

Estandarización de un método para la elaboración de un análogo de dermis humana

*Silvia Pérez**

*Adriana Doncel**

*Carmen Lucía Roa***

*Marta Raquel Fontanilla**

Resumen

El trabajo que presentamos describe la elaboración de un análogo vivo de dermis humana y su caracterización histoquímica. Los resultados indican que soportes elaborados a partir de una solución de colágeno con concentración 0.05 mg/mL, permiten la formación de grupos celulares densos con abundante matriz eosinófila entre las células. Estas exhiben morfología fusiforme, citoplasma eosinófilo y núcleos basófilos. Los agregados celulares contienen más de 150 células por campo de alto poder, las cuales generalmente están dispuestas en focos nodulares.

Palabras clave: Ingeniería tisular - Matriz extracelular - Mallas - Pseudodermis - Fibroblastos - Colágeno.

Abstract

The work presented here describes the elaboration of a live dermal analogous and its histochemical characterization. The results indicate that matrices elaborated from 0.05 mg/ml collagen solution allowed the formation of dense cellular groups with more than 150 cells per high power field (40 X). Furthermore, a wide eosinophilic matrix was formed between them. Basophilic nuclei and spindle like eosinophilic cytoplasm were also seen.

Key words: Tissue engenierring - Extracellular matrix - Scaffolds - Pseudodermis - Fibroblastes - Collagene

Recibido para su publicación: 24 de junio de 2000

Aprobada su publicación: 20 de agosto de 2000

* Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia.

** Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Medicina Universidad El Bosque.

Introducción

En Colombia la incidencia de lesiones crónicas y agudas de la piel, como úlceras y quemaduras de distintos grados, puede ser relativamente alta. Por ejemplo, solo en la capital de la república en el año 2000 el Hospital Simón Bolívar,

que atiende el 90% de los quemados de Bogotá, D.C., recibió 475 pacientes quemados (Comunicación personal, Dra. Patricia Gutiérrez de Reyes, coordinadora Departamento de Quemados del Hospital Simón Bolívar), mientras que el Hospital Militar atendió 600 casos de úlceras venosas con diferentes grados de complejidad.

En las últimas décadas, diferentes grupos de investigación han adelantado trabajos dirigidos a desarrollar piel artificial viva que pueda servir como injerto permanente cuando la piel autóloga es escasa. Los primeros cultivos de células aisladas de la piel se remontan a mediados de la década de los 70s cuando la estandarización del método de elaboración de láminas de queratinocitos cultivados (1), permitió el uso de cultivos autólogos para cubrir heridas profundas. Desafortunadamente, la experiencia ha demostrado que la epidermis sola no provee un equivalente de piel apropiado y que se necesita el efecto epitelializante de la dermis. Por esta razón, y teniendo en cuenta que la capacidad de regeneración de la piel es inversamente proporcional a la profundidad de la herida, la mayoría de los reemplazos elaborados *in vitro* poseen pseudodermis (2). En los sustitutos artificiales de la piel desarrollados se observan dos modelos principales: (a) equivalente dérmico acelular sobre el que se coloca provisionalmente una dermis sintética elaborada con caucho siliconado, de uso temporal (3), (b) tejido celular artificial constituido por dermis y epidermis que se aplica de manera permanente (4).

En el primer tipo de reemplazos, colágeno mezclado con un glicosaminoglicano (condroitin-6-sulfato) y entrecruzado con glutaraldehído, se emplea para desarrollar una matriz acelular de porosidad uniforme y grosor apropiado, con la cara superior cubierta por una capa de caucho siliconado. Este sustituto de piel, conocido con el nombre de Integra®, ha sido estudiado en humanos (5-7) y fue aprobado para su uso en pacientes quemados en 1997 (2). Entre las ventajas observadas al ser utilizado este producto se encuentran:

promoción de la reparación temprana y estimulación de la formación de neodermis a partir de células autólogas, lo cual hace innecesario el empleo de autoinjertos.

En el segundo tipo de reemplazos, el tejido artificial desarrollado esta conformado por epidermis y dermis vivas. En este producto, los fibroblastos sembrados en la matriz de colágeno proliferan y reorganizan su entorno, contrayendo la malla y convirtiéndola en una mezcla de células, colágeno exógeno y proteínas de matriz sintetizadas de novo, que resulta en un equivalente dérmico. Posteriormente, sobre este equivalente se siembran queratinocitos para promover *in vitro* el desarrollo de epitelio. Uno de los productos comerciales de este tipo, Apligraf®, fue aprobado recientemente para ser usado en el tratamiento de úlceras venosas crónicas (8) ya que promueve una reparación temprana y eficiente (9,10).

Teniendo en cuenta que el mejor injerto es el autoinjerto y que es posible con células autólogas elaborarlo *in vitro*, nuestro grupo propuso como objetivo de este trabajo desarrollar una dermis artificial que permita el crecimiento de fibroblastos de piel humanos previamente cultivados *in vitro*. Con tal fin, inicialmente se estandarizaron las condiciones de aislamiento y cultivo de fibroblastos aislados de piel; posteriormente, se estableció el procedimiento de elaboración de matrices de colágeno y las condiciones de cultivo de las células sobre éstas, finalmente se determinaron las características histológicas del tejido obtenido.

Materiales y métodos

Toma de muestras y aislamiento de los fibroblastos

Las muestras fueron pieles completas (epidermis, dermis e hipodermis), normalmente

desechadas durante procedimientos quirúrgicos, obtenidas de pacientes jóvenes (menores de 30 años) y sanos. Para eliminar sangre y tejido adiposo, los tejidos fueron lavados dos veces con solución salina de Puck's (0.14 M NaCl, 5.4 mM KCl, 1.1 mM KH_2PO_4 , 1.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.1 mM glucosa) suplementada con antibióticos (pen/ strep). Posteriormente, éstas se fragmentaron en pequeños segmentos (explantes), que fueron incubados a 37°C en atmósfera húmeda (95% aire y 5 % de CO_2) con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Life technologies, Grand Island, NY, USA), antibióticos (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA, USA), aminoácidos no esenciales 10 mM (Life Technologies, Long Island, NY, USA), piruvato de sodio 100 mM (Life Technologies, Long Island, NY, USA) y vitaminas (Sigma Chemical Co., ST. Louis, MO, USA).

Para realizar los subcultivos, cuando las células alcanzaron la confluencia el medio fue removido y sus trazas eliminadas mediante dos lavados con solución salina Puck's. Posteriormente, los cultivos fueron digeridos por 10 minutos a 37 °C con tripsina al 0.1% en solución Puck's. Luego, se agregó un volumen igual de DMEM suplementado con 10% SFB para inactivar la enzima y el contenido total del frasco se centrifugó a 6000 x g por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado, el pellet resuspendido en 1 mL de DMEM suplementado y la viabilidad de las células fue establecida con una tinción vital (rojo de eritrosina B, ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA, USA). Por último, la suspensión fue sembrada a una densidad de 5×10^5 células/ frasco de cultivo (T, Corning) e incubada en las condiciones descritas anteriormente.

Elaboración de la matriz de colágeno

El colágeno fue aislado a partir de tendones de colas de rata siguiendo el procedimiento descrito por Bell et al., (11). Los tendones aislados se cortaron en fragmentos y se colocaron en una solución de ácido acético 1:1000, la cual se mantuvo a 4°C por cinco días. Para precipitar el colágeno, la suspensión se centrifugó y el sobrenadante fue tratado con NaOH 0.1 M. Soluciones de colágeno (0.05mg/mL) fueron empleadas para elaborar las matrices siguiendo el procedimiento descrito por Maruguchi *et. al.* (12) con algunas modificaciones. Brevemente, 20 mL de las soluciones de colágeno homogenizadas se vertieron en moldes que se colocaron a -20 °C. Las muestras fueron liofilizadas, mantenidas a 105 °C por 24 horas, entrecruzadas con glutaraldehído 0.02% por 24 horas a 4 °C y esterilizadas.

Siembra de fibroblastos sobre la matriz de colágeno

Fibroblastos de segundo o tercer pasaje (1×10^6 células/plato de 35 mm) fueron empleados en la inoculación de las matrices de colágeno, las cuales fueron incubadas por dos semanas con cambio diario de medio de cultivo.

Caracterización histoquímica del análogo de dermis

Las matrices sembradas con fibroblastos fueron tomadas a las dos semanas y fijadas con formaldehído al 10% (70, 95 y 100%). Mediante soluciones crecientes de alcohol fueron deshidratadas y embebidas con parafina para constituir bloques que fueron cortados en láminas de 5µm de espesor y sometidas a tinción con hematoxilina-eosina (HE) convencional y Azul Alcían (13).

Resultados

Estandarización del método de aislamiento y cultivo de fibroblastos

El método de aislamiento de fibroblastos a partir de explantes totales (dermis y epidermis) no digeridos con enzimas, permite el desarrollo de cultivos primarios con células que exhiben morfología de fibroblastos, las cuales adquieren confluencia a los 20 días. Las

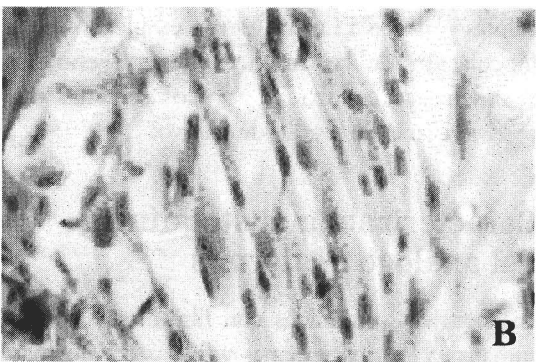
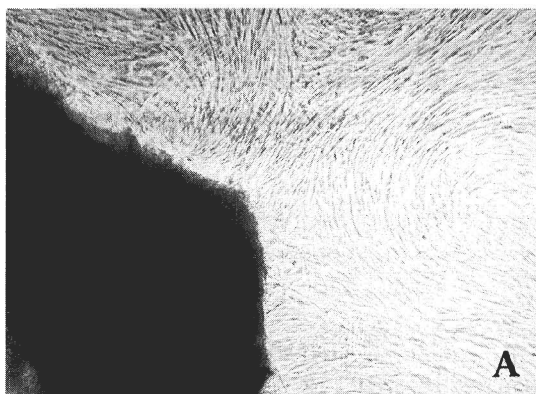


Figura 1. (A) Fibroblastos obtenidos a partir de explantes no digeridos, fueron crecidos por veinte días hasta alcanzar confluencia. La fotografía presentada en la figura, muestra la apariencia de las células bajo el microscopio de luz invertido con aumento 10X. (B) Fibroblastos dérmicos obtenidos a partir de explantes no digeridos (20 días), teñidos con hematoxilina-eosina y observados con aumento 40X

características de las células se pueden observar en las Figuras 1a y 1b. Como se puede apreciar, en general presentan morfología fusiforme característica de fibroblastos y se encuentran nucleadas. Aunque se aprecian algunas células con otras morfologías, éstas también han sido descritas como características en cultivos primarios de fibroblastos (14-16).

Elaboración de la matriz de colágeno

Las propiedades físicas de las matrices de colágeno (0.05 mg/mL) se describen en la tabla 1. La apariencia de las mismas se registra en la fotografía mostrada en la figura 2; como se puede observar, la matriz elaborada es una estructura tridimensional porosa, de apariencia esponjosa.

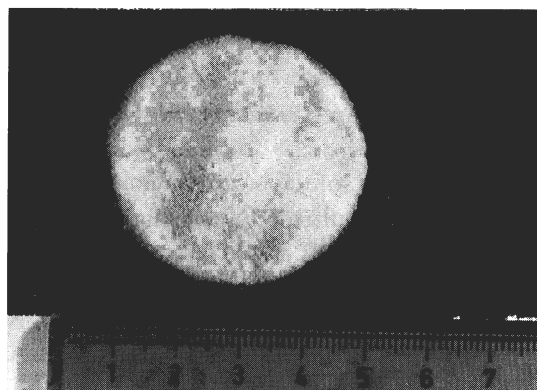


Figura 2. Aspecto de la malla de colágeno obtenida a partir de una solución 0.05 mg/mL de acuerdo a lo descrito en la sección Materiales y métodos.

Siembra de fibroblastos en la matriz de colágeno

Fibroblastos de segundo o tercer pasaje fueron sembrados en la matriz de colágeno, en condiciones que permitieron su penetración dentro de los



Fibra de colágeno

Figura 3. Fibroblastos ordenándose en la matriz después de ocho días de cultivo. Observe la adherencia de las células a las fibras de colágeno. Aumento 40X.

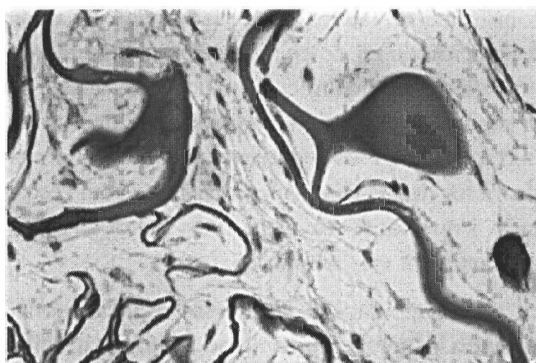


Figura 4. Matriz extracelular producida *in vitro* por los fibroblastos cultivados durante dos semanas. Corte histológico teñido con (H&E) Aumento 40X.

poros de la misma. Imágenes representativas de cortes transversales, teñidos con hematoxilina-eosina, de las matrices sembradas y cultivadas durante una y dos semanas respectivamente, se presentan en las Figuras 3 y 4. Como se puede observar en las figuras, los fibroblastos exhiben adherencia e incorporación a las fibras de colágeno en las dos condiciones. Así, localizados sobre la superficie y entre las fibras intensamente eosinófilas de la malla de colágeno se observan células nucleadas y con morfología de fibroblastos. Es importante resaltar la reorganización de la matriz de colágeno inducida por las células para crear una estructura muy similar a la dermis humana (Figura 4).



Figura 5. (A) Corte histológico de dermis humana teñido con Azul Alcian aumento 40x. (B) Corte histológico del análogo dermal de dos semanas de cultivo teñido con Azul Alcian aumento 40x. Como se puede observar en la figura, las células cultivadas son capaces de reorganizar la matriz extracelular artificial, produciendo una estructura histológicamente similar a la dermis humana.

Con el propósito de comprobar que las células sembradas en las mallas efectivamente están sintetizando su propia matriz y modificando el entorno, se realizó tinción con Azul Alcian sobre los cortes histológicos de dermis humana y del análogo dermal elaborado por nosotros. Con esta tinción, específica para glicosaminoglicanos, tanto en el control como en la dermis artificial se evidenciaron fibras que tienen positivo (Figura 5A y 5B). La importancia de este experimento, radica en que la matriz elaborada en el laboratorio fue manufacturada únicamente con colágeno tipo I. Por lo tanto, una tinción positiva indica la formación de fibras con proteínas, probablemente proteoglicanos, que están siendo secretadas por las células sembradas.

En conjunto los resultados, resumidos en la Tabla 1, señalan la elaboración *in vitro* de un análogo de dermis humana. Sin embargo, es importante anotar que el crecimiento de los fibroblastos en la matriz algunas veces presentó morfología nodular. Nuevos experimentos, en los que se varían condiciones de inoculación y cultivo, se están llevando a cabo en nuestro laboratorio para solucionar este inconveniente.

Discusión

El propósito de este trabajo fue desarrollar dermis artificial usando fibroblastos aislados de piel humana y una matriz de colágeno tipo I. Con tal fin, estandarizamos un método de cultivo de fibroblastos aislados de piel, el procedimiento para aislar colágeno I a partir de tendones de cola de rata y la metodología para elaborar matrices a partir de él. Luego, establecimos una metodología para fabricar tejido cultivando fibroblastos de segundo o tercer pasaje sobre los soportes de colágeno. El estudio histoquímico de las matrices elaboradas señala la formación de tejido en este sistema. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios en donde se compare la expresión de proteínas de matriz extracelular en los tejidos vivos con la observada en los desarrollados *in vitro*. Este es un resultado importante en el camino de desarrollar piel artificial en Colombia.

La combinación de diversas técnicas reportadas en la literatura y la introducción de modificaciones a las mismas por parte nuestra, permitieron la estandarización de un método de cultivo de fibroblastos aislados de piel humana

Tabla 1 Resumen de los resultados obtenidos

ETAPA	RESULTADO
Elaboración de la matriz de colágeno	Buena flexibilidad, fácil manipulación, textura homogénea, porosidad, resistencia mecánica y estabilidad.
Aislamiento de fibroblastos dérmicos	Los explantes de piel total no digeridos con enzimas, permiten obtener cultivos confluentes de fibroblastos en 20 días.
Crecimiento de los fibroblastos en la matriz	Después de sembradas las células en la matriz y de la incubación, se observaron grupos celulares densos que se adhieren a la superficie de la matriz o se acomodan en ella y que exhiben síntesis de sustancia extracelular eosinofila y abundante. En algunos casos, el tejido desarrollado se dispuso nodularmente.

en matrices de colágeno. La vitalidad y la actividad metabólica de los fibroblastos es evidenciada por la existencia de células nucleadas y la producción de abundante matriz extracelular entre las células. El análisis histológico del análogo dermal indica formación de tejido, entre y en la superficie de las fibras, que algunas veces se dispone nodularmente impidiendo el recubrimiento y la acomodación total de los fibroblastos sembrados dentro y en toda la superficie de la matriz. Lo anterior puede generar dudas acerca de la capacidad del tejido desarrollado para rellenar amplias soluciones de continuidad en el paciente. Sin embargo, los resultados obtenidos son punto importante de partida para nuevas investigaciones en las que modificando los métodos de siembra de las células en la matriz y el tiempo de incubación de los cultivos tridimensionales, se logre el cubrimiento y la acomodación completa de los fibroblastos dentro de la matriz.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Banco de la República, proyecto No. 1218. Manifestamos nuestra gratitud a María Clemencia Zambrano por su colaboración técnica y excelentes sugerencias. Igualmente a Jaime Castellanos, Marlén Martínez y demás miembros del Laboratorio de Neurociencias del I.N.S, por su ayuda en la toma de fotografías y mantenimiento de los cultivos. Al doctor Pedro Morales del Instituto de Medicina Legal, por proporcionarnos muestras de piel. Finalmente, a los profesores Bibiana Vallejo y Diego Arias Henao del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, por el suministro de las colas de rata y los equipos de liofilización.

Referencias bibliográficas

1. H. Green and J. Reinwald. *Cell* **6**:331. (1975).
2. J.T. Schulz, R.G. Tompkins and J.F. Burke. *Annu. Rev. Med.* **51**:231(2000).
3. J.F. Burke, I.V. Yanas, W.C. Quinby. *Ann. Surg.* **194**:413 (1981).
4. E. Bell, HP. Ehrlich, DJ Buttle, T. Nakatsuji. *Science* **211**:1052 (1981).
5. R.G. Tompkins, J.F. Burke. *World J. Surg.*, **14**: 819 (1990).
6. D. Heimbach, A. Luterman, J. Burke. *Ann. Surg.* **208**: 313 (1988)
7. RL. Sheridan, M. Hegarty, RG. Tompkins, JF. Burke. *Eur. J. Plast. Surg.* **17**:91 (1994).
8. E. Epstein. *Arch. Dermatol.* **134**:1483-84. (1998)
9. WH. Eaglstein, V. Falanga. *Arch Dermatol.* **134**: 293 (1998).
10. RS. Kirsner. *J. Dermatol.* **25**: 805 (1998)
11. E. Bell, B. Ivarsson and C. Merrill. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(3): 1274 (1979)
12. T. Maruguchi, Y. Maruguchi. *Plast. Reconst. Surg.* **3**(3): 537 (1994).
13. F. Geneser. En: *Manual de histología*. Ed. Médica panamericana 1993. Introducción al estudio de la Histología. Pg.8.
14. P. Tomakidi., NE. Fusening, A Kohl, G. Komposch. *J. Periodont. Res.* **32**: 388. (1997)
15. A.R. Ten Cate. In: *Oral Histology: development, structure, and function*. A.R., pg: 347(1989).
16. G. Hillmann, A. Gebert, W. Geurtsen. *J. Cell Sci.* **112**: 2823. (1999).