

Cultivo de queratinocitos humanos *in vitro*

Drs. Gustavo Bello, Elizabeth Merentes, Francisco Arvelo

Cirugía Plástica y Reconstructiva del Hospital Carlos J Bello de la Cruz Roja Venezolana. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

La técnica del cultivo de queratinocitos puede considerarse como un arma irremplazable y una alternativa confiable para ser aplicada a pacientes con daño parcial o externo de su piel que ameriten sus propias células especializadas para su recuperación.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología propia para obtener monocapas de epidermis, para lo cual se obtuvieron muestras de piel procedentes de 7 pacientes sometidos a diferentes procedimientos de cirugía estética.

Mediante la dispasa tipo II (2,4 unid/ml) se logró una excelente separación de la epidermis de la dermis al obtener una lámina de epidermis libre de fibroblastos, evidenciado además en los cultivos primarios de las células epidermales, donde se observó el crecimiento celular de los queratinocitos libres de células dérmicas, cuando se cultivaron en el substrato de colágeno tipo I obtenido partir de la cola de la rata.

En los subcultivos se hizo una comparación de diferentes substratos - plástico, fibroblastos inhibidos con mitomicina C (4 µg/ml), substratos de colágeno y se observó un comportamiento similar de agregación y formación de monocapas entre 8-14 días de cultivo, a excepción de los queratinocitos subcultivados sobre plástico donde las células degeneraron en un tiempo corto.

También se analizaron subcultivos en presencia de geles de colágeno tipo I con medios condicionados y se apreció una mayor velocidad de crecimiento en los queratinocitos al igual que cuando se utilizaron fibroblastos inactivados.

*La obtención de monocapas de células epidérmicas se logró entre los 27 y 35 días después de haberse iniciado el cultivo, mediante hormona de crecimiento a una concentración de 2 µg/ml; se demostró diferenciación y estratificación de las monocapas de queratinocitos obtenidas *in vitro*.*

La metodología estudiada al ser efectiva será estandarizada con el fin de acortar el período de obtención de monocapas para la consiguiente aplicación como injerto en pacientes con lesiones extensas que ameriten

rápido tratamiento.

Palabras clave: Queratinocitos. Medio condicionado. Diferenciación.

SUMMARY

Cultured keratinocytes is a useful method on those patients who needs their own skin as part of treatment. We propose develop a personal methodology in orden to obtain a cultured epithelium. Dispase Type II (2.4 u/ml) was used to separate the dermo-epidermal junction with significant improvement on the purity.

Different support were studied, collagen type I from the tail of the rat was used as substrate for the keratinocyte cultured, showed an efficient rate growth.

Subcultured keratinocytes perfomed on collagen gel with conditioned medium reported high speed confluence the same as when feeder layer (inhibited with Mitomicine C) was used. The keratinocyte layer was obtained in a period of 27 to 35 days, the growth hormone was used at this time (2 µg/ml) of the culture showed a morphologically differentiated epidermis.

We propose to obtain a confluent epidermal sheet in a short time and to be used as a graft in the future.

Key words: Human keratinocyte. Conditioned medium. Differentiation.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre cultivos de piel se remotan a finales del siglo XIX (1), pero no fue sino hasta la década de los 60 del presente siglo cuando se logró el crecimiento de las células epidérmicas *in vitro*. Esto se hizo posible gracias al desarrollo de medios sintéticos químicamente definidos, de técnicas adecuadas de disgregación de tejidos y de la disponibilidad de substratos que reproducen las

condiciones en las cuales crecen *in vivo* (2).

Karasek y Charton (3) lograron que el tejido epidérmico disgregado con tripsina creciera sobre un sustrato de fibroblastos, y sugirieron que la presencia de elementos dérmicos era fundamental para el desarrollo de los cultivos. Estos autores también demostraron que estos requerían la presencia de factores inhibidores del crecimiento de fibroblastos y de factores que estimulen el crecimiento celular específico. Muchas han sido las técnicas de cultivo de queratinocitos desarrolladas en los últimos años con fines terapéuticos (4-7), a partir de las cuales se pueden obtener láminas de epidermis en períodos relativamente cortos, entre 20 a 22 días.

Un gran avance para la obtención del cultivo epidérmico fue la utilización del factor de crecimiento epidermal (EGF) (8,9) el cual resultó ser un potente estimulador del crecimiento celular *in vitro*; sin embargo, no es sino hasta 1981 cuando O'Connor y col. (10) lograron realizar un implante de piel humana obtenida *in vitro* y proveniente del mismo paciente (homoinjerto).

El desarrollo de esta técnica ha sido de gran trascendencia, tanto desde el punto de vista básico como aplicado, y se presenta como una alternativa confiable para aquellos pacientes que ameriten su propia piel para su recuperación. Es considerada hoy en día como una técnica irremplazable (11).

El objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología propia para obtener láminas de epidermis que nos permitan, en un futuro inmediato aplicarla con fines terapéuticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología usada para el cultivo de queratinocitos humanos *in vitro* fue la descrita por Rheinwald y Green (8), con algunas modificaciones. La técnica se basa en cultivar las células epidérmicas sobre monocapas de fibroblastos embrionarios inactivados de ratón y en la utilización de medios de cultivo suplementados con diversos factores biológicos que estimulen la proliferación y diferenciación celular *in vitro*.

Se utilizó el medio de cultivo Dulbecco's y el Ham F12 mezclados en una proporción 3 a 1, respectivamente, el cual fue suplementado con 10% de suero fetal de bovino, hidrocortisona (0,5 µg/ml), insulina (0,5 µg/ml), triiodotironina (2×10^{-9} M), toxina de cólera (0,1 nM), adenina $1,8 \times 10^{-4}$ M), factor de

crecimiento epidermal (10 ng/ml) y transferrina humana (10 ng/ml).

Las muestras de piel humana fueron obtenidas a partir de actos de cirugías estéticas practicadas a 7 pacientes intervenidos en el Hospital Carlos J Bello de la Cruz Roja Venezolana (Cuadro 1). Las muestras cutáneas fueron colocadas inmediatamente en solución salina balanceada (PBS) que contiene doble concentración de antibióticos (penicilina G; 100 u/ml, gentamicina; 50 µg/ml) y antimicóticos (anfotericina B; 10 µg/ml) y transportadas en hielo al laboratorio para su procesamiento.

Cuadro 1

Obtención de las muestras de piel humana

Paciente	Procedimiento quirúrgico	Edad
1	Blefaroplastia	35 años
2	Otoplastia	13 años
3	Mamoplastia	36 años
4	Mamoplastia	28 años
5	Abdominoplastia	35 años
6	Blefaroplastia	40 años
7	Otoplastia	7 años

Para la separación de la epidermis de la dermis se colocaron las muestras en una solución de dispasa tipo II (2,4 unid/ml) durante 18 horas a 4°C, para posteriormente hacer la separación, la cual es llevada a cabo manualmente mediante la utilización de pinzas para microcirugía (12). La epidermis así separada fue cortada en fragmentos pequeños y colocada en una solución de tripsina-EDTA (0,13%, 0,02%) para ser sometida a tripsinación fraccionada con agitación continua de 30 minutos a 37°C, recogiendo cada fracción cada 15 minutos. Con este tratamiento se logró separar y obtener un elevado porcentaje de células epidérmicas.

La viabilidad celular se determinó mediante el método del azul de tripano. Los queratinocitos obtenidos fueron sembrados en frascos plásticos de 25 cm² (2,3 células/frasco) que contenían geles de colágeno tipo I. Los cultivos fueron incubados en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ a 37°C.

Una vez que los cultivos primarios alcanzaron la semi-confluencia se procedió a realizar los subcultivos. La suspensión celular obtenida se sembró en diferentes sustratos: fibroblastos embrionarios y dérmicos previamente inactivados con mitomicina C, geles de colágeno tipo I, plástico.

Adicionalmente, se compararon los cultivos crecidos en fibroblastos dérmicos y los cultivos sembrados en geles de colágeno y medio condicionado. Este último fue obtenido de los cultivos primarios y secundarios de fibroblastos en crecimiento, el cual fue filtrado y utilizado en una proporción 2:1 (medio nutritivo y medio condicionado). El medio condicionado contiene factores liberados por las células, los cuales estimulan el crecimiento celular.

Una vez alcanzada la confluencia de las monocapas de células de los cultivos secundarios provenientes del paciente 2, se les agregó la hormona de crecimiento (HC) con el fin de lograr la confluencia y diferenciación celular a una dosis de 2 µg/ml, cuya concentración fue tomada en base a las experiencias de esta hormona in vivo.

RESULTADOS

Los análisis histológicos demostraron que la separación de la epidermis y de la dermis con la dispa tipo II fue excelente, al obtener una lámina de epidermis libre de fibroblastos (Figura 1).

Además, el crecimiento celular de los queratinocitos, cultivados en el sustrato de colágeno tipo I, evidenció un crecimiento de las células epidérmicas libres de células dérmicas.

Inicialmente, en los cultivos primarios se observaron células aisladas, las cuales, posteriormente, se agrupan y forman colonias de queratinocitos entre el séptimo y décimo día (Figura 2).

En los subcultivos se observó un crecimiento similar al descrito para los cultivos primarios y según el sustrato utilizado se pudo apreciar lo siguiente:

- a. En los subcultivos en sustrato de colágeno tipo I, se observó confluencia, agregación y formación de monocapas. Este proceso podía ser acelerado cuando se añadía medio condicionado de fibroblastos, evidenciado por una mayor proliferación celular.
- b. En los subcultivos realizados en sustrato donde se utilizó la monocapa de fibroblastos inhibidos con la mitomicina, se observó un comportamiento similar a las observadas en las capas de colágeno con medios condicionados.
- c. Los subcultivos de queratinocitos sembrados directamente en el plástico, manifestaron un porcentaje de adhesión bajo y las células degeneraron en un tiempo muy corto (3 días).

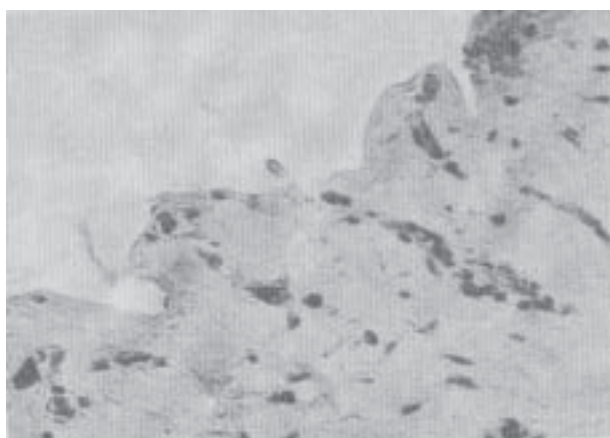
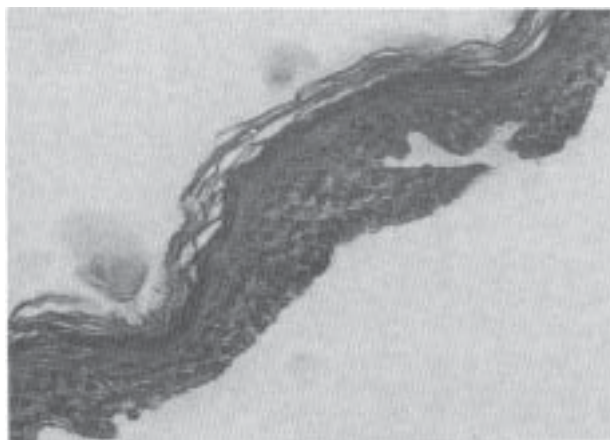


Figura 1a. Estrato epidérmico con su membrana basal separado por la acción de la dispa. b. Estrato dérmico aislado. Coloración hematoxilina-eosina. 100x.

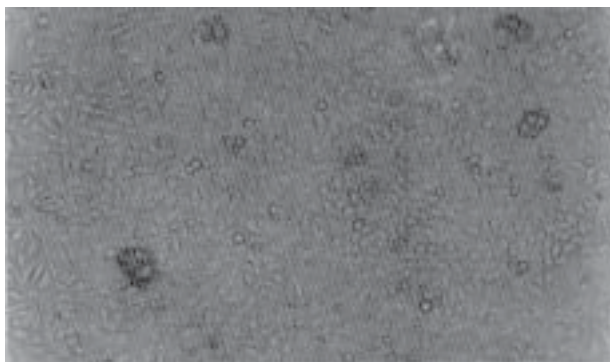


Figura 2. Cultivo primario de queratinocitos al décimo día en geles de colágeno tipo I. 40x.

La proliferación celular, de los grupos celulares de las muestras provenientes de pacientes jóvenes (muestras 2 y 7), obtenidas de otoplastias, fue más activa y se pudieron observar monocapas confluentes

para el día 25 en comparación con los demás grupos de edad y de la piel tomada de blefaroplastia y abdominoplastias, las cuales presentaron un crecimiento intermedio entre 27 a 35 días. Las muestras de tejido mamario presentaron un crecimiento reducido al compararlos con otros tejidos.

En los subcultivos de queratinocitos en presencia de la hormona de crecimiento (HC) se pudo observar la maduración de los queratinocitos, estratificación e inclusive cornificación (Figura 3), así como también la presencia de células tipo melanocitos.

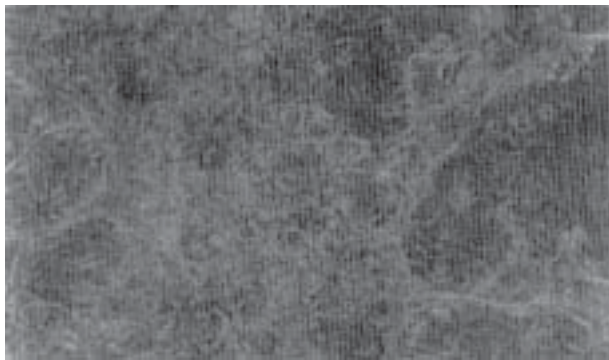


Figura 3. Monocapa de queratinocitos con áreas de estratificación bajo la acción de la hormona de crecimiento. 40x.

DISCUSIÓN

Los cultivos de queratinocitos *in vitro* han sido utilizados ampliamente en biomedicina, tanto para recubrimiento cutáneo con amplias aplicaciones clínicas —lesiones y reconstrucción por tratamiento (11)—, como en el tratamiento de pacientes con tumores.

Aunque han sido muchos los métodos propuestos con el fin de cultivar y mejorar el crecimiento celular, la finalidad de nuestra investigación fue desarrollar una metodología propia, adaptada a nuestro sistema.

El método inicial de Rheinwald y Green (8) sugería la disgregación de la piel con la tripsina y obtenía al final de la suspensión disgregada, un 10% de componentes dérmicos; los fibroblatos presentes usualmente son indeseados, ya que su crecimiento interfiere con el crecimiento de los queratinocitos (13); era por lo tanto ideal, remover la dermis antes de la disociación de la epidermis y así evitar al

máximo la contaminación por dichas células. Muchas de las enzimas ensayadas (14), tales como la dispasa tipo II, permitieron una separación adecuada, al obtener un estrato epidérmico prácticamente puro.

En los cultivos primarios, sobre un sustrato de colágeno, se obtuvieron células epidérmicas libres de tejido dérmico, lo que sugiere la obtención de un cultivo prácticamente puro de queratinocitos, que mostraba además, la morfología característica de las células epiteliales. Estos resultados son similares a los reportados en la literatura (5-8) cuando se utilizaban otros tipos de sustrato.

Clásicamente, como sustrato para el crecimiento de este tipo de células, se han utilizado monocapas de la línea celular 3T3 irradiadas o fibroblastos provenientes de embriones de ratón o de la dermis humana inhibidos con mitomicina C (7,8).

Sin embargo, el cultivo sobre placas de colágeno tipo I, permitió un crecimiento celular óptimo y una conservación del mismo, por lo que se puede considerar éste, como un sustrato ideal alternativo en los cultivos primarios (15).

Después de la segunda semana se realizaron los cultivos secundarios (subcultivos), en la cual se estimula la proliferación celular hasta la inducción de las monocapas confluentes. Se observó un rápido crecimiento de unos 25 días para las muestras de pacientes jóvenes y de 32 días para el resto de las muestras. La morfología celular fue mantenida a través de los subcultivos, como fue constatado continuamente mediante la observación al microscopio invertido.

La utilización del sustrato de colágeno tipo I, más medio condicionado y el sustrato con fibroblastos humanos, demostró una equivalencia para el desarrollo de los cultivos, a diferencia de cuando los queratinocitos fueron cultivados directamente sobre el plástico, cuyo crecimiento fue lento y con degeneración celular subsecuente, lo que nos indica que los queratinocitos necesitan de un sustrato adecuado y específico para su crecimiento (3,15).

El tiempo de crecimiento con formación de colonias y el tiempo de confluencia celular están ligados a la capacidad intrínseca de la célula, además de condiciones de sustrato, nutrientes y factores hormonales tales como T3, hidrocortisona, toxina colérica y EGF (13,16,17).

A través de la utilización de medios condicionados por los mismos cultivos de queratinocitos y

de fibroblastos y como parte del medio nutritivo, se garantizaría la presencia de factores de crecimiento de queratinocitos tales como el EGF y el TGF (17) y de las células dérmicas, como el KGF (18), los cuales estimulan el proceso de división celular. Estos factores de crecimiento han demostrado ser determinantes, sobre todo el KGF, en los cultivos secundarios: actúan sobre la velocidad de crecimiento y confluencia de los queratinocitos (19).

En los cultivos secundarios se han utilizado medios ricos en calcio a una concentración de 0,08 mM (17,20) para lograr la diferenciación celular, ya que ésta es fundamental en las últimas etapas del cultivo, antes de su preservación o su utilización como injerto. La utilización de la hormona de crecimiento a dosis de 2 µg/ml demostró inducción de estratificación y cornificación de las monocapas, por lo que se añade una experiencia propia *in vitro* con esta hormona.

En base a los resultados obtenidos, la técnica ha demostrado ser exitosa para el cultivo de los queratinocitos, pero se requieren algunos cambios en ciertas condiciones de cultivo, que nos permitan obtener un cultivo de queratinocitos en un tiempo más corto, en comparación al obtenido en este estudio, que alcanzó un promedio de 28 días. Para ello, hemos empezado a ensayar con otros factores de crecimiento que puedan hacer posible dicho acortamiento en tiempo, como lo exigiría el uso de tales técnicas para el tratamiento urgente de pacientes quemados extensamente.

REFERENCIAS

1. Carrel A, Burrows MT. Cultivation of adult tissue and organs outside the body. *JAMA* 1910;55:1379-1380.
2. Andreassi L. History of keratinocyte cultivation. *Burns* 1992;18(Suppl 1):2-4.
3. Karasek M, Charlton ME. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. *J Invest Dermatol* 1971;56:205-210.
4. De Luca M, Cancedda R. Culture of human epithelium. *Burns* 1992;18(Suppl 1):5-10.
5. Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier L, Bouvard V, Auger FA. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 1993;19(2):99-104.
6. Hafemann B, Hettich R, Ensslen S, Kowol B, Zohlke A, Ebertr R, et al. Treatment of skin-defects using suspensions of *in vitro* cultured keratinocytes. *Burns* 1994;20(2):168-172.
7. Parenteau NL, Nolte CM, Bilbo P. Epidermis generated *in vitro*: Practical considerations and applications. *J Cell Biochem* 1991;45:245-251.
8. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-343.
9. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555-1558.
10. O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981;i:75-78.
11. Tanabe H, Kumaga N, Ishida H. Clinical application of cultured epithelial grafts in plastic surgery. *Plastic Surg* 1992;II.61-62.
12. Kitano Y, Okada N. Separation of the epidermal sheet by dispase. *Br J Dermatol* 1983;108:555-560.
13. Walsar C, Benathan M, Frank E. Thermolysing treatment: A new method for dermal epidermal separation. *Burns* 1989;92:78-81.
14. Raxworthy M, Confife W, Wood E. The influence of protease of the colony forming efficiency of human keratinocytes culture. *Bioch Soc Trans* 1987;15:5-19.
15. Suchi L, Marvin K. Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. *J Invest Dermatol* 1978;71:157-162.
16. Techini M, Ranzati C, Mol Cavati M. Cultured techniques for human keratinocytes. *Burns* 1992;(Suppl 1):11-15.
17. Noel-Hudson M, Dusse I, Collember M, Muriel M, Bonte F, Font M, Weiperre J. Human epidermis reconstructed and synthetic membrane influence of experimental conditions on terminal differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol* 1995;31:508-515.
18. Fuchs E. Epidermal differentiation. The bare essential. *J Cell Biol* 1990;111:2807-2814.
19. Fuchs E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci* 1993(Suppl 17):197-208.
20. Jhonson E, Meunier S, Roy C, Parentau N. Serial cultivation of normal human keratinocyte: a defined system for studying the regulation of growth and differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992;28A:429-435.