



EVALUACIÓN DE APÓSITOS CELULARES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HERIDA EN PIEL.

Ramos Laureano Jaime V¹, Jaimes Jimenez Venus D^{1,2}, Esquivel Estudillo Joel^{1,2}, Ángeles Chimal José S², Cauich Rodríguez Juan Valerio³ *Santa-Olalla Tapia Jesús².

¹Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular-Hospital del Niño Morelense/Facultad de Medicina UAEM, Calle Iztaccihuatl Esq. Leñeros S/N Volcanes, C.P. 62350 Cuernavaca, Morelos. ²Facultad de Ciencias Biológicas de la UAEM. Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos y Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43. No. 130, Colonia Chuburna de Hidalgo, C.P. 97200 Mérida, Yucatán.

E-mail: jai_m_047@hotmail.com y jsa@uaem.mx

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de quemaduras en piel utilizando apósitos data desde 1950, donde el empleo de apósitos de origen animal disminuía el tiempo de cicatrización, así fueron propuestos como alternativa para injertos, sin embargo presentaba el riesgo de xenoinfección. Posteriormente, se determinó que el sustituto ideal de piel debería ser bilaminado con el grosor suficiente y la capacidad de servir de andamiaje para permitir el crecimiento fibrovascular en la capa interna, mientras que en la capa externa, del tejido epidermal que sirva como barrera a la invasión microbiana, a la vez que permita la liberación de vapor de agua para prevenir la colección de fluidos de bajo del injerto[1,2].

La terapia celular tiene la finalidad de utilizar células con el propósito de regenerar y regular procesos fisiopatológicos. En lesiones dérmicas se ha propuesto emplear queratinocitos humanos. Para favorecer su transferencia a las lesiones se han cultivado sobre un sustrato de origen animal o sintético, utilizando la ingeniería de tejidos es posible diseñar estructuras que semejan el tejido nativo. Como alternativa se han generado apósitos celulares sobre sustratos no inmunogénicos, que estimulan a células del tejido sano para favorecer la reparación de la piel[3,4,5].

Se han comercializado apósitos celulares que presentan limitaciones, ya que algunos no pueden emplearse en heridas amplias, existe rechazo al material, no es biodegradable, tiempo prolongado de manufactura, es necesario la colocación repetitiva de apósitos para lograr la cicatrización, transferencia de xenoinfecciones, revascularización no eficiente y sobretodo los altos costos [6].

La finalidad del presente trabajo es desarrollar un apósito celular empleando queratinocitos humanos aislados de prepucio, sobre un sustrato biodegradable y no inmunogénico.

OBJETIVO GENERAL

Generar apósitos celulares conteniendo queratinocitos para el tratamiento de quemaduras de segundo grado profunda.

MATERIALES Y MÉTODOS

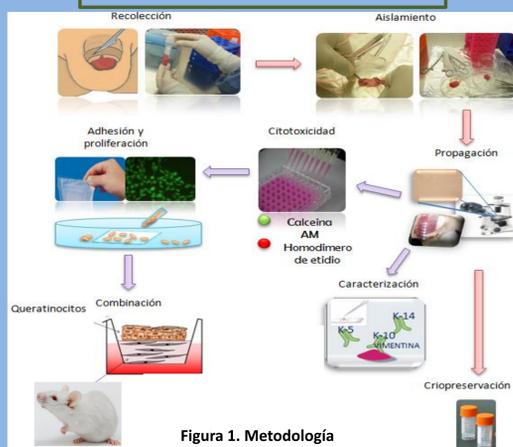


Figura 1. Metodología

RESULTADOS

La propagación *in vitro* de queratinocitos selecciona una población K5 + y Vimentina +.

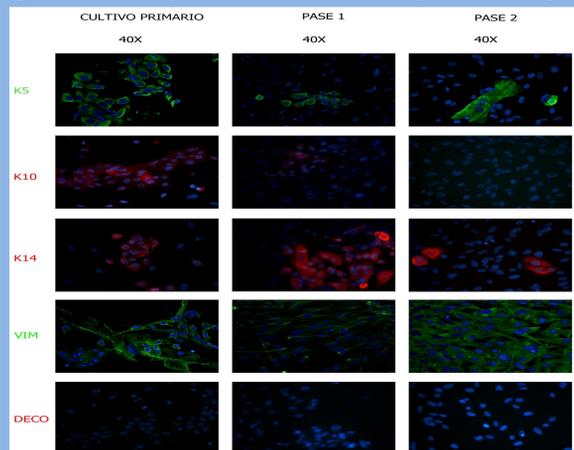


Figura 2. Caracterización celular del lote JJ. Las células epidermales mostraron positividad para todas las queratinas y vimentina, y nula expresión de decorina en el aislado de la epidermis. Existe pérdida de la expresión de las queratinas, K-10 al CP y K-14 al P-1, y ganancia de la expresión de K-5 y Vimentina. Expresando el 100% desde el P-2.

Patrón no reportado de K5, marcador de células basales

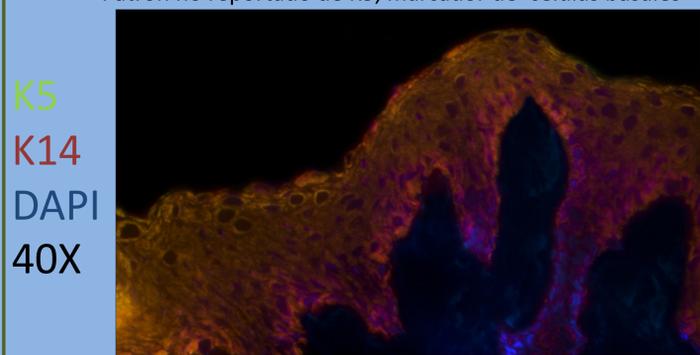


Figura 3. Muestra de piel (prepucio) con Inmunohistofluorescencia. Citoqueratina 5 y 14, expresadas en la región basal de la epidermis.

Vimentina se expresa en la capa basal

VIM
DECO
DAPI
10X

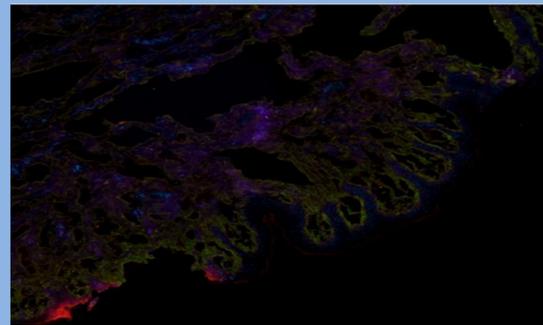


Figura 4. Muestra de piel (prepucio) con Inmunohistofluorescencia. Vimentina con expresión en la región basal de la epidermis y la dermis. Decorina se expresa en la dermis.

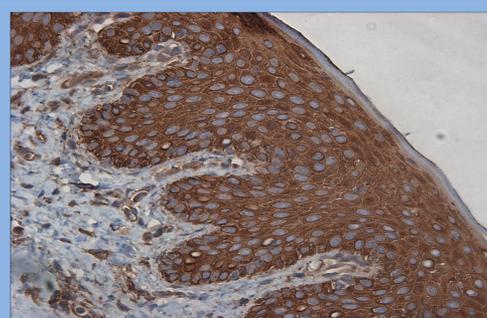


Figura 5. Inmunohistoquímica de piel (prepucio) 40X, marcando la citoqueratina 5 con expresión en la epidermis, desde el estrato basal hasta el estrato granuloso.

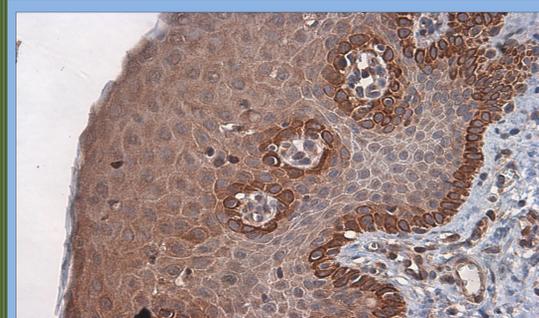


Figura 6. Inmunohistoquímica de piel (prepucio) 40X, marcando la citoqueratina 14 con expresión en la epidermis, desde el estrato basal hasta el estrato granuloso.

Rendimiento y Viabilidad Celular de los queratinocitos lote JJ5

Propagación celular durante 3 meses, con rendimiento celular arriba del 1,000,000 de células

Viabilidad por arriba del 80% durante la propagación hasta el pase 18.

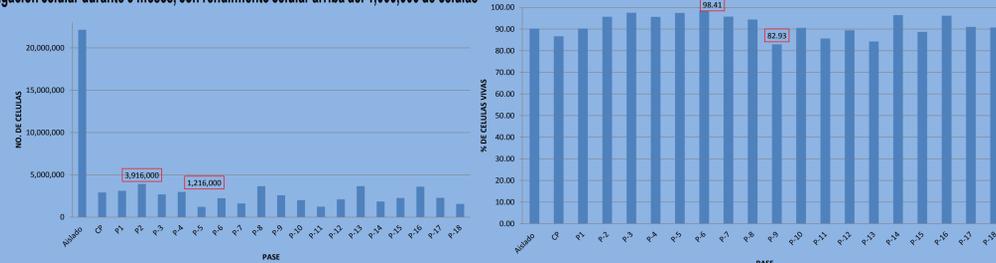


Figura 7. Rendimiento y Viabilidad celular. El número total de células obtenidas durante la propagación del lote JJ5 fluctuó entre y 1,216,000 y 3,916,000, logrando propagar hasta el pase 18 con una viabilidad entre 98.41% y 82.93 %.

Evaluación de la capacidad adherente y proliferativa de los Queratinocitos, sobre un sustrato biodegradable, con Calceína y H. de Etidio, 24hrs y 168 hrs.

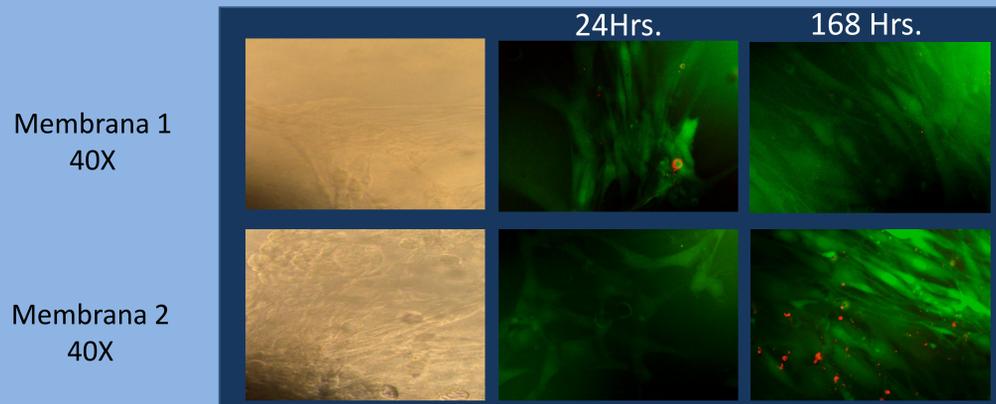


Figura 8. Se realizó un registro fotográfico en campo claro donde se observó la presencia de células, se incubaron con calceína y h. de etidio, lográndose teñir las células a las 24 hrs. de haberlas sembrado, así como a las 168hrs, por lo que las dos membranas que se evaluaron permiten la adherencia y proliferación de los queratinocitos.

CONCLUSIONES.

- 1- Se selecciona una subpoblación de células precursoras de queratinocitos.
- 2- Las células epidermales muestran adherencias y proliferación en los biopolímeros analizados.
- 3- Se cuenta con biopolímeros que puede ser útil para el desarrollo de apósitos dérmicos.

LITERATURA CITADA.

[1] Basil A. and Pruitt Jr. 2014. Evolution of the Field over Seven. Surgical Clinics of North America. 94:721-740.
[2] Nyame T.T., Chiang H.A. and Orgill D. P. 2014. Clinical Applications of Skin Substitutes. Surgical Clinics of North America. 94:839-850.
[3] Leclerc, T., Thepenier C., Bey e., Peltzer J., Trouillas M., Duhamael P., Barges L., Prat M., Bonderriet M. and Lataillade J.-J.. 2011. Cell therapy of burns. Cell Proliferation, 44:48-54.
[4] Rajagopalan P., Kasif S. and Murali T.M. 2013. Systems Biology Characterization of Engineered Tissues. The Annual Review of Biomedical Engineering, 15:55-70.
[5] Garcia, M. Escamez M.J., Carretero M., Mirones I., Martínez-Santamaría L., Navarro M., Jorcano J.L., Meana A., Del Río M. and Larcher F. 2007. Modeling Normal and Pathological Processes Through Skin Tissue Engineering. Molecular Carcinogenesis 46:741-745.
[6]Kamel R., Ong J.F., Eriksson E., Junker J.P.E. and Caterson E. 2013. Tissue Engineering of Skin. Journal of the American College of Surgeons, 3:533-555.

AGRADECIMIENTOS.

- 1.-PROMEP CA75-1187
- 2.-CONACYT 139851
- 3.-CONACYT 151287
- 4.-CONACYT 84193
- 5.-CONACYT 110759
- 6.- Rubio Pharma y Asociados
- 7.- Red Farned