-EDTA se observaron las cajas de cultivo al microscopio para asegurarse que las células se hubieran desprendido de la superficie de cultivo. Una vez desprendidas en su totalidad se adiciono medio suplementado para inactivar la acción de la tripsina en relación 1:2. Ya neutralizada la tripsina la solución con células se paso a un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 1500rpm durante 5 minutos. Finalizada la centrifugación se obtuvo el botón celular y se desechó el sobrenadante, el botón celular se resuspendió en 1mL de medio suplementado y se procedió al conteo celular, conociendo el total de células, estas se sembraron en cajas de cultivo **(C.c.)** a la densidad de 10,000 cel./cm² y 240,000 cel./cm² sobre el AHR.

Cultivo celular sobre un AHR

Para realizar la siembra sobre el AHR, este se corta previamente dentro de la campana de flujo laminar en una caja petri estéril con la ayuda de una perforadora para papel.

El cultivo sobre AHR se realizó de la siguiente manera:

Las células se expandieron en **C.p.**, alcanzada la confluencia celular del 90-95% se llevo a cabo la siembra del AHR, los fibroblastos se sembraron a la densidad de 240,000 cel./cm² (previamente estandarizado para fines de este estudio). Las células para la siembra se concentraron, es decir, alta densidad de células en poco volumen de medio de cultivo. Se hicieron los cálculos para la siembra y dependiendo del volumen que contenía la densidad celular deseada, la siembra se realizó por dosificación de volúmenes de aproximadamente 2µL - 4µL para cubrir de manera homogénea la superficie del AHR.

Después de la siembra de los fibroblastos sobre el AHR se incubaron de 1h y 30 minutos a 2 horas, transcurrido este tiempo se adiciono medio suplementado. Al día siguiente después de la siembra se evaluó la viabilidad de los fibroblastos para poder proceder con los ensayos posteriores.

Viabilidad celular *In vitro* y sobre un AHR

Las pruebas de viabilidad se realizaron al día siguiente después de la siembra del AHR con el kit **LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells** (Invitrogen, Ref. L3224). Este kit proporciona un ensayo de viabilidad celular de fluorescencia, se basa en la determinación simultánea de células vivas y muertas, con dos sondas que miden parámetros reconocidos de viabilidad celular (la actividad de la esterasa y la integridad de la membrana plasmática).

El ensayo de viabilidad se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante:

Previamente en un tubo Eppendorf se preparó la solución Calceína-AM/EthD-1 y se mantuvo cubierta de la luz, para esto se coloca 1mL de solución salina equilibrada de Hank's (HBSS) al que se le adiciona en este orden, 1 μ L de EthD-1+0.5 μ L de calceína-AM.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo de la caja de cultivo, enseguida se hicieron 2 lavados con PBS 1X con duración de 20 segundos cada uno; al finalizar los lavados con PBS 1X se adiciono la solución de calceína-AM/EthD-1 a los cultivos a ensayar.

Se incubo por 45 minutos a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación se retiró la solución y se hizo un lavado con PBS 1X de 20 segundos de duración. Luego se procedió a observar al microscopio óptico de fluorescencia (Axio IMAGER.Z2 Research Microscope, Carl Zeiss, Germany). Se tomaron fotografías de las **C.c.** (Control +) y del AHR (experimentales).

Inmunofenotipo celular

El inmunofenotipo celular se determinó por el siguiente panel de anticuerpos monoclonales primarios: Anti-Fibroblast Surface Protein antibody [1B10] (IgM) (Abcam, Ref. 11333) hecho en ratón, dilución [1:750], Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (IgG) [EPR5368] (Abcam, Ref.124964) hecho en conejo, dilución [1:1000]. Estos anticuerpos se utilizaron para ensayos de Inmunofluorescencia. Los núcleos celulares fueron marcados usando Hoechst 34580 (Sigma-Aldrich, Ref. 63493) (1mg / ml) dilución [1: 1000].

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Texas Red ®) (Invitrogen, Ref. T-6391) [1:400] y Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (FITC) (Thermo-Fisher, Ref. F-2761) [1:200].

Proliferación celular

La proliferación se evaluó por Inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal primario Purified anti-human Ki-67 (IgG) (BioLegend, Ref. 350501) hecho en ratón, dilución [1:100]. Los núcleos celulares fueron marcados usando Hoechst 34580 (Sigma-Aldrich, Ref. 63493) (1mg / ml) dilución [1: 1000].

El anticuerpo secundario utilizado fue Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (FITC) (Thermo-Fisher, Ref. F-2761) [1:200].

Ki-67 es una proteína nuclear que se expresa en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y Mitosis), pero se encuentra ausente en las células en reposo (G0).

Protocolo general estandarizado para Inmunofluorescencias:

Posterior a la evaluación de la viabilidad de los fibroblastos sobre el AHR, se procedió a las pruebas de inmunofenotipo siempre y cuando se obtuvo un ~95% de células viables sobre el AHR.

Fijación de las muestras

Después de retirar el medio de cultivo a los constructos (AHR+Fb.) se realizaron dos lavados con PBS 1X para enjuagar todos los restos de medio de cultivo. Las muestras se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, durante 10 minutos a temperatura ambiente enseguida se hicieron dos lavados con PBS 1X para quitar los restos de PFA.

Permeabilización

Las muestras se permeabilizaron, 10 minutos a temperatura ambiente. Y dependiendo de la localización de la proteína de interés se usaron dos tratamientos para la permeabilización.

- **Superficie:** Tween 20 al 0.1% en PBS: **[1B10]**.
- **Intracelulares:** Triton X-100 al 0.5% en PBS: **[Ki-67 y α -sma]**.

Finalizado el tiempo en solución de bloqueo se hicieron dos lavados con PBS 1X.

Bloqueo

Las muestras se bloquearon, 30 minutos a temperatura ambiente. Al igual que la permeabilización también hay diferentes tratamientos dependientes de la localización de la proteína de interés.

- Sero albúmina bovina (**BSA**) 8% en **PBST** (PBS (1x)+Tween 20 al 0.1%) : **[1B10]**.
- Suero Fetal Bovino (**SFB**) al 10% en PBS 1X: **[α-sma]**.
- Suero Fetal Bovino (**SFB**) al 5% en PBS 1X: **[Ki-67]**.

En el caso particular de los marcajes dobles se bloquea con la solución de mayor concentración.

Incubación del anticuerpo primario

El anticuerpo 1° se diluye en solución de bloqueo a las siguientes concentraciones:

- 1B10 **[1:750]** en [BSA 8% en PBST].
- α-sma **[1:1000]** en [SFB al 10% en PBS].
- Ki-67 **[1:100]** en [Triton X-100 al 0.5% en PBS].

En el caso particular de los marcajes dobles los anticuerpos 1° se diluyen:

- α-sma+1B10 en [BSA 8% en PBST].
- α-sma+Ki-67 en [Triton X-100 al 0.5% en PBS].

Teniendo siempre en cuenta la concentración a la que se emplean.

Se incubó toda la noche a 4°C.

Día 2.

Incubación del anticuerpo secundario.

Se retiró la solución del anticuerpo 1° y se hicieron tres lavados con PBS 1X, los anticuerpos 2° Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Texas Red®) **[1:400]** y Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (FITC) **[1:200]** se diluyeron en **BSA 1%** en PBS 1X.

Se incubo 1h y 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X.

Para teñir los núcleos se utilizo **Hoechst** diluido en PBS 1X [**1:10000**], se deja actuar por 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después se hizo un lavado con PBS 1X y se observo al microscopio.

Análisis de imagen

Las imágenes de las inmunofluorescencias se analizaron con **ImageJ**, que es un programa informático de tratamiento digital de imagen orientado principalmente hacia el ámbito de las ciencias de la salud. Se analizaron 8 imágenes por ensayo, se uso la separación y filtrado de canales, se realizaron conteos directos y posteriormente se sacaron promedios.

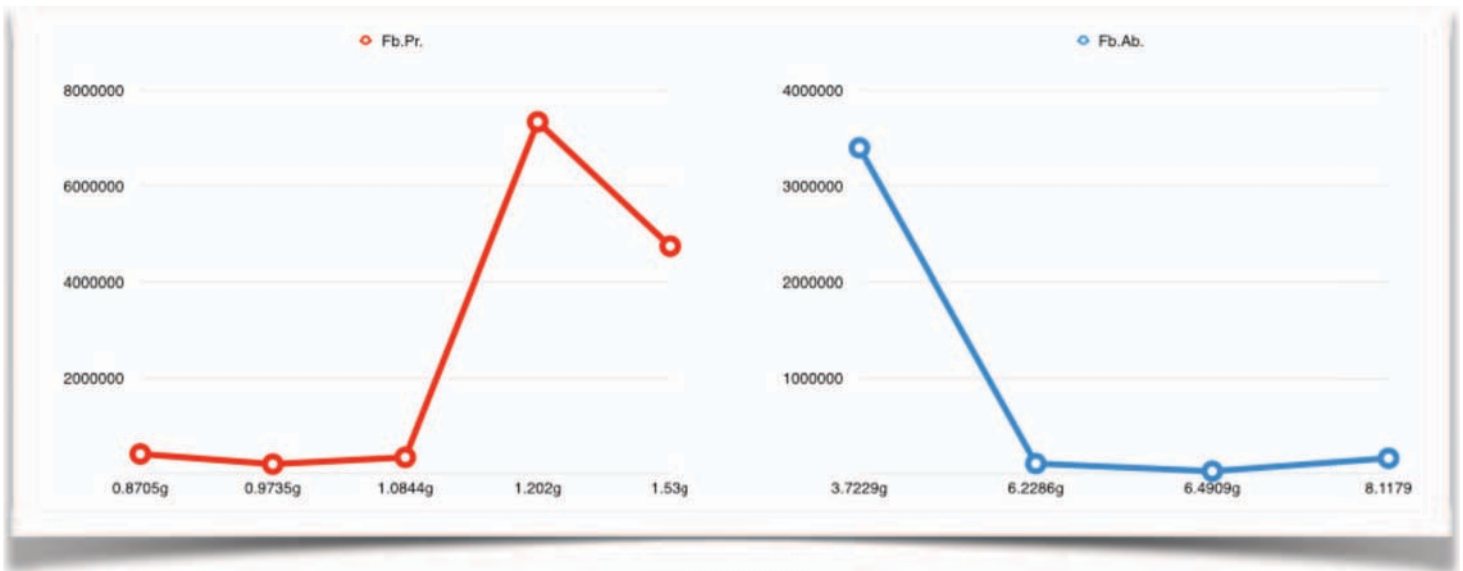
8. RESULTADOS

I. Aislamiento y expansión de fibroblastos humanos de biopsias de piel de prepucio y abdomen

Se aislaron \approx 65% de fibroblastos humanos de los distintos tejidos remanentes de cirugías plásticas y se establecieron C.p para su expansión *in vitro* en cajas de cultivo (Figura 15). El rendimiento celular no se relacionó de forma directa al peso de la muestra, en las biopsias de prepucio que no fueron mayores a 1.13 g en promedio se obtuvo un mayor rendimiento en comparación con las biopsias de abdomen con un peso promedio de 6.14 g, es decir una muestra de mayor peso no garantiza un mayor rendimiento celular (Gráfica 1). Otro aspecto que es de hacer notar fue el tiempo que tardaron los C.p. en llegar a confluencia aquí nuevamente los **Fb.Pr.** tuvieron una tasa de crecimiento mayor a la de los **Fb.Ab.**, en general los Fb.Pr. tardaron una semana en llegar a confluencia, mientras que, los Fb.Ab. demoraron tres semanas. La técnica de aislamiento de fibroblastos humanos que se empleó en este trabajo se esquematiza en la Figura 16.



Figura 15. Cultivos primarios (C.p.) de fibroblastos *In vitro* aislados de: prepucio (A) y Abdomen (B). La morfología de los Fb.Pr. y Fb.Ab. son similares.



Gráfica 1. El prepucio tiene un mayor rendimiento celular, las biopsias de prepucio tuvieron un peso promedio de 1.13208 g y un rendimiento celular de 2,605,000 células frente a los 6.140075 g en promedio de las biopsias de abdomen y su rendimiento celular de 921,872 células.

Aislamiento de fibroblastos humanos de remanentes de cirugía

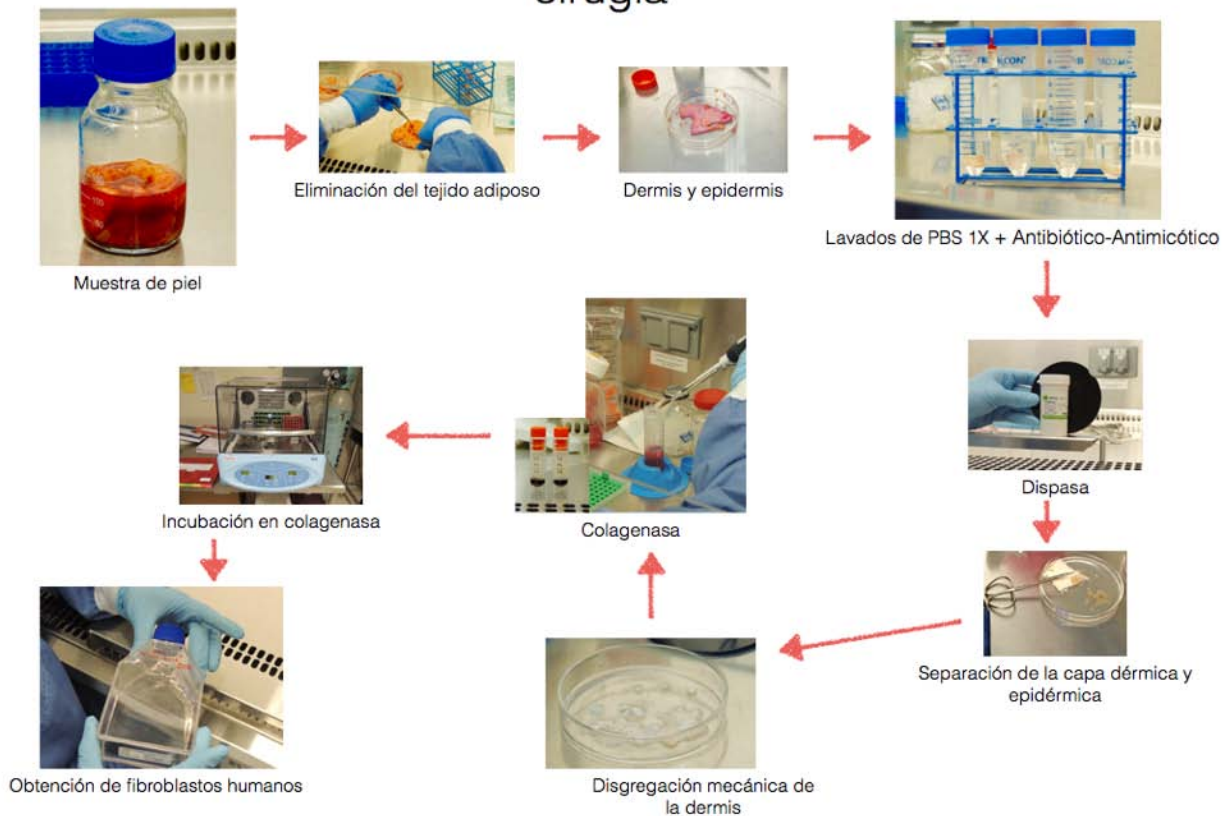


Figura 16. Técnica de aislamiento de fibroblastos humanos.

II. Cultivo de fibroblastos humanos de prepucio y abdomen sobre AHR para la generación de constructos

El primer subcultivo celular se realizó sobre el AHR para la generación de los constructos tanto de AHR+Fb.Pr. como de AHR+Fb.Ab., la densidad celular utilizada para la formación de los constructos fue de 240,000 cels/cm². Las pruebas de viabilidad se hicieron al día siguiente donde se observó ~90% de células viables al comparar ambos constructos. Las pruebas de viabilidad celular se realizaron 24 horas después del cultivo para evitar que las células se desprendieran del amnios o comenzaran a morir debido al gran número utilizado para este ensayo (Figura 17).

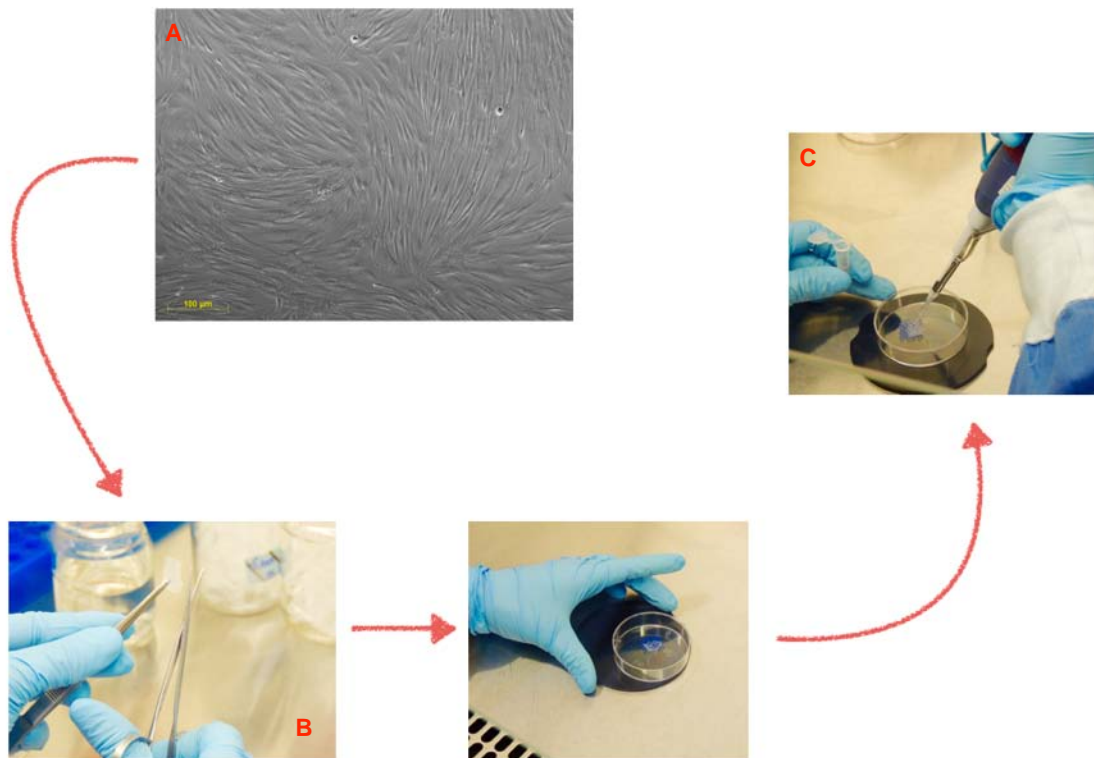


Figura 17. Cultivo de Fb.Pr. y Fb.Ab. humanos sobre el AHR. confluencia del 90-95% en C.p. de fibroblastos (A), corte de amnios en condiciones de esterilidad (b) y siembra del amnios por dosificación de volúmenes de aproximadamente 2µL - 4µL (C).

La densidad celular utilizada para el cultivo del AHR, se estandarizó previamente utilizando las densidades de: 30,000 cels/cm²; 60,000 cels/cm²; 120,000 cels/cm² y 240,000 cels/cm². En 30,000 cels/cm² no se observaron células sobre el AHR, en 60,000 cels/cm² y 120,000 cels/cm² solo se observaron células muertas (teñidas en rojo), también se alcanza a apreciar el epitelio teñido en verde (autofluorescente) que se separa de la lámina basal del AHR. Este ensayo se hizo por triplicado para los dos tipos de fibroblastos a seis, cuatro y un día después del cultivo, obteniendo resultados similares. Sin embargo donde se obtuvo una mayor cantidad de células viables sobre el AHR fue al día siguiente después del cultivo (Figura 18).

Con la densidad de 240,000 cels/cm², se observaron células fusiformes, morfología característica del fibroblasto, estas células se tiñeron en verde y fluorescieron de acuerdo a lo descrito en el kit **LIVE/DEAD**® son células que mantienen íntegra su membrana celular es decir se encuentran viables sobre el AHR. Por tal motivo se utilizó la densidad celular de 240,000 cels/cm² para cultivar el AHR con Fb.Pr. y Fb.Ab. respectivamente, en cuanto a **C.c.** la densidad celular empleada fue de 10,000 cels/cm², los cultivos se realizaron simultáneamente tanto en C.c. como en AHR, las pruebas de viabilidad se hicieron al día siguiente.

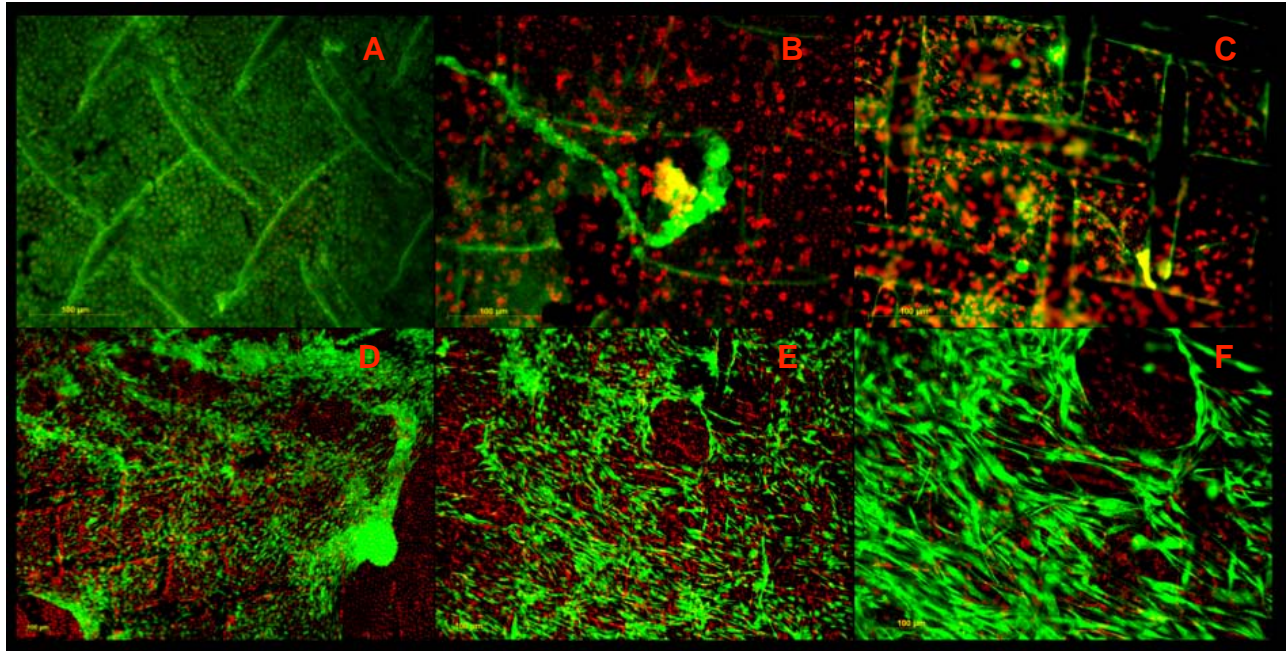


Figura 18. Densidades probadas de Fb.Ab. sobre el AHR. 30,000 cel/cm² (A), 60,000 cel/cm² (B), 120,000 cel/cm² (C) y 240,000 cel/cm² a 5x(D), 10x(E) y 20x(F).

Estandarizada la densidad celular sobre el AHR se generaron los constructos de AHR+Fb.Pr. y AHR+Fb.Ab., se evaluó la viabilidad de los fibroblastos sobre el AHR. Ya evaluada la viabilidad se procedió a las pruebas de inmunofenotipo celular y proliferación de los constructos y las C.c.

En los constructos generados se observó un patrón de migración celular en forma de rejilla de los Fb.Pr. como de los Fb.Ab. sobre el AHR por lo que quedaron algunas zonas libres de fibroblastos (▶) y otras donde se concentraron una gran cantidad de células (▶) (Figura 19). Este patrón fue consistente en todos los constructos generados para este estudio.

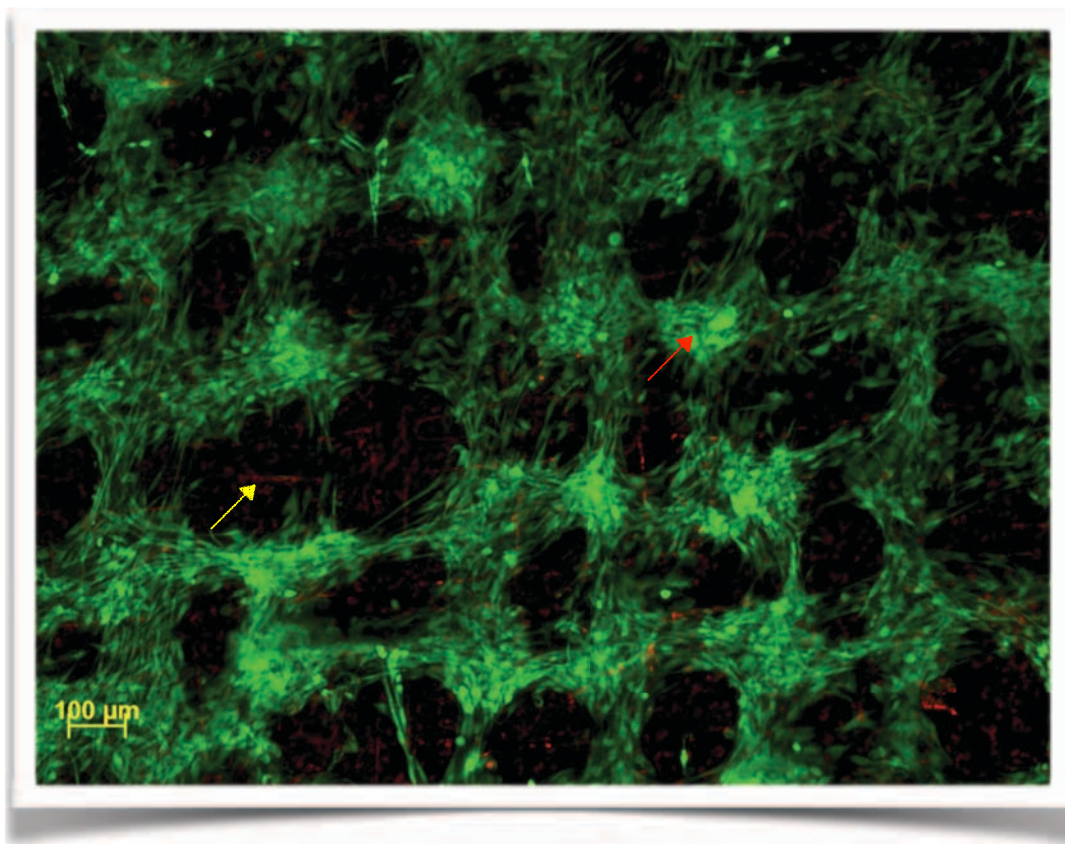


Figura 19. Migración de los fibroblastos sobre el AHR. Concentración de fibroblastos (▶) y AHR libre de células (▶).

III. Análisis del inmunofenotipo de los constructos generados.

Dejando por un lado los obstáculos de la técnica de sembrado y la densidad celular sobre el AHR, se comparó la proliferación y viabilidad de los constructos generados. Para el análisis de proliferación se utilizó el anticuerpo monoclonal Ki-67, los núcleos celulares se observaron en azul y algunos de estos presentaron el marcaje positivo a Ki-67 (▶), cuando se comparó la proliferación de los Fb.Pr. con los Fb.Ab. se vio que la proliferación fue mayor en los Fb.Pr., en cuanto a la viabilidad no se observaron diferencias entre los Fb.Pr. y Fb.Ab., Pero al comparar la proliferación con la viabilidad es notable que no todas las células viables se encontraron en proliferación (Figura 20).

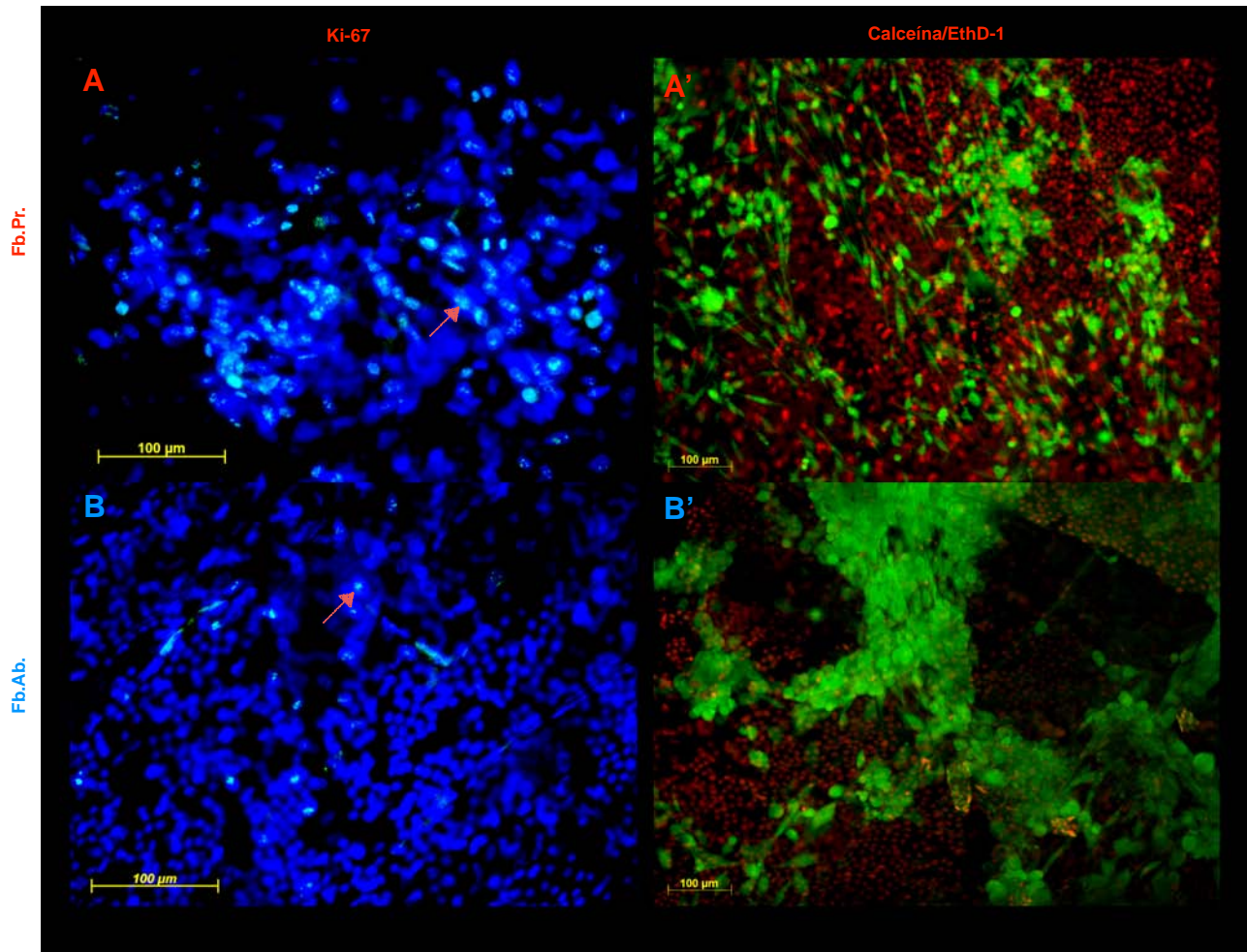
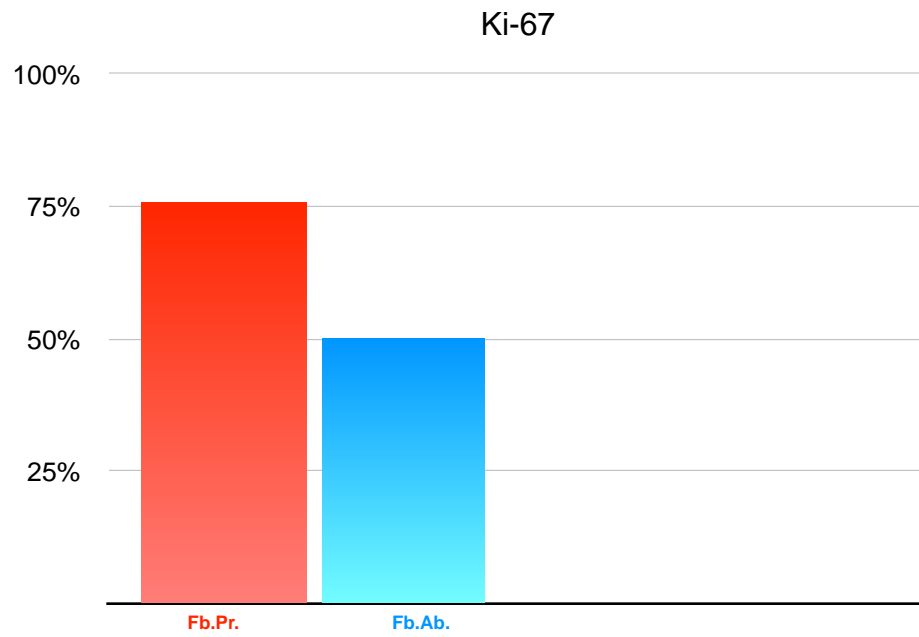


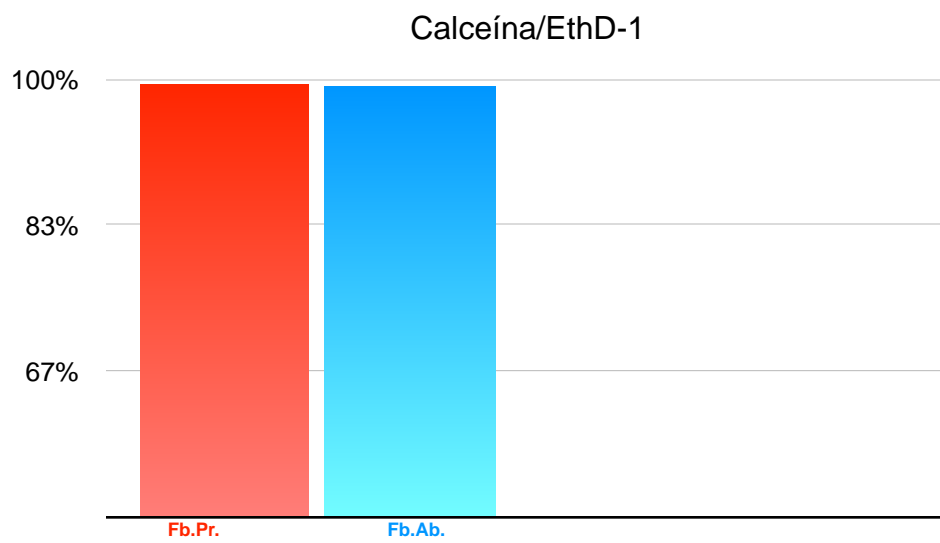
Figura 20. Los Fb.Pr. (A) exhiben una mayor proliferación en comparación a los Fb.Ab.(B). Respecto la viabilidad, los Fb.Pr. (A') y Fb.Ab. (B') no se observan diferencias.

En la [gráfica 2](#) se muestran los porcentajes comparativos de proliferación de los Fb.Pr. y Fb.Ab. que fueron de $\sim 75\%$ y $\sim 50\%$ respectivamente. La [gráfica 3](#) muestra que la viabilidad no difiere entre Fb.Pr. y Fb.Ab. y ambos tipos de fibroblastos estuvieron $\sim 95\%$ viables sobre el AHR.

Los controles (**C.c.**) mostraron la misma tendencia en cuanto a proliferación aunque en porcentajes menores, la viabilidad celular fue similar al grupo experimental (datos no mostrados).



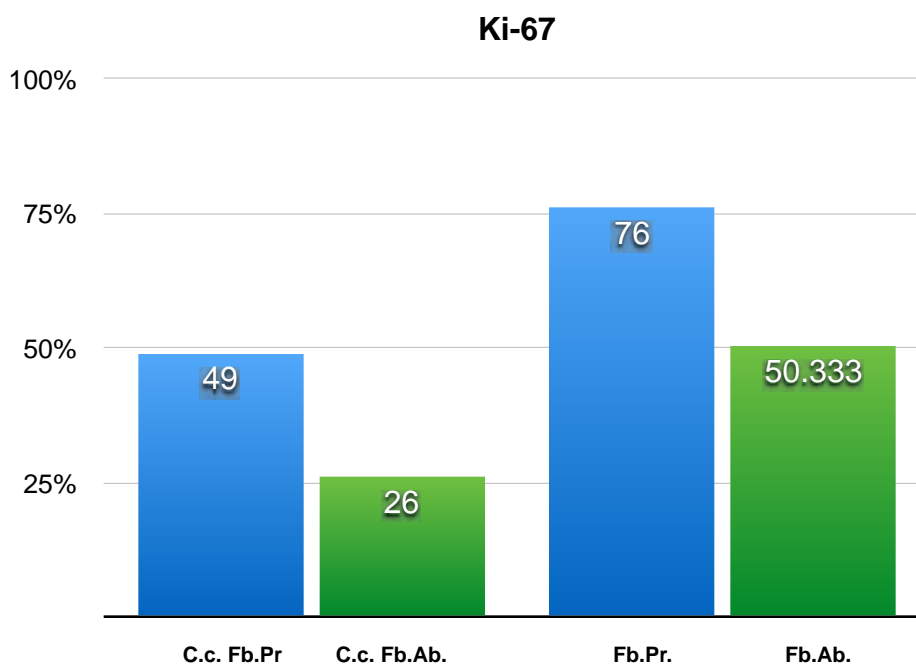
Gráfica 2. Porcentajes comparativos de proliferación entre Fb.Pr. y Fb.Ab.



Gráfica 3. Porcentajes comparativos de viabilidad entre Fb.Pr. y Fb.Ab.

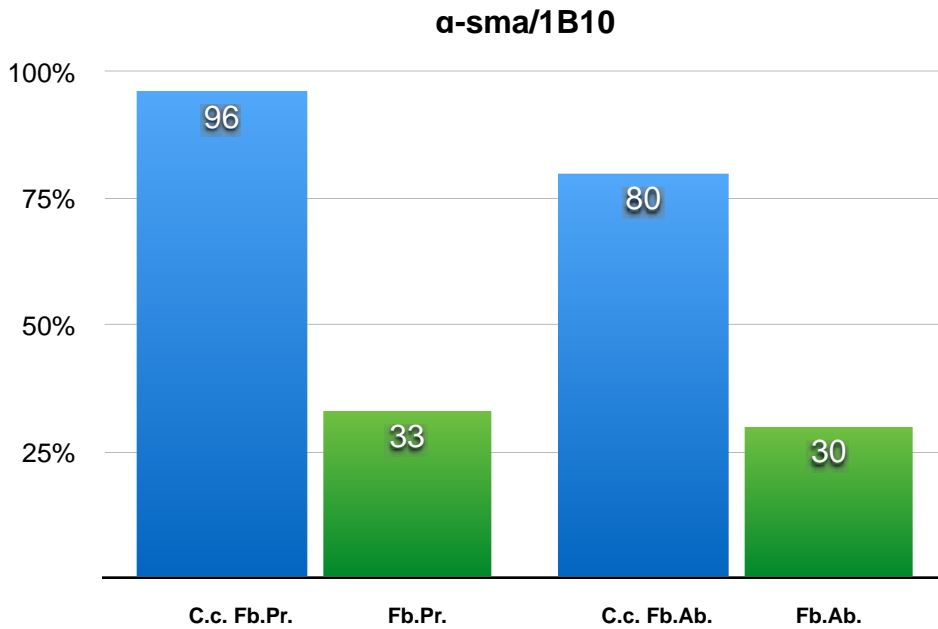
La expresión de diferentes marcadores de linaje específico se examinaron en los fibroblastos humanos derivados de prepucio y abdomen, en condiciones **C.c** y **AHR +Fb** mediante inmunofluorescencia, para lo cual se seleccionaron tres anticuerpos monoclonales: anti-fibroblast surface protein antibody [1B10] que reconoce la proteína de superficie de fibroblastos humanos, anti-alpha smooth muscle actin antibody [EPR5368] que reconoce α -sma presente en miofibroblastos, se localiza en el citoesqueleto dispuesta en haces de microfilamentos. Aquí nuevamente se evaluó la proliferación utilizando purified anti-human Ki-67.

Los resultados comparativos de los Fb.Pr. y Fb.Ab. mostraron en el caso particular de **Ki-67**: Que los Fb.Pr. tuvieron una mayor tasa de proliferación en las dos distintas condiciones de cultivo en relación a los Fb.Ab. (como ya se había observado), pero que en ambos grupos de fibroblastos su tasa de proliferación aumento cuando se encontraron sobre el AHR. Aquí lo interesante es que se presentaron diferencias en las tasas de proliferación dentro de los grupos de Fb.Pr. y Fb.Ab., siendo mayor la proliferación sobre el AHR en comparación al C.c. La **gráfica 4** muestra los porcentajes comparativos dentro y entre los grupos de fibroblastos en las dos condiciones de cultivo.



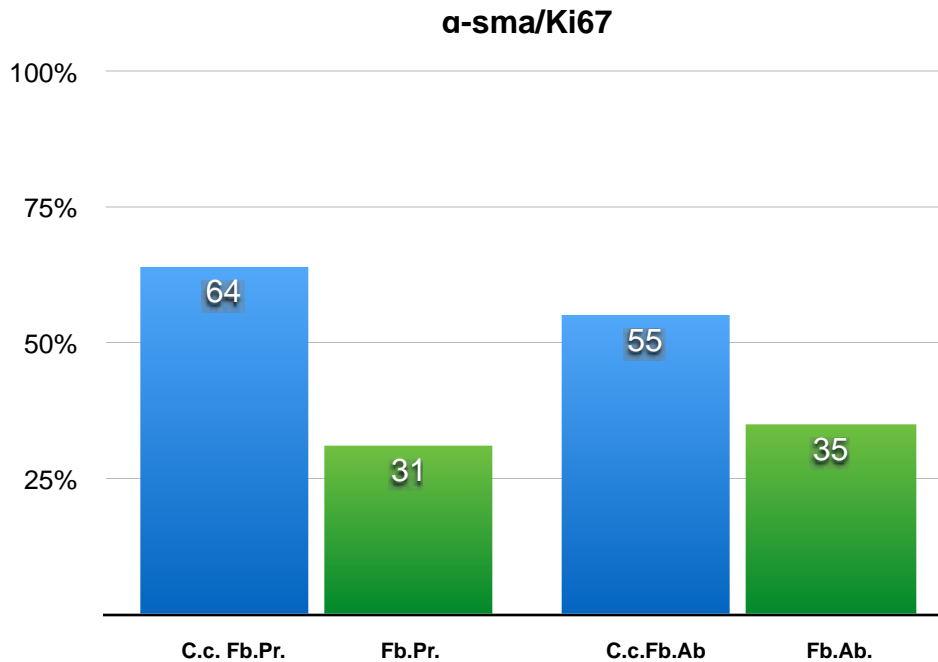
Gráfica 4. El AHR favorece la proliferación de los Fb.Pr. y Fb.Ab.

Por otro lado se realizó el marcaje α -sma / 1B10 para distinguir cuantos de los fibroblastos cultivados en el AHR y C.c. eran positivos a α -sma es decir presentaban un fenotipo miofibroblástico. Se observó en general que los miofibroblastos comparten el marcador de superficie de fibroblastos y que en la condición C.c. se presentaron altos porcentaje de miofibroblastos en los grupos de Fb.Pr. y Fb.Ab. Sin embargo, cuando estos grupos se cultivaron sobre el AHR la cantidad de miofibroblastos presentes disminuyó en comparación a los cultivos C.c. y se ubicaron con porcentajes similares. En la [gráfica 5](#) se muestran las diferencias al interior de los grupos de fibroblastos como entre los grupos, lo remarcable es como los miofibroblastos presentes Fb.Pr. y Fb.Ab. disminuyen sobre el AHR.



Gráfica 5. El AHR disminuye la presencia de miofibroblastos en los Fb.Pr. y Fb.Ab.

En el marcaje α -sma/Ki67 se observaron que del total de miofibroblastos presentes en los grupos de Fb.Pr y Fb.Ab no todos estaban proliferando en condición C.c. y sobre el AHR a primera vista se aprecia una gran cantidad de células en proliferación de las cuales solo una mínima cantidad corresponde a un fenotipo miofibroblástico. La [gráfica 6](#) muestra los porcentajes de miofibroblastos positivos al marcador de proliferación Ki-67 tanto en condiciones C.c. como sobre un AHR, aquí se observa una disminución considerable en los porcentajes de miofibroblastos positivos a Ki-67 sobre el AHR en comparación a C.c. para ambos grupos de fibroblastos.



Gráfica 6. El AHR disminuye la proliferación de los miofibroblastos en presentes Fb.Pr. y Fb.Ab.

La [Figura 21](#) muestra los resultados comparativos de las pruebas del inmunofenotipo celular entre los grupos de Fb.Pr. y Fb.Ab. en las condiciones de cultivo C.c. y AHR.

En el primer panel correspondiente a [Ki-67](#) de izquierda a derecha se observan núcleos celulares teñidos en azul y algunos de estos son positivos al marcador de proliferación celular (verde brillante), como se describió con anterioridad los Fb.Pr muestran una mayor tasa de proliferación en comparación a los Fb.Ab. en las condiciones de cultivo manejadas en este estudio.

El segundo panel muestra el marcaje [\$\alpha\$ -sma / 1B10](#), en general se observa que los Fb.Pr. y Fb.Ab. en condiciones C.c., la mayoría muestra microfilamentos de α -sma (rojo) que corresponden al fenotipo miofibroblástico, pero además también son positivos a la proteína de superficie de fibroblastos (verde). Por otro lado, cuando se cultivaron sobre el AHR el número de células positivas a α -sma disminuyeron considerablemente sin desaparecer por completo.

El último panel correspondiente a α -sma/Ki67 de manera global se observa de izquierda a derecha en la primer imagen células con fenotipo miofibroblástico de las cuales solo algunas se encuentran en proliferación, en la segunda imagen se observa una cantidad mayor de células en proliferación de las cuales solo algunas son miofibroblastos, la tercer imagen muestra más claramente que no todos los miofibroblastos presentes están proliferando. La última imagen corresponde a un campo de Fb.Ab. cultivados sobre AHR que no son positivos a α -sma pero que si están proliferando activamente.

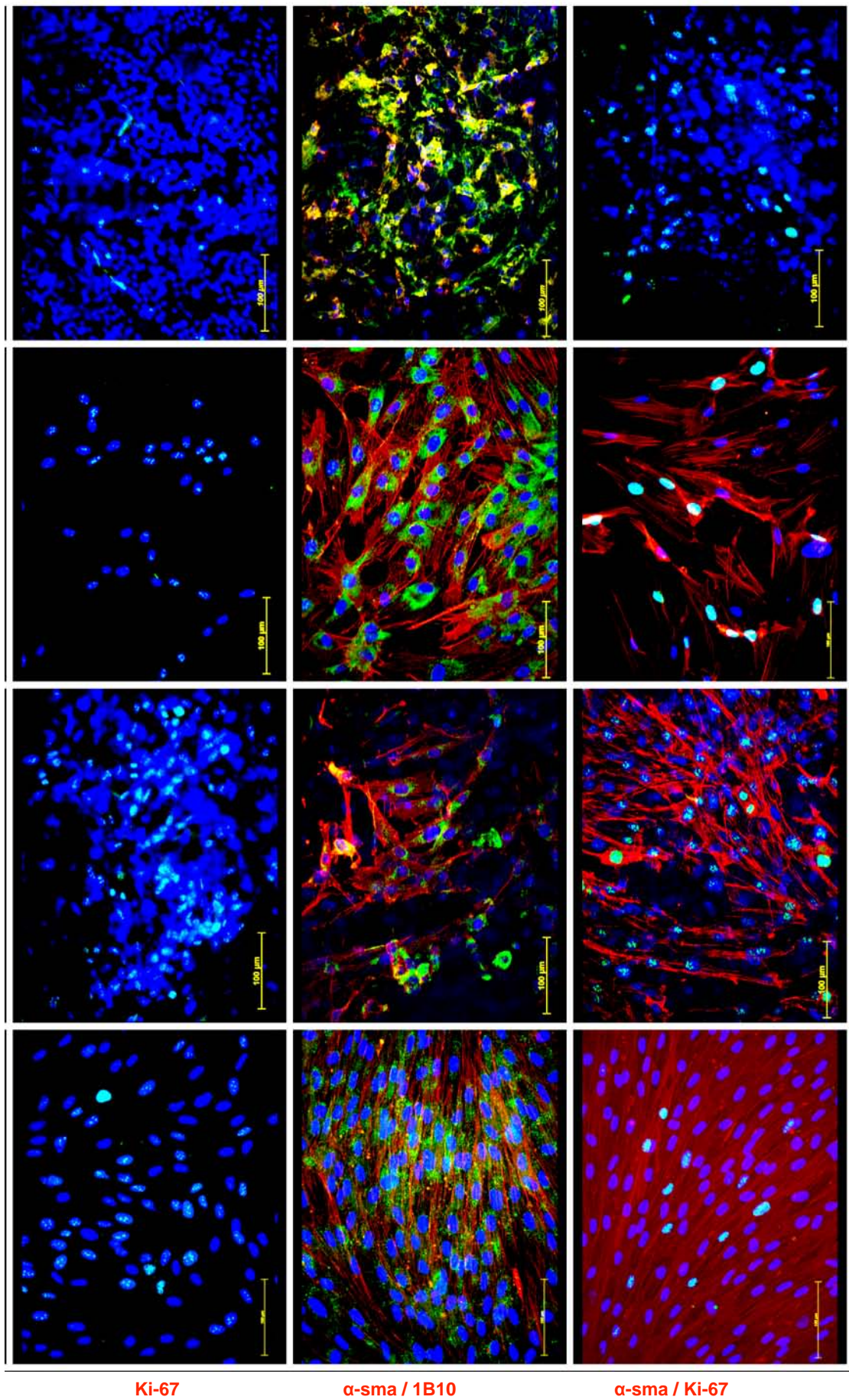


Figura 21 . Comparación del inmunofenotipo celular entre los grupos de Fb.Pr. y Fb.Ab. en condiciones de cultivo C.c. y AHR.

9. DISCUSIÓN

El número de publicaciones en las que se usan fibroblastos en ingeniería de tejidos (Guo, Q. *et al.*, 2012, Mahmoudi-Rad, M. *et al.*, 2013, Guo, X. *et al.*, 2016), está en aumento. Sin embargo, uno de los factores limitantes en el desarrollo de sustitutos biológicos de piel es el número insuficiente de células que se obtienen del aislamiento celular de una biopsia pequeña de piel (menor a 1 g).⁶¹ Por esta razón en este trabajo optamos por un tejido de fácil obtención y constante procuración. Y actualmente, una de las fuentes que más se están empleando son los tejidos remanentes de cirugías.

Los tejidos remanentes elegidos fueron prepucios de neonatos y abdomenes de mujeres adultas, teniendo en consideración que las poblaciones de fibroblastos jóvenes y adultas tienen aproximadamente 60-70 y 30-40 dobles de población, respectivamente, hasta que se alcanza la senescencia replicativa.^{62,63} Además, de que las condiciones de cultivo también inducen estrés celular y senescencia celular prematura.^{64,65}

A este respecto, se encontró que el rendimiento celular de las biopsias no se relaciona directamente al peso de estas. El mayor rendimiento celular se obtuvo en las biopsias de prepucio (1.13 g en promedio) en comparación con las biopsias de abdomen (6.14 g en promedio), aquí se pudiera establecer un peso ideal para las biopsias del cual se obtendría el máximo rendimiento celular. Esto permitirá reducir el tiempo requerido para producir sustitutos de piel y contar con un peso/tamaño ideal de muestra.⁶¹ Por otro lado los Fb.Pr. tuvieron una tasa de crecimiento mayor (doubling time) a la de los Fb.Ab., esto asociado a la edad del donante.^{62,63}

En este contexto, **Wang et al.**, 2003. Reporta que la edad de los donantes no parece tener un efecto sobre el aislamiento y rendimiento celular de las biopsias, pero la ubicación anatómica de la biopsia en relación con la obesidad parece ser de influencia, el observó una tendencia en la piel abdominal de la que se obtiene un rendimiento celular inferior en comparación con biopsias de pecho. Esto puede explicar de forma parcial la diferencia en los rendimientos celulares obtenidos de los tejidos de prepucio y abdomen.

La membrana amniótica es uno de los biomateriales más antiguos utilizados como andamio en el tratamiento de quemaduras y heridas. Fue utilizado por primera vez por Davis como sustituto de piel y más tarde para múltiples aplicaciones en oftalmología, cirugías reconstructivas y el tratamiento de quemaduras y heridas.^{66,67,68} Esta larga historia de uso de la membrana amniótica en el tratamiento de heridas ha dado lugar a un volumen considerable de evidencia clínica que Incluye una asociación con la reducción del dolor, inflamación y cicatrización, así como la capacidad de proporcionar una barrera biológica no inmunogénica para la herida.

En la actualidad se emplean diversos métodos de preparación del aloinjerto de membrana amniótica, lo que da lugar a una amplia variedad de configuraciones de aloinjertos. Las opciones van desde hojas de una sola capa a varias capas, algunas contienen la capa epitelial y factores de crecimiento, hasta membranas completamente descelularizadas con factores de crecimiento mínimos o inexistentes. Cada uno de estos aloinjertos difiere en las características de superficie, composición y cantidades de moléculas biológicamente activas y factores de crecimiento. Como resultado, pueden tener diferentes atributos de curación de heridas y mecanismos de acción.⁵⁵

Una gran cantidad de estudios han establecido que la membrana amniótica acelular (AAM) apoya la adherencia e infiltración de fibroblastos.^{54,69} En el presente estudio, el sustituto de piel fue construido con fibroblastos alogénicos (Fb.Pr. y Fb.Ab.) cultivados en un AHR en condiciones *in vitro*. Se encontró que el AHR es el biomaterial apropiado para la adhesión, migración y proliferación de fibroblastos. Además, en el constructo se observó una menor presencia de miofibroblastos en comparación a los controles en cajas de cultivo. El énfasis que se le da a la presencia de miofibroblastos en los constructos se debe a que estas células, a diferencia de los fibroblastos dérmicos típicos, no apoyan adecuadamente la regeneración epidérmica o la formación de membrana basal en equivalentes de piel.

70

Se sabe que el anclaje y la unión de células adherentes a una ECM es un requisito primario para su supervivencia y proliferación en los sustitutos de piel.⁷¹ Una ECM contiene múltiples proteínas de adhesión celular, tales como colágeno, fibronectina y laminina, que son reconocidas por Integrinas de superficie celular específicas para mediar la fijación a la superficie de la matriz.^{72,73}

El AHR cuenta con la capa epitelial y algunas moléculas componentes de la lamina basal como colágeno IV y laminina principalmente, que permitieron la adhesión, proliferación y migración de este tipo celular. Sin embargo, permanece desconocida la cantidad de moléculas biológicamente activas y factores de crecimiento que ayudaron a reducir la tasas de miofibroblastos. Por lo que valdría la pena caracterizar el AHR y ver que moléculas permanecen intactas después del proceso de esterilización con radiación gamma (γ) de Cobalto-60 que pudieran dar una mayor comprensión a estos eventos celulares.

La razón que pudiera explicar parcialmente la baja presencia de células con fenotipo miofibroblástico en los constructos: los fibroblastos están rodeados por un microambiente de soporte, lo que aumenta su capacidad proliferativa y también facilita la migración de los fibroblastos.

En este sentido se observó un patrón de migración celular peculiar de rejilla en los constructos que pudiera deberse a la topografía del AHR. Se sabe que la proliferación celular, la infiltración del andamio y la subsiguiente regeneración tisular se potencian significativamente mediante la introducción de superficies texturadas (topografías).⁷⁴ Las interacciones entre biomateriales y células están reguladas por señales nanotopográficas dentro de la ECM y se ha demostrado repetidamente que las micro y nano-topografías actúan no sólo como puntos de anclaje para la adhesión celular sino también como señales físicas para la diferenciación celular.^{75,76,77} De forma similar, diferentes tipos celulares pueden presentar diferentes velocidades de proliferación o diferenciación a ciertos linajes en superficies mecánicamente estimulantes.^{78,79,80}

Las superficies de los andamios pueden ser texturadas a varios grados, nano o microtopografía, dependiendo del tamaño de la estructura biológica a ser afectada o activada. Las células responden de manera diferente a cambios sutiles en las señales topográficas (tamaño y forma).

10. CONCLUSIONES

Se lograron aislar y cultivar fibroblastos humanos de tejido remanente de cirugías de circuncisión y abdominoplastías, una vez expandidas las células se logró estandarizar el método de siembra de fibroblastos sobre un AHR, obteniendo así constructos viables formados por AHR-fibroblastos , aislados de dos tejidos diferentes.

Una vez realizado el inmunofenotipaje de los constructos se puede afirmar que el AHR reduce la presencia de la población con fenotipo de miofibroblasto así como también se encuentra favoreciendo la proliferación de los fibroblastos sembrados en este andamio. Por lo que las dos poblaciones son aptas para el desarrollo de un constructo heterólogo de AHR-fibroblastos.

11. REFERENCIAS

1. Haake A, Scott GA, Holbrook KA. (2001). Structure and Function of the Skin: Overview of the Epidermis and Dermis. *The Biology of the Skin, Freinkel RK, Woodley, DT. eds. Parthenon Publishing: New York, 19-45.*
2. Zeng, Q., Macri, L. K., Prasad, A., *et al.* (2011). Skin tissue engineering. *Comprehensive Biomaterials, P. Ducheyne, K. Healy, DE Hutmacher, DW Grainger, and CJ Kirkpatrick, eds., Elsevier, Philadelphia, PA, 467-499.*
3. <http://www.ec-europe.com/es/ilustracion-medica/dermatologia/>
4. Stewart, K. J. (1995). A quantitative ultrastructural study of collagen fibrils in human skin normal scars, and hypertrophic scars. *Clinical Anatomy, 8(5), 334-338.*
5. Cormack, D. H. (1987). The integumentary system. Ham's histology, 9th edn. Lippencott Company, Philadelphia, 450-474.
6. Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *Journal of cell science, 117(5), 667-675.*
7. Meigel, W. N., Gay, S., & Weber, L. (1977). Dermal architecture and collagen type distribution. *Archives of Dermatological Research, 259(1), 1-10.*
8. Sriram, G., Bigliardi, P. L., & Bigliardi-Qi, M. (2015). Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro. *European journal of cell biology, 94(11), 483-512.*
9. Jahoda, C. A., & Reynolds, A. J. (1996). Dermal-epidermal interactions: adult follicle-derived cell populations and hair growth. *Dermatologic clinics, 14(4), 573-583.*
10. Houzelstein, D., Chéraud, Y., Auda-Boucher, G., *et al.* (2000). The expression of the homeobox gene Msx1 reveals two populations of dermal progenitor cells originating from the somites. *Development, 127(10), 2155-2164.*
11. Scaal, M., & Christ, B. (2004). Formation and differentiation of the avian dermomyotome. *Anatomy and embryology, 208(6), 411-424.*
12. Christ, B., & Scaal, M. (2008). Formation and differentiation of avian somite derivatives. In *Somitogenesis* (pp. 1-41). Springer New York.
13. Le Lièvre, C. S., & Le Douarin, N. M. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *Development, 34(1), 125-154.*
14. Wong, C. E., Paratore, C., Dours-Zimmermann, M. T., *et al.* (2006). Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *The Journal of cell biology, 175(6), 1005-1015.*
15. Ohtola, J., Myers, J., Akhtar-Zaidi, B., *et al.* (2008). β -Catenin has sequential roles in the survival and specification of ventral dermis. *Development, 135(13), 2321-2329.*
16. Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2009). Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *International review of cell and molecular biology, 276, 161-214.*
17. Gabbiani, G., Ryan, G. B., & Majno, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia, 27(5), 549-550.*
18. Desmoulière, A., Darby, I. A., & Gabbiani, G. (2003). Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Laboratory Investigation, 83(12), 1689-1707.*
19. Eyden, B. (2005). The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. part 2-tumours and tumour-like lesions. *Journal of submicroscopic cytology and pathology, 37(3-4), 231-296.*

20. Darby, I. A., & Hewitson, T. D. (2007). Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *International review of cytology*, 257, 143-179.
21. Tsujino, T., Seshimo, I., Yamamoto, H., *et al.* (2007). Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 13(7), 2082-2090.
22. Hinz, B. (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 526-537.
23. Sandbo, N., & Dulin, N. (2011). Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function. *Translational Research*, 158(4), 181-196.
24. Ramos, A.C., Becerril-Becorral, C., Cisneros-Lira, J.G., & Montaña-Ramírez, M. (2004). El miofibroblasto, una célula multifuncional en la patología pulmonar. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(3), 215-231.
25. Serini, G., Bochaton-Piallat, M. L., Ropraz, P., *et al.* (1998). The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1. *The Journal of cell biology*, 142(3), 873-881.
26. Benzonana, G., Skalli, O., & Gabbiani, G. (1988). Correlation between the distribution of smooth muscle or non muscle myosins and α -smooth muscle actin in normal and pathological soft tissues. *Cell motility and the cytoskeleton*, 11(4), 260-274.
27. Eyden, B. P. (2007). The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. part 2-tumours and tumour-like lesions. *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 3.
28. Van der Loop, F. T., Schaart, G., Timmer, E. D., Ramaekers, F. C., & Van Eys, G. J. (1996). Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology*, 134(2), 401-411.
29. Dugina, V., Fontao, L., Chaponnier, C., Vasiliev, J., & Gabbiani, G. (2001). Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *Journal of cell science*, 114(18), 3285-3296.
30. Goffin, J. M., Pittet, P., Csucs, G., Lussi, J. W., Meister, J. J., & Hinz, B. (2006). Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of α -smooth muscle actin to stress fibers. *The Journal of cell biology*, 172(2), 259-268.
31. Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10), 738-746.
32. Seifert, A. W., & Maden, M. (2014). New insights into vertebrate skin regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol*, 310, 129-169.
33. Wietecha, M. S., & DiPietro, L. A. (2013). Therapeutic approaches to the regulation of wound angiogenesis. *Advances in wound care*, 2(3), 81-86.
34. Hinz, B., & Gabbiani, G. (2003). Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*, 90(6), 993-1002.
35. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(5), 349-363.
36. Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7, 301.
37. Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circulation research*, 92(8), 827-839.
38. Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I., & Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology*, 146(1), 56.

39. Higashiyama, R., Nakao, S., Shibusawa, Y., *et al.* (2011). Differential contribution of dermal resident and bone marrow–derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(2), 529-536.
40. Driskell, R. R., Lichtenberger, B. M., Hoste, E., *et al.* (2013). Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, 504(7479), 277-281.
41. Hinz, B. (2010). The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *Journal of biomechanics*, 43(1), 146-155.
42. Aarabi, S., Bhatt, K. A., Shi, Y., *et al.* (2007). Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *The FASEB Journal*, 21(12), 3250-3261.
43. Wang, J., Chen, H., Seth, A., & McCulloch, C. A. (2003). Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(5), H1871-81.
44. Leask, A., & Abraham, D. J. (2004). TGF- β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18(7), 816-827.
45. Bing, Z., Xian, L., Chunfen, W., *et al.* (2015). Bioengineering skin constructs. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences, A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Songtao, and M. Ramalingam, eds., Elsevier, Philadelphia, PA*, 703-719.
46. Wilshaw, S. P., Kearney, J. N., Fisher, J., & Ingham, E. (2006). Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue engineering*, 12(8), 2117-2129.
47. Fairbairn, N. G., Randolph, M. A., & Redmond, R. W. (2014). The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 67(5), 662-675.
48. Jin, C. Z., Park, S. R., Choi, B. H., *et al.* (2007). Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair. *Tissue engineering*, 13(4), 693-702.
49. Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., *et al.* (2008). Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater*, 15, 88-99.
50. Martínez-Pardo, M. E., & Reyes-Frías, M. L. (2003). The tissue bank at the National Nuclear Research Institute in Mexico. *Cell and tissue banking*, 4(2-4), 163-168.
51. Martínez-Pardo, M. E., & Mariano-Magaña, D. (2007). The tissue bank at the Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares: ISO 9001: 2000 certification of its quality management system. *Cell and tissue banking*, 8(3), 221-231.
52. Rocha SCM, Baptista CJM. Biochemical properties of amniotic membrane. In: Mamede AC, Botelho MF, eds. Amniotic Membrane. The Netherlands: Springer, 2015;19– 40.
53. Guo, Q., Lu, X., Xue, Y., Zheng, H., Zhao, X., & Zhao, H. (2012). A new candidate substrate for cell-matrix adhesion study: the acellular human amniotic matrix. *BioMed Research International*, 2012.
54. Mahmoudi–Rad, M., Abolhasani, E., Moravvej, H., Mahmoudi–Rad, N., & Mirdamadi, Y. (2013). Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation. *Clinical and experimental dermatology*, 38(6), 646-651.
55. Guo, X., Kaplunovsky, A., Zaka, R., Wang, C., Rana, H., Turner, J., ... & Smiell, J. M. (2016). Modulation of Cell Attachment, Proliferation, and Angiogenesis by Decellularized, Dehydrated Human Amniotic Membrane in In Vitro Models. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*.
56. <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>
57. <http://www.uchile.cl/portal/investigacion/centro-interdisciplinario-de-estudios-en-bioetica/documentos/76252/pautas-internacionales-para-la-evaluacion-etica>
58. https://www.biomedicas.unam.mx/_administracion/reglamentos.../CodigoIIBO

59. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5226005&fecha=21/12/2011
60. www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/LEY_GENERAL_DE_SALUD.pdf
61. Wang, H., Van Blitterswijk, C. A., Bertrand-De Haas, M., Schuurman, A. H., & Lamme, E. N. (2003). Improved enzymatic isolation of fibroblasts for the creation of autologous skin substitutes. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 40(8-9), 268-277.
62. Tamm, I., Kikuchi, T., Wang, E., & Pfeffer, L. M. (1984). Growth rate of control and β -interferon-treated human fibroblast populations over the course of their in vitro life span. *Cancer research*, 44(6), 2291-2296.
63. Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., *et al.* (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 10114-10118.
64. Douay, L. (2001). Experimental culture conditions are critical for ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Journal of hematology & stem cell research*, 10(3), 341-346.
65. Ramirez, R. D., Morales, C. P., Herbert, B. S., *et al.* (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes & development*, 15(4), 398-403.
66. Davis, J. S. (1910). Skin transplantation. *Johns Hopkins Hospital Reports*, 15, 307-96.
67. De Rott, A. (1940). Plastic repair of conjunctival defects with fetal membranes. *Archive Ophthalmology*, 23(3), 522-525.
68. Fernandes, M., Sridhar, M. S., Sangwan, V. S., & Rao, G. N. (2005). Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea*, 24(6), 643-653.
69. Yang, L., Shirakata, Y., Tokumaru, S., *et al.* (2009). Living skin equivalents constructed using human amnions as a matrix. *Journal of dermatological science*, 56(3), 188-195.
70. Moulin, V., Auger, F. A., Garrel, D., & Germain, L. (2000). Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. *Burns*, 26(1), 3-12.
71. Shin, S. I., Freedman, V. H., Risser, R., & Pollack, R. (1975). Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(11), 4435-4439.
72. Clyman, R. I., McDonald, K. A., & Kramer, R. H. (1990). Integrin receptors on aortic smooth muscle cells mediate adhesion to fibronectin, laminin, and collagen. *Circulation research*, 67(1), 175-186.
73. Sottile, J., Hocking, D. C., & Swiatek, P. J. (1998). Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth. *Journal of Cell Science*, 111(19), 2933-2943.
74. Kloczko, E., Nikkhah, D., & Yildirimer, L. (2015). Scaffolds for hand tissue engineering: the importance of surface topography. *Journal of Hand Surgery (European Volume)*, 1753193415571308.
75. Dickinson, L. E., Rand, D. R., Tsao, J., Eberle, W., & Gerecht, S. (2012). Endothelial cell responses to micropillar substrates of varying dimensions and stiffness. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(6), 1457-1466.
76. Chen, W., Villa-Diaz, L. G., Sun, Y., *et al.* (2012). Nanotopography influences adhesion, spreading, and self-renewal of human embryonic stem cells. *ACS nano*, 6(5), 4094-4103.
77. Chen, W., Sun, Y., & Fu, J. (2013). Microfabricated Nanotopological Surfaces for Study of Adhesion-Dependent Cell Mechanosensitivity. *Small*, 9(1), 81-89.
78. Pelham, R. J., & Wang, Y. L. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(25), 13661-13665.
79. Sunyer, R., Jin, A. J., Nossal, R., & Sackett, D. L. (2012). Fabrication of hydrogels with steep stiffness gradients for studying cell mechanical response. *PLoS one*, 7(10), e46107.

80. Ravichandran, R., Venugopal, J. R., Sundarajan, S., Mukherjee, S., & Ramakrishna, S. (2013). Cardiogenic differentiation of mesenchymal stem cells on elastomeric poly (glycerol sebacate)/collagen core/shell fibers. *World J Cardiol*, 5(3), 28-41.