

Optimización del cultivo de queratinocitos humanos para el desarrollo de un modelo de piel artificial humana: alternativas celulares como capa alimentadora

Optimization of human keratinocyte culture to develop an artificial human skin model: cell alternatives as feeder layer of Advanced Therapies

Ana Fernández González^{1,3}, Antonio Manuel Lizana Moreno^{1,3}, María del Mar de Pablos Ramos^{1,3}, Antonio Ruiz García^{1,2,3}, Olga Espinosa Ibáñez^{1,3}, Natividad Fernández Porcel^{1,2,3}, Jorge Guerrero Calvo^{1,2,3}, Miguel Arrabal⁴, López-Carmona F.⁴, Salvador Arias-Santiago^{1,3}

¹ Unidad de Producción Celular e Ingeniería Tisular. Instituto de Investigación Biosanitaria ibs. GRANADA. Complejo Hospitalario Universitario de Granada. Granada, Spain

² ECAI Unidad de Calidad de la Unidad de Producción Celular e Ingeniería Tisular. Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA. Complejo Hospitalario Universitario de Granada. Granada, Spain

³ Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas

⁴ Unidad de Gestión Clínica de Urología. Complejo Hospitalario Universitario de Granada.

Resumen

Objetivos: En el presente estudio se persigue optimizar el cultivo de queratinocitos para desarrollar un modelo de piel artificial humana. Para ello, se utilizan como capa alimentadora células de origen humano: fibroblastos dérmicos humanos y células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo. Los resultados obtenidos se comparan con los fibroblastos 3T3, capa alimentadora de origen murino utilizada desde hace décadas.

Metodología: Se llevó a cabo un estudio experimental, utilizando células de origen humano y células de origen murino subletalmente irradiadas, como capa alimentadora para el establecimiento del cultivo de queratinocitos. Se evaluó la tasa de expansión celular y la tasa de duplicación en el pase celular de queratinocitos y en la recuperación celular final que se llevó a cabo a las 3 semanas de cultivo; así como el rendimiento celular y la viabilidad celular, que también se evaluaron en el procesamiento inicial.

Resultados: Los resultados determinan que los fibroblastos dérmicos humanos irradiados y las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo pueden actuar como capa alimentadora promoviendo la adhesión y la expansión celular de los queratinocitos. Los fibroblastos dérmicos humanos proporcionan resultados equiparables a los obtenidos con los fibroblastos 3T3 murinos.

Conclusiones: Los fibroblastos dérmicos humanos irradiados proporcionan una capa alimentadora funcional que permite la expansión in vitro de manera eficaz de los queratinocitos que se van a utilizar con fines clínicos para el desarrollo de un modelo de piel artificial humana.

Abstract

Purpose: This study aims to optimize keratinocyte culture to develop an artificial human skin model. For this purpose, human cells are used as feeder layer: human dermal fibroblasts and adipose derived mesenchymal stem cells. The results obtained are compared with 3T3 fibroblasts, murine feeder layer used for decades.

Methods: We conducted an experimental study using human and murine sub-lethally irradiated cells as feeder layer for the establishment of keratinocyte culture. Cell expansion rate and doubling rate were evaluated in the keratinocyte cell passage and in the final cell recovery (was carried out at 3 weeks). The yield and viability of keratinocytes were also evaluated in the initial processing.

Results: The results determine that irradiated human dermal fibroblasts and irradiated adipose derived mesenchymal stem cells can act as feeder layer promoting adhesion and expansion of keratinocytes. Human dermal fibroblasts provide comparable results to those obtained with murine 3T3 fibroblasts.

Conclusions: Irradiated human dermal fibroblasts provide a functional feeder layer which allows effectively in vitro expansion of keratinocytes to be used for clinical purposes for the development of an artificial human skin model.

Palabras clave: Piel artificial, Queratinocitos, Capa alimentadora, Fibroblastos 3T3, Fibroblastos dérmicos humanos, Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo

Keywords: Artificial skin, Keratinocytes, Feeder layer, 3T3 fibroblasts, Human dermal fibroblasts, Adipose derived mesenchymal stem cells

INTRODUCCIÓN:

La ingeniería tisular (1)(2) constituye un conjunto de técnicas y métodos que permiten diseñar y generar en el laboratorio sustitutos tisulares, tejidos artificiales o constructos de origen autólogo o alogénico a partir de células madre y biomateriales.

La piel (3) (4), es el mayor órgano funcional del cuerpo humano; cubre un área de 1,5 a 2 metros cuadrados en un adulto medio. La piel sana representa una barrera contra agresiones mecánicas, químicas, tóxicas, calor, frío, radiaciones UV y microorganismos patógenos. Además, la piel es esencial para el mantenimiento del equilibrio de fluidos corporales, el mantenimiento del equilibrio térmico y la transmisión de una gran cantidad de información externa que accede al organismo por el tacto, la presión, la temperatura y los receptores del dolor (5).

Desde fuera hacia dentro (6), se distinguen tres capas de tejido: epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis (7) es un epitelio plano poliestratificado y queratinizado que cubre la totalidad de la superficie corporal. Es la capa de la piel con mayor número de células y con una dinámica de recambio extraordinariamente grande. El componente celular más importante de la epidermis son los queratinocitos, que se distribuyen en varios estratos (basal, espinoso, granuloso y córneo) y que tienen capacidad para sintetizar queratina, proteína filamentosa con una función protectora.

La piel humana puede estar afectada por múltiples patologías y las lesiones pueden ser congénitas, traumáticas, inflamatorias o infecciosas. Por lo tanto, el desarrollo de un sustituto eficiente de piel humana es uno de los principales desafíos que enfrenta la ingeniería de tejidos.

Para generar un modelo de piel humana artificial (8)(9) (10), es necesario desarrollar un sustituto de estroma dérmico con fibroblastos humanos inmersos en su interior (11) y posteriormente, cultivar los queratinocitos en la parte superior (12)(13).

El principal limitante en el desarrollo de un modelo de piel humana autóloga para el tratamiento de quemaduras de gran extensión (14), es la obtención de un gran número de queratinocitos que formen parte de la capa epitelial.

Para la expansión de queratinocitos es necesario la utilización de células alimentadoras que actúen como *feeder*. Para su uso, la capacidad proliferativa de estas células debe ser inhibida por radiación. Sin embargo, estas células mantienen su actividad metabólica, produciendo los factores de crecimiento requeridos por los queratinocitos; siendo la función de esta capa alimentadora actuar como un soporte celular *in vitro*.

En el año 1975, Rheinwald y Green (15) establecieron el método estándar para la expansión de los queratinocitos humanos primarios en cultivo, mediante el uso de un *feeder* de fibroblastos 3T3 de ratón irradiados letalmente, que estimulan la adhesión y la proliferación de los queratinocitos.

La elección de una capa alimentadora de fibroblastos se presenta como la mejor opción para la expansión a gran escala de los queratinocitos de piel autóloga que se va a utilizar para el tratamiento de pacientes con quemaduras graves. En un contexto clínico, el uso de células de origen humano en lugar de una capa alimentadora de origen murino es necesaria para reducir el riesgo de introducir antígenos animales y virus desconocidos.

El objetivo de este trabajo, es comparar el rendimiento a tres semanas de tres líneas celulares que actúan como capa alimentadora en el cultivo de queratinocitos: los fibroblastos murinos 3T3, los fibroblastos dérmicos humanos y las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo.

METODOLOGÍA:

1. Obtención de células utilizadas como capa alimentadora: *feeder*

1.1 Fibroblastos 3T3 de origen murino:

Se utilizaron dos líneas celulares de fibroblastos 3T3 de origen murino, una perteneciente a la colección Europea (3T3 Swiss Albino, Sigma, Ref. 85022108-1V, Lote CB2657) y otra de la colección Americana (3T3 Swiss Albino, ATCC, CCL-92, 60770553) adquiridas por la Unidad de Producción Celular e Ingeniería Tisular (UPCIT) del Complejo Hospitalario Universitario de Granada. Ambas líneas de fibroblastos 3T3 se descongelaron y se expandieron con medio de cultivo específico para el cultivo de fibroblastos (MF): DMEM sin Rojo Fenol (Sigma), 10% Suero Fetal Bovino (Sigma), 1% de Glutamina 200 mM (Sigma) y Gentamicina 96 µg/ml (Normon). Se estableció un banco celular maestro (BCM) y un banco celular de trabajo (BCT).

1.2 Fibroblastos dérmicos humanos (FH):

Los fibroblastos dérmicos humanos (FH) se obtuvieron a partir de tejido dérmico de piel abdominal, sobrante de cirugías plásticas abdominales previo consentimiento informado del paciente en cumplimiento de los requisitos de donación de células y tejidos humanos (Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de Julio). El tejido se procesó mecánicamente con ayuda de bisturí y pinzas, posteriormente se incubó en una solución de 2 mg/ml de colagenasa tipo I (Gibco) durante 18-24 horas. Transcurrido el tiempo de digestión enzimática, se neutralizó con el doble de volumen de MF y se filtró a través de un filtro estéril de 100 µm. La solución resultante, se centrifugó a 300g durante 10 minutos. Mediante la solución de Türk (Sigma) se determinó el número de células, y la viabilidad celular se estableció utilizando el método Azul Tripán (Sigma). Las células se sembraron a una densidad de 100.000-140.000 células/cm² con medio MF.

1.3 Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC):

Las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) se obtuvieron de tejido adiposo sobrante de cirugías plásticas abdominales a través del Biobanco del Sistema Público Andaluz previo consentimiento informado del paciente en cumplimiento de los requisitos de donación de células y tejidos humanos (Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de Julio). El tejido adiposo se procesó mecánicamente con ayuda de bisturí y pinzas, posteriormente se pasó por un molinillo estéril, se incubó en una solución de 2 mg/ml de colagenasa A (Roche) durante 2 horas en agitación. Después de la digestión enzimática, la solución de digestión se neutralizó con el doble de volumen de MF, se centrifugó a 300g durante 10 minutos y se filtró a través de una malla de 100 µm. La solución filtrada, se centrifugó a 800g durante 10 minutos. El conteo celular se realizó mediante la solución de Türk (Sigma) y la viabilidad celular se determinó utilizando el método Azul Tripán (Sigma). Las células se sembraron a una densidad de 100.000 células/cm² con medio MF.

2. Mantenimiento de *feeder* en cultivo

Las células que actuaron como *feeder* se mantuvieron en cultivo durante el proceso completo de expansión de queratinocitos, trabajando en superficies comprendidas entre frasco de cultivo T25 (25 cm²) hasta factoría de 4 pisos (2520 cm²), bajo condiciones estándar de cultivo: 37°C, 5% de CO₂. El pase celular se estableció al alcanzar las células en cultivo una confluencia superior al 80%. Para el despegue celular se retiró el medio de cultivo MF, se realizó un lavado con DPBS y posteriormente se incubó con TrypLE Select 1X (Gibco) en proporción 1ml por cada 25 cm² de superficie de cultivo. La solución se neutralizó con el doble de volumen de MF, se centrifugó a 800g y se realizó el conteo de células totales y viabilidad celular mediante el método Azul Tripán, respectivamente. Las células obtenidas se sembraron a una densidad de 2500-5000 células por cm² con medio MF.

3. Proceso de irradiación

Las células utilizadas como capa alimentadora se irradiaron subletalmente.

El proceso de recuperación celular para irradiación se ha detallado en el apartado anterior. Las células recuperadas se concentraron a 4.000.000 células/ml y se depositaron en un tubo estéril de 50 ml sellado con parafilm. El tubo estéril se depositó en el interior de un tubo cónico de 500 ml sumergido completamente en agua, se colocó en una nevera refrigerada 2-8°C y se transportó al Servicio de Medicina Nuclear del Complejo Hospitalario Universitario de Granada. El tubo estéril de 50 ml que contenía las células se situó en un contenedor metálico específico relleno de agua en posición vertical a una distancia de 195 mm de la fuente de radiación. La dosis de radiación fue 50 Gy durante 28 minutos en las líneas 3T3 y FH, salvo la línea ADMSC que fue irradiada a 50 Gy y 100 Gy en dos pruebas diferentes (Tabla 1). El equipo empleado fue una unidad de irradiación por rayos gamma BIOBEAM 8000 con una fuente de Cs-137 de 2000 Ci.

Transcurrido el tiempo de irradiación, las células se transportaron a la UPCIT en nevera refrigerada 2-8°C. Se centrifugaron a 800g, para realizar el conteo de células y determinar la viabilidad celular con el método Azul Tripán, para la posterior siembra de cada *feeder*.

4. Densidad de siembra como *feeder*

Las células utilizadas como capa alimentadora previamente irradiadas: fibroblastos 3T3 irradiados (3T3i), fibroblastos dérmicos humanos irradiados (FHi) y las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo irradiadas (ADMSci) se sembraron a diferentes concentraciones de siembra el día previo a la obtención de Queratinocitos (QT). (Tabla 1)

Las cuatro líneas celulares se sembraron en un frasco T75 (75 cm²) previo a la obtención de queratinocitos durante el procesamiento inicial F0. En el pase celular F1, se sembraron en frascos T225 (225 cm²) pero siempre manteniendo la densidad de siembra establecida.

Los frascos que contenían la capa alimentadora se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo hasta el día siguiente

te que se realizó la siembra de los queratinocitos obtenidos tras el procesamiento inicial del tejido abdominal o durante el pase celular F1.

5. Procesamiento inicial de piel abdominal: obtención de queratinocitos (QT) primarios

Los queratinocitos (QT) se obtuvieron a partir de piel abdominal y circuncisiones a través del Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz y el Servicio de Urología del Complejo Hospitalario Universitario de Granada, respectivamente; previo consentimiento informado del paciente en cumplimiento de los requisitos de donación de células y tejidos humanos (Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de Julio).

Las muestras de piel abdominal de 9 cm² de tamaño se transportaron en DPBS desde el quirófano al laboratorio para el inicio de su procesamiento. En cabina de flujo laminar, se mantuvieron en solución de lavado (gentamicina 160 µg/ml, vancomicina 20 µg/ml, penicilina 600.000 UI, anfotericina B 1,25 µg/ml en DPBS) durante 30 minutos. Posteriormente, con ayuda de bisturí y pinzas se separó la dermis de la epidermis. La epidermis se trituró con ayuda de tijeras y se depositó en un tubo estéril de 50 ml que contenía 10 ml de TrypLE Select 10X (Gibco) para su digestión enzimática. La digestión se promovió mediante agitación durante 15 minutos, aplicando cada 5 minutos una agitación manual y así completar un ciclo de digestión. Este mecanismo se realiza durante 9 ciclos más, en los cuales el volumen de TrypLE Select 10X aplicado a la muestra de epidermis será de 5 ml. Al final de cada ciclo se filtra el contenido del tubo a través de una malla de 100 µm y se neutraliza la enzima con el doble de volumen de medio específico para el cultivo de queratinocitos (MQT): DMEM sin rojo fenol (Sigma), 30% HAM F-12 (Sigma), 10% suero fetal bovino (Sigma), 1% L-glutamina 200 mM (Sigma), triyodo tironina sódica 20 µg/ml (Sigma), hidrocortisona 0,4 µg/ml (Sigma), clorhidrato de adenina 24 µg/ml (Sigma), factor de crecimiento epidérmico 10 µg/ml (Sigma), insulina 5 µg/ml (Sigma), gentamicina 96 µg/ml (Normon) y Anfotericina (Sigma). Después de los 10 ciclos totales, se desecha el tejido, la suspensión celular se centrifuga a 300g, se desecha el sobrenadante y se añade MQT para la realización del conteo celular mediante la solución de Türk y la determinación de la viabilidad celular mediante el método Azul Tripán. El número total de células obtenidas se sembró en cada frasco T75 sembrado previamente con su *feeder* irradiado el día anterior.

	PROCESAMIENTO INICIAL F0		PASE CELULAR F1	
	Densidad de siembra F0	Dosis de irradiación F0	Densidad de siembra F1	Dosis de irradiación F1
Fibroblastos 3T3 (Sigma)	80.000 cél./cm ²	50 Gy	80.000 cél./cm ²	50 Gy
Fibroblastos 3T3 (ATCC)	40.000 cél./cm ²	50 Gy	10.000 cél./cm ²	50 Gy
Fibroblastos dérmicos humanos (FH)	10.000 cél./cm ²	50 Gy	10.000 cél./cm ²	50 Gy
Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo	10.000 cél./cm ²	100 Gy	10.000 cél./cm ²	100 Gy
	10.000 cél./cm ²	50 Gy	10.000 cél./cm ²	50 Gy

Tabla 1. Tipos celulares utilizados como capa alimentadora de queratinocitos. Dosis de irradiación y densidad de siembra en el procesamiento inicial y en el pase celular.

6. Mantenimiento en cultivo de queratinocitos

Se realiza el seguimiento del cultivo a través de microscopio óptico invertido visualizando la morfología y el estado del cultivo, hasta que alcance el 80% de confluencia y se realice el pase celular. Durante el tiempo de mantenimiento, cada 48-72 horas se realiza un cambio de MQT, se desecha el medio de cultivo del frasco y se añade de nuevo MQT atemperado a 37°C. Es posible observar alguna colonia de fibroblastos procedente del procesamiento inicial del tejido, que será eliminada aplicando una tripsina rápida de 1-2 minutos con Tryple Select 1X en un volumen de 1 ml por cada 25 cm², posteriormente se neutraliza con medio de cultivo y se desecha, para de nuevo añadir MQT al frasco. El frasco se mantiene en el incubador en condiciones estándar de cultivo: 37°C y 5% CO₂.

7. Pase celular de queratinocitos

Una vez alcanzada una confluencia superior al 80% se realiza el pase celular. El frasco de cultivo de QT se lava con DPBS para realizar una tripsinización rápida y así poder eliminar cualquier resto de *feeder* que quede en el frasco. Después de la tripsinización rápida, se añade TrypLE Select 1X en un volumen de 1 ml por cada 25 cm² lavando el frasco, desechándolo y posteriormente se vuelve aplicar este volumen de TrypLE Select 1X dejándolo actuar de 15-30 minutos en el incubador de CO₂. Las células despegadas del frasco, se neutralizan con el doble de volumen de MQT. La suspensión se recupera en un tubo estéril de 50 ml, se centrifuga a 500g. Se determina el número celular y la viabilidad celular con el método Azul Tripán. El número de queratinocitos obtenidos se siembra en frascos de cultivo T225, la superficie de cultivo se encuentra cubierta desde el día anterior con el *feeder* irradiado. La densidad de siembra de los queratinocitos es de 5000-10000 células/cm². Trasladamos los frascos al incubador de CO₂ para el posterior mantenimiento de los QT en cultivo, con cambios de medio cada 48-72 horas.

8. Recuperación final de queratinocitos

A las tres semanas de cultivo de QT se realiza la recuperación final. Para ello los frascos T225 se lavan con DPBS, se realiza una tripsina rápida con TrypLE Select 1X y posteriormente se incuba con TrypLE Select 1X, en volumen de 1 ml cada 25 cm², dejándolo actuar entre 15-30 minutos en el incubador de CO₂. Cuando se observa que los queratinocitos se han despegado del frasco, se realiza una neutralización con MQT al doble de volumen. La suspensión celular se deposita en un falcon de 50 ml y se centrifuga a 500g, posteriormente se realiza el conteo total de células y la viabilidad celular con el método de Azul Tripán.

9. Determinación de las variables de estudio

9.1 Número de células y porcentaje de viabilidad celular

La cuantificación de las suspensiones celulares obtenidas, se realizó utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y aplicando el método Azul Tripán. De los pellets de células resuspendidos en un volumen de medio de cultivo conocido, se tomó una alícuota de 10 µl en un microtubo eppendorf de 0,5 ml. A continuación se añadió un volumen conocido de Azul Tripán, se homogeneizó bien la suspensión. Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, y se cargó 10 µl en la parte superior y 10 µl en la parte inferior. La observación de la cámara se realizó bajo microscopio óptico invertido. Para cada muestra se contaron los 8 campos de la cámara, obviando las células que se encontraban en los bordes internos de cada cuadrante.

Se utilizó el método Azul Tripán para la diferenciación de células vivas y muertas. Se trata de un colorante que no penetra en las células viables, que al tener su membrana intacta, se ven como refringentes, y las células muertas se observan de color azul porque el colorante entra a través de su membrana dañada.

La solución de Türk se utilizó para la tinción de células mononucleadas, y determinar las células viables en el procesamiento inicial para la obtención de FH, ADMSC y QT.

El número total de células viables existentes en la suspensión celular original fue determinado usando la siguiente fórmula:

$N = n/8 \times FD \times \text{Volumen de resuspensión} \times 10^4$
N = Número de células totales
n = Número de células contadas en toda la cámara
8 = Número de cuadrantes
FD = Factor de dilución (número de veces que la muestra es diluida en Azul Tripán)
Volumen de resuspensión = Volumen total en el cual el pellet es resuspendido
10 ⁴ = Factor de corrección, cálculo en ml, el volumen de muestra es 0,1 µl
Se determinó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la misma preparación utilizada para el recuento celular, aplicando la siguiente fórmula:
$\% \text{ Viabilidad Celular} = [N^\circ \text{ Células vivas} / (N^\circ \text{ células vivas} + N^\circ \text{ células muertas})] \times 100$

9.2 Tasa de duplicación celular

La variable tasa de expansión celular se estimó en función del número de células obtenidas en relación al número de células sembradas, determinando el número de veces que la población celular se incrementa. La fórmula aplicada se resume a continuación:

Tasa expansión celular = N° Células obtenidas / N° células sembradas
De este modo, se obtiene la tasa de expansión celular F1, la tasa de expansión celular RF y la tasa de expansión celular total:
Tasa expansión celular F1 = Queratinocitos F1 / Queratinocitos F0
Tasa expansión celular RF = Queratinocitos RF / Queratinocitos F1
Tasa expansión celular total = Queratinocitos RF / Queratinocitos F0

9.3 Tasa de duplicación celular

En relación a la tasa de expansión celular, se pudo calcular la tasa de duplicación celular, para evaluar el número de veces que la población se duplicó en función del número de pases. Los resultados se expresaron como valores acumulados, aplicando la siguiente fórmula:

Tasa duplicación celular = $\log N / \log 2$
N = Tasa de expansión celular = N° Células obtenidas / N° células sembradas
De este modo, se obtiene la tasa de duplicación celular F1, la tasa de duplicación celular RF y la tasa de duplicación celular acumulada:
Tasa duplicación celular F1 = $\log (\text{Queratinocitos F1} / \text{Queratinocitos F0}) / \log 2$
Tasa duplicación celular RF = $\log (\text{Queratinocitos RF} / \text{Queratinocitos F1}) / \log 2$
Tasa duplicación celular acumulada = Tasa de duplicación celular F1 + Tasa de duplicación celular RF

10. Análisis de las variables de estudio

En cada una de las fases del cultivo celular de queratinocitos se analizaron todas las variables de estudio, a excepción del pro-

cesamiento inicial, donde no aplican la tasa de expansión celular y la tasa de duplicación celular (Tabla 2).

	PROCESAMIENTO INICIAL FO	PASE CELULAR F1	RECUPERACIÓN FINAL (RF)
Número de células	x	x	x
% de viabilidad	x	x	x
Tasa de expansión celular	N.A.	x	x
Tasa de duplicación celular	N.A.	x	x

Tabla 2. Variables de estudio durante las fases del cultivo celular de queratinocitos.

11. Análisis estadístico

La representación de los datos obtenidos se realizó como la media + error estándar de la media (EEM). Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico R (R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Se aplicó un modelo lineal generalizado para el desarrollo del análisis estadístico de los datos y se comprobó la distribución normal de los residuos. Sobre el modelo lineal, se realizó un análisis de varianza (ANalysis Of VAriance, ANOVA) factorial, para evaluar el efecto de cada factor presente, y se aplicó un ajuste *white adjust*. La variabilidad y la heterogeneidad características de los datos obtenidos a partir de muestras biológicas pueden generar el no cumplimiento de alguna de las asunciones del modelo, por lo que el ajuste se aplicó en todos los casos para asegurar la homocedasticidad en los residuos. Una vez realizada la ANOVA, se realizó un análisis post hoc con el test de *Tukey* para todos los factores y así evaluar el grado de significación al realizar una comparación entre las clases del factor. Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS:

1. Número de células y porcentaje de viabilidad celular

El número de queratinocitos obtenidos en el procesamiento inicial mediante la solución de Türcck y en el pase celular mediante la técnica Azul Tripán, así como el porcentaje de viabilidad celular en todas las fases de cultivo, se detallan en la Tabla 3.

	PROCESAMIENTO INICIAL FO				PASE CELULAR F1				RECUPERACIÓN FINAL (RF)	
	Densidad de siembra FO	Dosis de irradiación FO	Queratinocitos FO	% de Viabilidad Celular FO	Densidad de siembra F1	Dosis de irradiación F1	Queratinocitos F1	% de Viabilidad Celular F1	Queratinocitos RF	% de Viabilidad Celular RF
Fibroblastos 3T3 (Sigma) n=3	80.000 cél./cm ²	50 Gy	3.601.092	84,2	80.000 cél./cm ²	50 Gy	6.252.833	92,1	85.190.833	94,2
Fibroblastos 3T3 (ATCC) n=3	40.000 cél./cm ²	50 Gy	3.382.388	85,7	10.000 cél./cm ²	50 Gy	12.883.750	90,6	101.136.417	94,4
Fibroblastos dérmicos humanos (FH) n=3	10.000 cél./cm ²	50 Gy	3.892.889	84,9	10.000 cél./cm ²	50 Gy	9.025.370	94,7	84.626.291	95,7

Tabla 3. Número de queratinocitos y porcentaje de viabilidad celular en cada fase de cultivo celular en función del tipo celular utilizado como capa alimentadora.

El número de queratinocitos obtenidos no varió significativamente ($p > 0,05$) en función del tipo celular utilizado como *feeder*. Para el análisis estadístico de los valores se aplicó el modelo lineal generalizado, y se comprobó que la distribución de residuos se ajustaba a una normal. A continuación, se realizó un análisis de varianza (ANalysis Of VAriance, ANOVA) unifactorial, sobre el modelo lineal generalizado identificando el nivel de significación y se llevó a cabo un análisis *post hoc* con el test de *Tukey* para la comparación entre los tipos celulares utilizados como capa alimentadora (Figura 1).

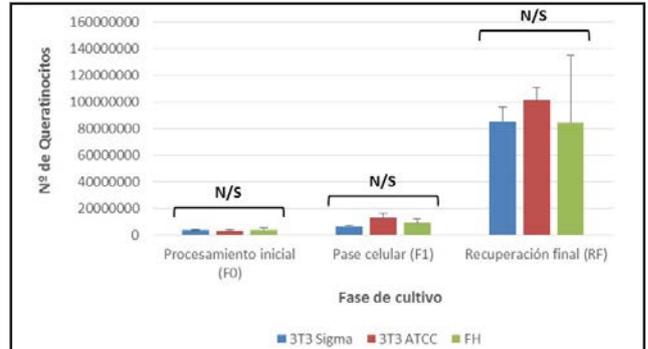


Figura 1. Número de queratinocitos obtenidos en cada fase de cultivo celular en función del tipo celular utilizado como *feeder*. N/S: No significación.

El porcentaje de viabilidad celular no varió significativamente ($p > 0,05$) en función del tipo celular utilizado como capa alimentadora para la expansión en cultivo de queratinocitos (Figura 2).

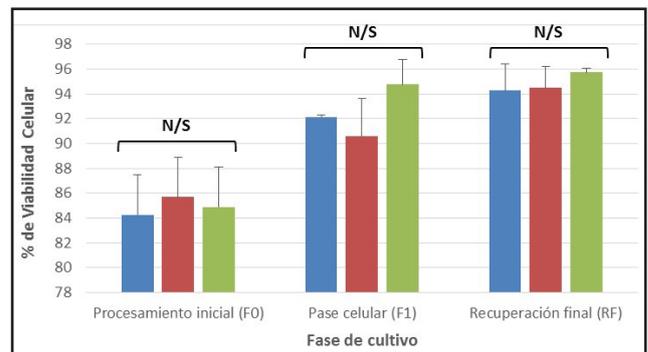


Figura 2. Porcentaje de viabilidad celular en función del tipo celular utilizado como capa alimentadora en cada fase de cultivo. N/S: No significación.

Los resultados obtenidos cuando se utilizaron las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo como capa alimentadora para el cultivo de queratinocitos en función de la dosis de irradiación se reflejan en la Tabla 4.

El número de queratinocitos obtenidos en función de la dosis de irradiación de las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo como *feeder* se representa en la Figura 3.

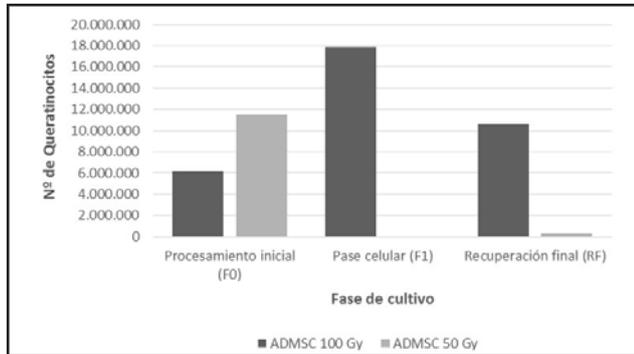


Figura 3. Número de queratinocitos obtenidos en cada fase de cultivo celular en función de la dosis de irradiación de la capa alimentadora de células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo.

El porcentaje de viabilidad celular en función de la dosis de irradiación de las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo utilizadas como capa alimentadora se representa en la Figura 4.

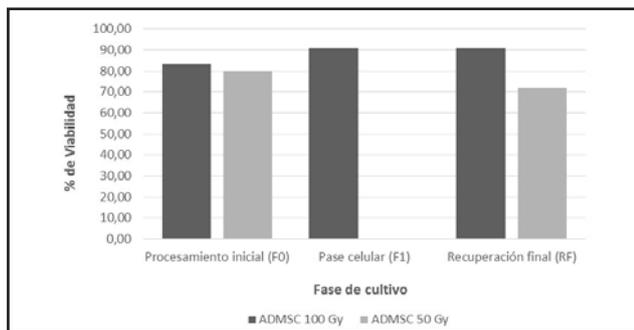


Figura 4. Porcentaje de viabilidad celular en cada fase de cultivo celular en función de la dosis de irradiación de la capa alimentadora de células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo.

2. Tasa de expansión celular

Los valores de la tasa de expansión celular alcanzados en el pase celular y en la recuperación final de queratinocitos, así como la tasa de expansión celular total al utilizar cada tipo de *feeder* se detallan en la Tabla 5.

La tasa de expansión celular de queratinocitos en el pase celular no varió significativamente ($p > 0,05$) en función del tipo celular utilizado como *feeder*. Tampoco se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la tasa de expansión celular en la recuperación final ni en la tasa de expansión celular total (Figura 5).

Los valores de la tasa de expansión celular de queratinocitos obtenidos al utilizar las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo como capa alimentadora se recogen en la Tabla 6.

La tasa de expansión celular de queratinocitos en el pase celular y en la recuperación final solo pudo ser determinada cuando la dosis de irradiación de las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo fue 100 Gy. La tasa de expansión celu-

lar total fue menor de 1 cuando la dosis de irradiación fue 50 Gy (Figura 6).

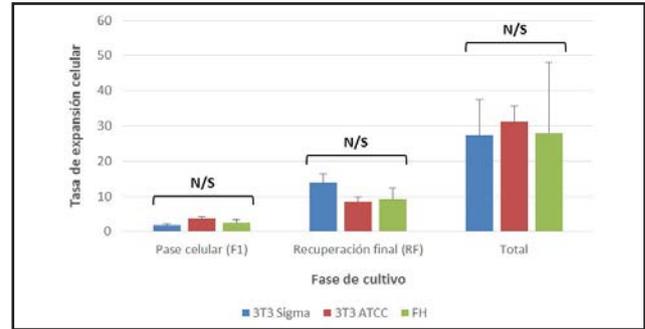


Figura 5. Tasa de expansión celular en el pase celular, en la recuperación final y total de queratinocitos en función de la capa alimentadora. N/S: No significación.

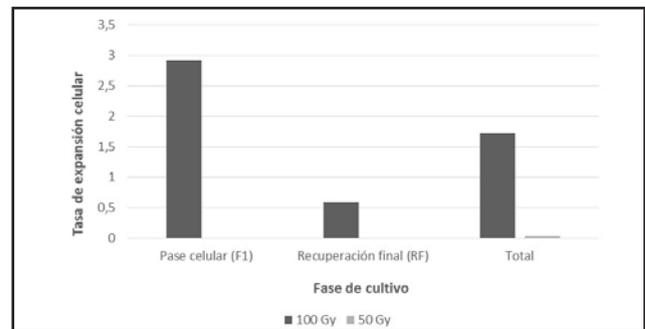


Figura 6. Tasa de expansión celular en el pase celular, en la recuperación final y total de queratinocitos en función de la dosis de irradiación de la capa alimentadora de células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo.

3. Tasa de duplicación celular

Los valores de tasa de duplicación celular alcanzados en el pase celular y en la recuperación final de queratinocitos, así como la tasa de duplicación celular acumulada al utilizar cada tipo de *feeder* se detallan en la Tabla 7.

La tasa de duplicación celular de queratinocitos en el pase celular no varió significativamente ($p > 0,05$) en función del tipo celular utilizado como *feeder*. Tampoco se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la tasa de duplicación celular en la recuperación final ni en la tasa de duplicación celular acumulada (Figura 7).

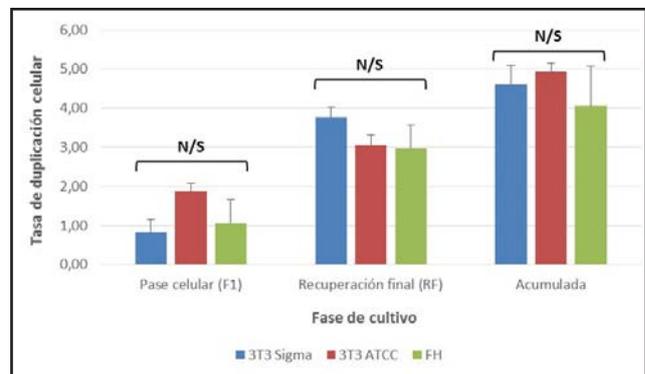


Figura 7. Tasa de duplicación celular en el pase celular, en la recuperación final y tasa de duplicación celular acumulada de queratinocitos en función de la capa alimentadora. N/S: No significación.

	PROCESAMIENTO INICIAL F0				PASE CELULAR F1				RECUPERACIÓN FINAL (RF)	
	Densidad de siembra F0	Dosis de irradiación F0	Queratinocitos F0	% de Viabilidad Celular F0	Densidad de siembra F1	Dosis de irradiación F1	Queratinocitos F1	% de Viabilidad Celular F1	Queratinocitos RF	% de Viabilidad Celular RF
Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) n=1	10.000 cél./cm ²	100 Gy	6.123.000	83,0	10.000 cél./cm ²	100 Gy	17.878.500	91,0 %	10.582.500	91,0
Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) n=1	10.000 cél./cm ²	50 Gy	11.520.000	80,0	10.000 cél./cm ²	50 Gy	-	-	330.000	72,0

Tabla 4. Número de queratinocitos y porcentaje de viabilidad celular en cada fase de cultivo celular utilizando células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo como feeder.

	PROCESAMIENTO INICIAL F0			PASE CELULAR F1				RECUPERACIÓN FINAL (RF)		
	Densidad de siembra F0	Dosis de irradiación F0	Queratinocitos F0	Densidad de siembra F1	Dosis de irradiación F1	Queratinocitos F1	Tasa de Expansión Celular F1	Queratinocitos RF	Tasa de Expansión Celular RF	Tasa de Expansión Celular Total
Fibroblastos 3T3 (Sigma) n=3	80.000 cél./cm ²	50 Gy	3.601.092	80.000 cél./cm ²	50 Gy	6.252.833	1,87	85.190.833	13,97	27,47
Fibroblastos 3T3 (ATCC) n=3	40.000 cél./cm ²	50 Gy	3.382.388	10.000 cél./cm ²	50 Gy	12.883.750	3,67	101.136.417	8,50	31,13
Fibroblastos dérmicos humanos (FH) n=3	10.000 cél./cm ²	50 Gy	3.892.889	10.000 cél./cm ²	50 Gy	9.025.370	2,43	84.626.291	9,13	28,10

Tabla 5. Tasa de expansión celular de queratinocitos en función del tipo de feeder en el pase celular y en la recuperación final.

	PROCESAMIENTO INICIAL F0			PASE CELULAR F1				RECUPERACIÓN FINAL (RF)		
	Densidad de siembra F0	Dosis de irradiación F0	Queratinocitos F0	Densidad de siembra F1	Dosis de irradiación F1	Queratinocitos F1	Tasa de Expansión Celular F1	Queratinocitos RF	Tasa de Expansión Celular RF	Tasa de Expansión Celular Total
Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) n=1	10.000 cél./cm ²	100 Gy	6.123.000	10.000 cél./cm ²	100 Gy	17.878.500	2,92	10.582.500	0,59	1,73
Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) n=1	10.000 cél./cm ²	50 Gy	11.520.000	10.000 cél./cm ²	50 Gy	-	-	330.000	-	0,03

Tabla 6. Tasa de expansión celular de queratinocitos en cada fase de cultivo celular utilizando células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo como feeder.

	PROCESAMIENTO INICIAL F0			PASE CELULAR F1				RECUPERACIÓN FINAL (RF)		
	Densidad de siembra F0	Dosis de irradiación F0	Queratinocitos F0	Densidad de siembra F1	Dosis de irradiación F1	Queratinocitos F1	Tasa de Duplicación Celular F1	Queratinocitos RF	Tasa de Duplicación Celular RF	Tasa de Duplicación Celular Acumulada
Fibroblastos 3T3 (Sigma) n=3	80.000 cél./cm ²	50 Gy	3.601.092	80.000 cél./cm ²	50 Gy	6.252.833	0,84	85.190.833	3,76	4,60
Fibroblastos 3T3 (ATCC) n=3	40.000 cél./cm ²	50 Gy	3.382.388	10.000 cél./cm ²	50 Gy	12.883.750	1,88	101.136.417	3,05	4,93
Fibroblastos dérmicos humanos (FH) n=3	10.000 cél./cm ²	50 Gy	3.892.889	10.000 cél./cm ²	50 Gy	9.025.370	1,07	84.626.291	2,97	4,05

Tabla 7. Tasa de duplicación celular de queratinocitos en el pase celular, la recuperación final y acumulada en función del tipo de feeder.

	PROCESAMIENTO INICIAL F0			PASE CELULAR F1				RECUPERACIÓN FINAL (RF)		
	Densidad de siembra F0	Dosis de irradiación F0	Queratinocitos F0	Densidad de siembra F1	Dosis de irradiación F1	Queratinocitos F1	Tasa de Duplicación Celular F1	Queratinocitos RF	Tasa de Duplicación Celular RF	Tasa de Duplicación Celular Acumulada
Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) n=1	10.000 cél./cm ²	100 Gy	6.123.000	10.000 cél./cm ²	100 Gy	17.878.500	1,55	10.582.500	-0,76	0,79
Células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) n=1	10.000 cél./cm ²	50 Gy	11.520.000	10.000 cél./cm ²	50 Gy	-	-	330.000	-	-5,13

Tabla 8. Tasa de duplicación celular de queratinocitos en el pase celular, la recuperación final y acumulada utilizando células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo como feeder.

Los valores de la tasa de duplicación celular de queratinocitos obtenidos al utilizar las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo como capa alimentadora se reflejan en la Tabla 8.

La tasa de duplicación celular de queratinocitos en el pase celular y en la recuperación final solo pudo ser determinada cuando la dosis de irradiación de las células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo fue 100 Gy. La tasa de expansión celular acumulada fue negativa cuando la dosis de irradiación fue 50 Gy (Figura 8).

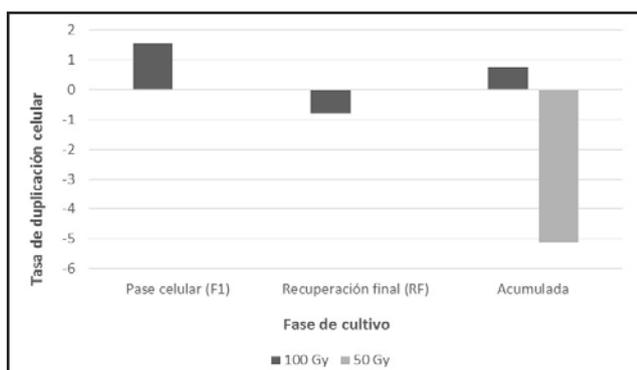


Figura 8. Tasa de duplicación celular en el pase celular, en la recuperación final y acumulada de queratinocitos en función de la dosis de irradiación de la capa alimentadora de células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo.

DISCUSIÓN:

La optimización del cultivo de queratinocitos representa uno de los retos actuales en investigación, debido a su importancia como componente fundamental de la epidermis para el desarrollo de un modelo de piel artificial humana mediante ingeniería tisular (13)(16)(17)(18).

En 1975, Rheinwald y Green (15) establecieron las condiciones óptimas para promover el cultivo de queratinocitos mediante el uso de un *feeder* que favorezca la adhesión y estimule la proliferación celular. Este *feeder* estaba formado por fibroblastos 3T3 de ratón previamente irradiados (3T3_i) para inhibir su propia multiplicación y actuar como capa alimentadora eficaz de queratinocitos.

El avance de la medicina regenerativa ha hecho posible el trasplante de piel artificial en humanos, fundamentalmente en pacientes con quemaduras de gran extensión. Las láminas de piel trasplantadas deben contener un gran número de queratinocitos en la superficie garantizando un mínimo porcentaje de trazas de fibroblastos 3T3_i, para evitar células de origen animal en el sustitutivo tisular.

La optimización en el proceso de expansión celular de los queratinocitos, ha llevado a muchos grupos de investigación a estudiar un *feeder* alternativo (19)(20), formado por células autólogas con el fin de evitar el rechazo por parte del paciente. En nuestro modelo de piel artificial humana, el tiempo limitado en cultivo, hace imposible el uso de un *feeder* autólogo. En la mayoría de los casos se han utilizado fibroblastos dérmicos humanos irradiados

(FH_i) con resultados equiparables a los obtenidos con fibroblastos 3T3_i murinos (21)(22)(23)(24)(25).

Los resultados de nuestro estudio también confirman que el uso de un *feeder* de origen humano permite la expansión celular de queratinocitos. La utilización de FH_i aislados de tejido dérmico, ha facilitado la adhesión y la proliferación de los queratinocitos, obteniéndose una tasa de expansión de queratinocitos equiparable a la obtenida con la capa alimentadora 3T3_i. En 21 días, se ha conseguido obtener un elevado número de queratinocitos, con la dificultad que supone optimizar el cultivo de este tipo celular en un corto periodo de tiempo.

Por otra parte, hemos considerado la opción de utilizar células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo (AD-MSC) como *feeder*, fuente celular poco explorada y con buenas expectativas como alternativa a la utilización de FH_i, al proceder también de tejido humano y minimizar las posibles complicaciones post-implante. Numerosos grupos de investigación han utilizado células madre de médula ósea con esta finalidad (26), sin haberse establecido hasta el momento resultados concluyentes. La limitación en la obtención de muestras, ha comprometido el desarrollo de nuestro estudio, habiéndose realizado solo una prueba para cada dosis de irradiación. Por lo tanto, se plantea la necesidad de realizar nuevos estudios con el fin de optimizar el procedimiento, debido a que los resultados obtenidos en nuestro estudio, no permiten establecer conclusiones.

En este estudio, se ha podido determinar el patrón proliferativo de los queratinocitos en cultivo utilizando tres fuentes celulares como capa alimentadora: fibroblastos murinos 3T3, fibroblastos dérmicos humanos y células mesenquimales troncales derivadas de tejido adiposo. La capa alimentadora es fundamental en este proceso porque las células que componen esta capa sirven como fuente de adhesión, y proporcionan factores de crecimiento. Se ha demostrado que con los fibroblastos dérmicos humanos subletalmente irradiados como capa alimentadora, los queratinocitos presentan una tasa de duplicación equiparable a la obtenida con el *feeder* 3T3_i. Estos resultados indican que los fibroblastos dérmicos humanos representan un sistema de capa alimentadora adecuada para soportar el cultivo de queratinocitos humanos primarios (27)(28).

El estudio llevado a cabo presenta una serie de limitaciones como son el número de repeticiones realizadas para cada tipo celular (n=3) que es el "n" mínimo para considerar un estudio representativo. Además, ha sido necesario adaptar la densidad de siembra en función del tipo celular utilizado como *feeder*; incluso de los fibroblastos 3T3 murinos procedentes de casas comerciales diferentes. En este sentido, para el desarrollo de nuestro modelo de piel artificial humana, resulta interesante utilizar una menor densidad de siembra garantizando una menor presencia de *feeder* en los queratinocitos que se incorporen como capa epitelial en el sustitutivo tisular. Por último, se plantea la posibilidad de realizar la determinación de la viabilidad celular mediante técnicas más avanzadas en estudios posteriores.

Con todo esto, a pesar de tener un número bajo de repeticiones, actualmente podemos considerar los fibroblastos dérmicos humanos como *feeder* alternativo a los fibroblastos 3T3 murinos. Utilizando una menor densidad de siembra, se han obtenido resultados similares en cuanto a número de queratinocitos, porcentaje de viabilidad celular, tasa de expansión celular y tasa de duplicación celular, en el mismo tiempo de cultivo, suprimiendo la utilización de células de origen murino.

CONCLUSIÓN:

Los fibroblastos dérmicos humanos irradiados se presentan como capa alimentadora alternativa a los fibroblastos 3T3 murinos para promover la expansión celular de queratinocitos. Los fibroblastos dérmicos humanos irradiados proporcionan una capa alimentadora funcional que permite la expansión in vitro de manera eficaz de los queratinocitos que se van a utilizar con fines clínicos para el desarrollo de un modelo de piel artificial humana.

AGRADECIMIENTOS

Servicio de Medicina Nuclear del Complejo Hospitalario Universitario de Granada

FINANCIACIÓN

FIS ISC-III and FEDER PI13/02576 y Beca Mutual Médica

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920–6.
2. Bhat ZF, Bhat H, Pathak V. Principles of Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering*. 2014. 1663-1683 p.
3. McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and Organization of Human Skin. *Rook's Textbook Dermatology*. 2004;45–128.
4. Amirlak B, Shahabi L. Skin Anatomy. *Medscape*. 2015. p. 1–8.
5. McLafferty E, Hendry C, Farley A. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs Stand*. 2012;27(3):35–42.
6. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 2002;12(4):390–9; quiz 400–1.
7. Boulais N, Misery L. The epidermis: A sensory tissue. *European Journal of Dermatology*. 2008. p. 119–27.
8. Black AF, Bouez C, Perrier E, Schlotmann K, Chapuis F, Damour O. Optimization and Characterization of an Engineered Human Skin Equivalent. *Tissue Eng*. 2005;11(5-6):723–33.
9. Larouche D, Paquet C, Fradette J, Carrier P, Auger FA, Germain L. Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods Mol Biol*. 2009;482:233–56.
10. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*. 1981;211(4486):1052–4.
11. Lamme EN, Van Leeuwen RTJ, Brandsma K, Van Marie J, Middelkoop E. Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J Pathol*. 2000;190(5):595–603.
12. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*. 2007;445(7130):874–80.
13. Supp DM, Boyce ST. Engineered skin substitutes: Practices and potentials. *Clin Dermatol*. 2005;23(4):403–12.
14. Atiyeh BS, Costagliola M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: Three decades later. *Burns*. 2007. p. 405–13.
15. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331–43.
16. Stacey GN, Cobo F, Nieto A, Talavera P, Healy L, Concha Angel. The development of "feeder" cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: Challenges and solutions. *J Biotechnol*. 2006;125(4):583–8.
17. Lamb R, Ambler CA. Keratinocytes Propagated in Serum-Free, Feeder-Free Culture Conditions Fail to Form Stratified Epidermis in a Reconstituted Skin Model. *PLoS One*. 2013;8(1).

18. Hernon CA, Harrison CA, Thornton DJA, MacNeil S. Enhancement of keratinocyte performance in the production of tissue-engineered skin using a low-calcium medium. *Wound Repair Regen.* 2007;15(5):718–26.
19. Coolen NA, Verkerk M, Reijnen L, Vlig M, Van Den Bogaerd AJ, Breetveld M, et al. Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells. *Cell Transplant.* 2007;16(6):649–61.
20. De Corte P, Verween G, Verbeken G, Rose T, Jennes S, De Coninck A, et al. Feeder layer- and animal product-free culture of neonatal foreskin keratinocytes: Improved performance, usability, quality and safety. *Cell Tissue Bank.* 2012;13(1):175–89.
21. Mujaj S, Manton K, Upton Z, Richards S. Serum-free primary human fibroblast and keratinocyte coculture. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(4):1407–20.
22. Sun T, Higham M, Layton C, Haycock J, Short R, MacNeil S. Developments in xenobiotic-free culture of human keratinocytes for clinical use. *Wound Repair Regen.* 2004;12(6):626–34.
23. Bullock AJ, Higham MC, MacNeil S. Use of human fibroblasts in the development of a xenobiotic-free culture and delivery system for human keratinocytes. *Tissue Eng.* 2006;12(2):245–55.
24. Bisson F, Rochefort Eloise, Lavoie A, Larouche D, Zaniolo K, Simard-Bisson C, et al. Irradiated human dermal fibroblasts are as efficient as mouse fibroblasts as a feeder layer to improve human epidermal cell culture lifespan. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):4684–704.
25. Sharma SM, Fuchsluger T, Ahmad S, Katikireddy KR, Armant M, Dana R, et al. Comparative Analysis of Human-Derived Feeder Layers with 3T3 Fibroblasts for the Ex Vivo Expansion of Human Limbal and Oral Epithelium. *Stem Cell Rev Reports.* 2012;8(3):696–705.
26. Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells.* 2003;21(2):131–42.
27. Auxenfans C, Thepot A, Justin V, Hautefeuille A, Shahabeddin L, Damour O, et al. Characterisation of human fibroblasts as keratinocyte feeder layer using p63 isoforms status. *Biomed Mater Eng.* 2009;19(4-5):365–72.
28. Panacchia L, Dellambra E, Bondanza S, Paterna P, Maurelli R, Paionni E, et al. Nonirradiated human fibroblasts and irradiated 3t3-j2 murine fibroblasts as a feeder layer for keratinocyte growth and differentiation in vitro on a fibrin substrate. *Cells Tissues Organs.* 2009;191(1):21–35.