



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS  
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA  
INFORME MONOGRÁFICO**



**CULTIVOS CELULARES DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS  
AUTÓLOGOS PARA TRASPLANTES DE PIEL  
EN PACIENTES QUEMADOS**

**Autores:**  
Montañez, Stephany  
Ramírez, Ernesto

**Tutor:**  
Núñez, José

**NAGUANAGUA, OCTUBRE DE 2021**



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS  
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA  
INFORME MONOGRÁFICO



CONSTANCIA DE APROBACION

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el informe monográfico titulado:

**CULTIVOS CELULARES DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS  
AUTÓLOGOS PARA TRASPLANTES DE PIEL  
EN PACIENTES QUEMADOS**

Presentado por lds bachilleres:

Montañez, Stephany C.I.:V-20.757.044

Ramírez, Ernesto C.I.:V-26.024.346

Hacemos constar que hemos examinado y aprobado la misma, y que aunque no nos hacemos responsable de su contenido, lo encontramos correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha 01-11-2021

Profesor

Alcira Argüello

Profesor

Jesus Carcedo

Profesor

Legn2 Rojas

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS  
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGÍA  
INFORME MONOGRÁFICO**

**CULTIVOS CELULARES DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS  
AUTÓLOGOS PARA TRASPLANTES DE PIEL  
EN PACIENTES QUEMADOS**

**Autores:** Montañez, Stephany  
Ramírez, Ernesto  
**Año:** 2021

**RESUMEN**

El desarrollo del cultivo celular *in vitro* para injertos de piel en pacientes con quemaduras graves, ha contribuido de manera eficaz para sanar estas heridas, debido a que constituyen uno de los traumas más severos contra el organismo, siendo la piel una barrera multifuncional y protectora del cuerpo. Las células específicas para realizar el cultivo celular *in vitro* primario del tejido epitelial son los queratinocitos y fibroblastos, estas células se pueden utilizar como tratamiento independiente o compuesto con otros materiales biosintéticos, para dar inicio al proceso de reepitelización. La presente investigación tiene como objetivo general, describir la importancia del uso de los cultivos celulares de queratinocitos y fibroblastos autólogos para trasplantes de piel en pacientes con quemaduras de tercer y cuarto grado. El protocolo para la obtención de tejido cutáneo tiene un grado de exigencia, que se debe dominar para lograr su correcta implementación y así poder seleccionar las células capaces de sobrevivir a sustratos y compuestos químicos que conserven sus características morfológicas normales, para ello existen sustancias que ayudan a mantenerlas y a estar en óptimas condiciones para evitar la apoptosis y puedan diferenciarse y proliferarse adecuadamente. La metodología usada, es de tipo documental descriptivo. La importancia de esta técnica se fundamenta en proporcionar conocimientos a nivel profesional dentro de la rama de la histotecnología, demostrando la relevancia de los métodos usados para solventar problemas de salud, como también para el beneficio de los pacientes con quemaduras permitiendo la recuperación idónea y eficaz.

**Palabras clave:** Cultivo celular, queratinocitos, fibroblastos, quemaduras, autólogo.



**UNIVERSITY OF CARABOBO  
FACULTY OF HEALTH SCIENCES  
SCHOOL OF BIOMEDICAL SCIENCES  
HIGHER TECHNICIAN IN HISTOTECHNOLOGY  
A CASE REPORT**



**TISSUE CULTURES OF AUTOLOGOUS KERATINOCYTES AND  
FIBROBLASTS FOR SKIN TRANSPLANTATION IN BURNED PATIENTS**

**Authors:** Montañez, Stephany  
Ramírez, Ernesto  
**Year:** 2021

**ABSTRACT**

The development of in vitro cell culture for skin grafts in patients with severe burns, has contributed effectively to heal these wounds, due to the fact that they constitute one of the most severe traumas against the organism, the skin being a multifunctional and protective barrier of the body. The specific cells to carry out the primary in vitro cell culture of the epithelial tissue are keratinocytes and fibroblasts. These cells can be used as an independent treatment or compounded with other biosynthetic materials, to initiate the re-epithelialization process. The present research aims to describe the importance of the use of autologous keratinocyte and fibroblast cell cultures for skin transplants in patients with third and fourth degree burns. The protocol for obtaining skin tissue has a degree of demand, which must be mastered to achieve its correct implementation and thus be able to select cells capable of surviving substrates and chemical compounds that retain their normal morphological characteristics, for this there are substances that help to maintain them and to be in optimal conditions to avoid apoptosis and to be able to differentiate and proliferate properly. The methodology used is of a descriptive documentary type. The importance of this technique is based on providing knowledge at a professional level within the branch of histotechnology, demonstrating the relevance of the methods used to solve health problems, as well as for the benefit of patients with burns, allowing suitable and effective recovery.

**Key words:** Cell culture, keratinocytes, fibroblasts, burns, autologou.

## ÍNDICE

	<b>pp.</b>
Constancia de aprobación	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
Introducción	6
Desarrollo	8
Características citológicas y moleculares de los queratinocitos y fibroblastos	12
Factores que inducen al crecimiento celular	14
Protocolo para la obtención de cultivos de queratinocitos y fibroblastos autólogos	17
Conclusiones	19
Recomendaciones	21
Referencias	22

## INTRODUCCIÓN

A modo introductorio, la piel como barrera multifuncional y protectora del cuerpo humano, contiene una población de células madres esenciales y varios tipos celulares encargadas de renovar y mantener la integridad del tejido, lo que permite la sustitución de células muertas y la reparación de heridas, garantizando su función protectora<sup>1</sup>. En circunstancias normales, estas células tienen la capacidad de cicatrizar las heridas sin necesidad de una intervención médica, no obstante, Li y Maitz<sup>2</sup> explican que las quemaduras se pueden caracterizar por la pérdida de células progenitoras que son necesarias para la regeneración de la epidermis y dermis.

Entonces, una quemadura es una lesión en los tejidos del cuerpo causada por el calor, sustancias químicas, electricidad y la radiación, ocasionando una desnaturalización de las proteínas tisulares, trayendo como consecuencia la pérdida del tejido y cuya gravedad está relacionada con la extensión y profundidad de la misma<sup>3</sup>. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud<sup>4</sup>, ha reportado un promedio de 265.000 personas fallecidas como consecuencia de quemaduras ocasionadas por sustancias químicas, incendios y electrocuciones (quemaduras químicas y térmicas).

Cuando se presentan quemaduras de segundo grado profundo (dérmica profunda) y tercer grado (espesor total, es decir, con afectación de las capas profundas de la piel, tejido celular subcutáneo y en algunos casos músculos y huesos, dependiendo de la magnitud de la lesión), aunque algunos autores clasifican estos últimos elementos en las quemaduras de cuarto grado; el tratamiento a seguir es el injerto de piel proveniente del propio paciente<sup>5</sup>.

Además, explican Domaszewska et al.<sup>6</sup> que las lesiones extensas en piel como consecuencia de una quemadura que supere un espesor total mayor a 50%, requieren de cuidados intensivos, múltiples procedimientos quirúrgicos, terapia física, ocupacional e intervenciones psicológicas. Dentro de las complicaciones se encuentran la pérdida de líquidos corporales seguida de la deshidratación, desequilibrio electrolítico e insuficiencia renal y circulatoria, aunado a las infecciones por bacterias y otros patógenos<sup>7</sup>. Lo anterior

permite comprender que cualquier investigación enfocada en el tratamiento de pacientes quemados representa un aporte para su recuperación.

Por ejemplo, las quemaduras graves se beneficiarían de la terapia celular al reemplazar y regenerar la piel dañada, aunque existen diversas propuestas terapéuticas, en la presente investigación se plantea la terapia con células autólogas (TCA). Para tales fines, se requiere de tejido del paciente a través de una biopsia y la muestra se procesa para la obtención de cultivos celulares *in vitro*, que posteriormente serán reintroducidas en el paciente a través de un injerto<sup>8</sup>. En primera instancia, se puede entender que se trata de una terapia personalizada, mínimamente invasiva<sup>9</sup>.

Por ende, el objetivo general de la presente investigación consiste en Describir la importancia del uso de los cultivos celulares de queratinocitos y fibroblastos autólogos para trasplantes de piel en pacientes con quemaduras de tercer y cuarto grado. Siendo los objetivos específicos, Explicar las características citológicas y moleculares de los queratinocitos y fibroblastos, Determinar los factores que inducen al crecimiento celular y Especificar el protocolo para la obtención de cultivos de queratinocitos y fibroblastos autólogos.

La importancia de la investigación documental se basa en el aporte de conocimiento, además, al tratarse de una técnica de cultivo *in vitro* de células del propio paciente disminuye el riesgo de incompatibilidad del injerto. En consecuencia, la compatibilidad celular minimiza el riesgo de reacciones inmunológicas, y transmisión de enfermedades asociadas con el injerto de otros donantes<sup>8</sup>. Si bien es cierto que se trata de una técnica laboriosa y costosa los beneficios reportados han respaldado su uso, por ende, la formación de profesionales de la histotecnología en esta área pueden aportar a la resolución de problemas que impacten en la salud de los pacientes, a través del cultivo celular y tisular en beneficio de los pacientes quemados.

## DESARROLLO

Durante los últimos años, el perfil profesional del Histotecnólogo ha incluido una serie de técnicas inherentes a la bioingeniería tisular, donde se resaltan los cultivos celulares y tisulares como estrategias terapéuticas. Tradicionalmente el profesional de la Histotecnología se ha circunscrito en el área de la anatomía patológica para el procesamiento de los tejidos con fines diagnósticos, no obstante, se han incorporado otras competencias con base en la tecnología y los avances científicos<sup>10</sup>.

Con base en lo anterior, el profesional de la histotecnología estará en la capacidad de realizar los cultivos celulares y tisulares autólogos *in vitro* bajo la supervisión del jefe de laboratorio, previo entrenamiento en el área. Es decir, podrá realizar el protocolo de la técnica, así como el control de calidad del cultivo celular a través de la tinción de las células con azul de tripan, el cual permitirá observar aquellas células no viables durante el recuento celular.

Entrando en materia, para el tratamiento de los pacientes quemados, el desbridamiento quirúrgico autólogo o extracción de un injerto de piel de espesor parcial ha sido el estándar para el tratamiento de las quemaduras<sup>11</sup>, no obstante presenta diversas limitantes, siendo la más importante la disponibilidad de piel para cubrir áreas con una superficie corporal quemada mayor al 50%, en consecuencia, se reduce la piel disponible para cubrir esa área afectada<sup>6</sup>.

Por tal razón, el avance de las técnicas de bioingeniería tisular se ha enfocado en diversas investigaciones para una cicatrización de la herida en un corto tiempo, que permitan reducir la inflamación, prevenir infecciones y limitar la contracción tisular. Actualmente las investigaciones se enfocan en la reducción de autoinjertos de piel para el tratamiento de las quemaduras extensas por cultivo de células bajo condiciones controladas y su posterior injerto en el paciente. En consecuencia, a través de la bioingeniería tisular se han diseñado protocolos para la creación de sustitutos de piel autólogo<sup>12</sup>.



Además, se ha descrito que la TCA se ha utilizado con éxito en la cicatrización de heridas a medida que contrarresta la inflamación crónica, tratar quemaduras y úlceras, así como mejoría de la cicatrización postoperatoria<sup>8</sup>, incluso se ha utilizado para la terapia personalizada en pacientes con tumores<sup>13</sup>. Estas células o material autólogo se puede utilizar como tratamiento independiente o en compuesto con otros materiales biosintéticos, principalmente para facilitar la adherencia de la células y dar inicio al proceso de reepitelización<sup>14,15</sup>.

A pesar de lo anterior, esta técnica tiene sus desventajas, por los altos costos, viabilidad del proceso por la contaminación, además el uso de los queratinocitos y fibroblastos no subsanan los problemas de la pigmentación de la piel por ausencia de melanocitos, así como la necesidad de apéndices pilosos o dérmicos, según sea el caso. Incluso existiendo factores a considerar como la variabilidad del paciente<sup>16</sup>.

Aunque, la tendencia actual es el cultivo autólogo compuesto, es decir, incluyendo otros elementos celulares a nivel dérmico. Por ejemplo, Dearman et al.<sup>17</sup> explican que los estudios preclínicos han demostrados recientemente la incorporación exitosa de melanocitos, células endoteliales microvasculares y folículos pilosos. En resumen, los queratinocitos y los fibroblastos son los tipos celulares más utilizados, sin embargo, las investigaciones están explorando el uso de otros tipos celulares para el cultivo de células que permitan asemejar la piel nativa<sup>18</sup>.

A continuación, se explica el proceso de regeneración de la piel para comprender la importancia del cultivo de queratinocitos y fibroblastos. La curación de la piel es un proceso sistemático, que tradicionalmente incluye cuatro fases clásicas superpuestas, 1) hemostasia (coagulación), 2) inflamación (infiltración de células mononucleares), 3) proliferación (epitelización, fibroplasia, angiogénesis y formación de tejido de granulación) y 4) maduración (depósito de colágeno o formación de tejido cicatrizal)<sup>19-21</sup>.

Entonces, el proceso de cicatrización requiere la migración de los queratinocitos que involucra un proceso de remodelación y contracción, todo este proceso mediado por factores de crecimiento que estimulan la migración de queratinocitos<sup>22</sup>. Por tal razón, la TCA considera el uso de estas células como parte de la terapéutica para el tratamiento de las quemaduras que requieran injerto, por lo cual existe una serie de elementos moleculares que sirven de andamio para la cicatrización o reepitelización de las quemaduras.

Con base en lo anterior, un estudio publicado durante el año 2021 en Australia por Dearman et al.<sup>17</sup> realizaron una revisión documental de los avances en la bioingeniería de tejidos cutáneos durante los últimos años, resaltando los avances científicos que han facilitado la reducción del tiempo para la reepitelización a través del uso de células autólogas y biopolímeros, considerando necesario que las nuevas terapias dermoepidérmicas cuenten con una supervisión y seguimiento de los casos para demostrar su seguridad y eficacia.

En un segundo estudio publicado por Sierra et al.<sup>18</sup> durante el año 2021 en España, a través de una investigación documental se resalta la importancia de los sustitutos epiteliales de tejidos autólogos, donde el cultivo de células madres de queratinocitos y fibroblastos debe ir a la par de otras líneas celulares como melanocitos y células del sistema inmune, para tales fines se deben diseñar nichos específicos dentro de los biomateriales con el propósito de incrementar el potencial de estas células para un proceso de reepitelización en un plazo de tiempo corto.

En un tercer estudio publicado por Francis et al.<sup>15</sup> durante el año 2019 en Irlanda, reportaron la utilidad de las células madres, porque estas aceleran el proceso de cicatrización de las quemaduras, por varios mecanismos, dentro de estos se encuentran la angiogénesis, los depósitos de colágenos y la formación de tejido de granulación, como se ha mencionado en párrafos anteriores. La importancia de esto se basa en la capacidad de atención de los pacientes con quemaduras a través de terapias con células autólogas para inducir la reepitelización, reducir la fibrosis y mejorar la cicatrización, además de reducir el riesgo de infecciones.

En un cuarto estudio publicado por Mcheik et al.<sup>23</sup> durante el año 2014 en Francia, reportan el uso de las suspensiones de células trasplantadas directamente a la herida en el caso de las quemaduras de tercer grado, siendo un proceso que no requiere la adherencia a una membrana antes de la transferencia, por lo cual se rocían las células sobre la piel y se cubren con un apósito. Esta técnica en comparación con el cultivo de tejidos reduce el tiempo de espera y los costos asociados. Por tal razón, desde entonces se ha utilizado esta técnica como una terapia en pacientes quemados.

En un quinto estudio publicado por Chrapusta et al.<sup>24</sup> durante el año 2014 en Polonia, reportaron el uso de tres técnicas, la primera se utilizó injerto de piel de espesor parcial en malla (denominado grupo SSG) con un cierre completo de las heridas en 12,7 días, la segunda técnica utilizada fue el uso de los queratinocitos autólogos cultivados (denominados grupo CAC) con un tiempo de cierre de heridas de 14,2 días en comparación con el anterior. Por último, una tercera técnica fue la combinación de ambas (grupo SSG + CAC), con un tiempo de cierre de 8,5 días.

En el mismo orden de ideas, Chrapusta et al.<sup>24</sup> concluyen que el uso de los queratinocitos cultivados después de una multiplicación de corto tiempo, combinados con injerto de piel de espesor parcial autólogos mallados, constituyen el cierre óptimo de las heridas en niños quemados<sup>24</sup>. Sin embargo, como se explicó en antecedentes anteriores<sup>15,17,18,23</sup>, la tendencia actual es el uso de las células autólogas cultivadas, rociadas en la lesión y el uso de un apósito. Aunque represente una mayor tiempo de espera, minimiza las lesiones en el tejido sano.

## CARACTERÍSTICAS CITOLÓGICAS Y MOLECULARES DE LOS QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS

Histológicamente la piel se divide en dos capas, la más externa o superficial es la epidermis, esta capa posee un epitelio plano estratificado queratinizado y a nivel celular el 90% corresponde a los queratinocitos que proliferan en su base y se diferencian progresivamente, a medida que se desplazan hacia la superficie, el resto de las células corresponden a las células de Langerhans, células epiteliales táctiles (Merckel) y melanocitos, que están separados de la dermis subyacente por una membrana basal. Por otro lado, la segunda capa corresponde a la dermis, esta se encuentra constituida por tejido conjuntivo (fibroblastos), vasos sanguíneos, glándulas sebáceas y sudoríparas, nervios, folículos pilosos y otras estructuras<sup>22,25</sup>.

De manera específica, los queratinocitos sufren una evolución morfológica desde el tracto basal, presentan una morfología diversa durante su proceso de maduración, con un tiempo de vida media de un mes. Estas células, son producidas por las células madre de queratinocitos (CMQ), estas se encuentran ancladas en la membrana de la unión epidermíca-dérmica, por lo cual forman estratos con escasa matriz extracelular y un grosor con un espesor que oscila entre los 50  $\mu\text{m}$  y 1 mm. Durante ese proceso de maduración ocurre la queratinización del epitelio<sup>26</sup>.

A nivel molecular, las CMQ expresan K5, K14 y p63, proteínas encargadas de la estratificación epitelial, la foliculogénesis del cabello y la reparación de heridas<sup>27</sup>, es decir, estas son responsables de la regeneración diaria de las diferentes capas de la epidermis. Además, la expresión de la integrina beta-4 es necesario para la regulación de la polaridad y la motilidad de los queratinocitos, lo cual media la adhesión célula-matriz o célula-célula. Por tal razón, las integrinas  $\alpha 6 \beta 4$  y  $\alpha 3 \beta 1$  se unen a la laminina, mientras que  $\alpha$  y  $\beta 6$  se une a fibronectina y tenascina, uniones esenciales para el proceso de reepitelización, ya que la laminina, fibronectina y tenacina son componentes de la matriz esencial en el lecho de la herida<sup>28-30</sup>.

Por otro lado, los fibroblastos son células jóvenes y activas metabólicamente, con un citoplasma basófilo con núcleo ovoide y pálido, posee finos granos de cromatina, nucléolo prominente, abundantes retículos endoplasmáticos rugoso y aparato de Golgi. A nivel morfológico, son alargados y fusiformes, a con forma estrellada. Su función, es la síntesis y secreción de fibras de colágeno, elásticas y reticulares, así como glicosaminoglicanos<sup>31</sup>. Estas células son un componente celular importante de la dermis de la piel.

A nivel molecular, estas células poseen un citoesqueleto muy diferenciado, proteínas como la actina y la actinina  $\alpha$  se concentran en la periferia celular donde también se observa miosina. La actinina  $\alpha$  admite que la actina se ancle a la membrana plasmática interna mediante su unión con proteínas de transmembrana del tipo integrinas. Las integrinas en su porción extracelular permiten la conexión de estas células con el colágeno o con proteínas de adhesión, como las fibronectinas de la matriz extracelular, proporcionando fuerza e integridad a la dermis<sup>32</sup>.

Con base en lo anterior, se puede evidenciar la importancia de la presencia de los queratinocitos y fibroblastos para la síntesis de la membrana basal y la unión celular, a través de enlaces moleculares que anclan la epidermis celular a la matriz extracelular de la dermis<sup>17</sup>. Es decir, existirá una base de colágeno y glicosaminoglicano para la unión celular. Además de las propiedades para la cicatrización y rejuvenecimiento de la piel, minimizando las cicatrices defectuosas de las heridas<sup>33,34</sup>.

## FACTORES QUE INDUCEN AL CRECIMIENTO CELULAR

Los queratinocitos secretan una serie de moléculas que contribuyen de forma transitoria a las respuestas inflamatorias y la cicatrización de las heridas, estas células controlan el comportamiento de los fibroblastos durante la cicatrización de heridas a través de la secreción, activación e inhibición de citocinas y factores de crecimiento. Estas moléculas secretadas ejercen efectos autocrinos y paracrinos, por lo cual contribuyen a la cicatrización y restauración de las heridas por quemaduras<sup>18,35</sup>.

Entonces, desde el punto de vista funcional las células tienen receptores glicoproteicos que se encuentran en la membrana que permiten la transducción de señales, uno de los receptores de la superficie celular de mayor importancia en los cultivos *in vitro* de queratinocitos y fibroblastos es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF)<sup>22</sup>. Este factor envía un mensaje a nivel celular que desencadena una compleja cascada de señalización celular que induce una capacidad mitogénica, es decir, ocurre un proceso de división celular.

El EGF por sus siglas en inglés es un polipéptido de 53 aminoácidos y 6 residuos de cisteína que le confieren tres puentes de disulfuro que son fundamentales para tener afinidad con los receptores que se encuentran en la membrana, este factor se encuentra en plaquetas, macrófagos y fluidos como el plasma, por lo tanto se relaciona con la protección, mantenimiento y regeneración de epitelios mediante la unión del factor y del receptor de membrana. Este factor inicia con cambios bioquímicos que permitirán controlar la migración y proliferación de fibroblastos por otro lado interviene en la adhesión<sup>20</sup>.

Por otro lado, hay factores como la IGFs (IGF: factor de crecimiento insulínico) incluidos como en la familia de factores semejantes a la insulina en estructura y función, pero poseen moléculas de mayor tamaño que las de la insulina en cultivos *in vitro*. Se demostró que los IGFs son factores mitogénicos que requieren acción previa de factores como PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) el cual aumenta la concentración de IGF-I en las células en cultivos, dichos factores promueven la proliferación de células entre las cuales se encuentra el queratinocito<sup>36</sup>.

El PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas) es producido por células endoteliales y estimula la migración y proliferación de fibroblastos. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) está relacionada con el heparán sulfato, y permite almacenamiento de factores inactivos estimulando la angiogénesis, reparación de heridas, y hematopoyesis. El FGF estimula el crecimiento de queratinocitos *in vitro* estimula la producción de VEGF, favorece resistencia celular. Conviene destacar que estos factores, están acompañados del efecto de las citocinas, las cuales son una clase de proteínas de señalización que se utilizan ampliamente en comunicación celular, la función inmunológica y la embriogénesis, por lo tanto los fibroblastos producen citocinas que estimula la síntesis de proteoglicanos sulfatados, colágeno, migración de queratinocitos y de fibroblastos<sup>20</sup>.

El factor de crecimiento transformante TGF- $\alpha$  promueve desarrollo de células epiteliales, y tiene similitudes con el EGF, mientras que el TGF -  $\beta$  tiene como función la estimulación de las quimiotaxis que tienen los fibroblastos, al igual que el colágeno, fibronectina y proteoglicanos que permiten la inhibición de colágeno. Por otra parte, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un inductor de angiogénesis y es producida por los queratinocitos<sup>36</sup>.

Como se pudo observar, los factores de crecimiento son sustancias que ayudan a generar la proliferación y estimular la diferenciación celular, además de que mantienen la supervivencia del cultivo. Existe una variedad de estas sustancias debido a que provienen de la sintetización de diferentes células por lo que puede cambiar su función; sin embargo, el uso de estas en un cultivo celular es para controlar la expansión de este crecimiento, siendo importante ya que así se puede determinar el nivel de células que se desean crear<sup>21</sup>.

Por último, no se puede dejar de mencionar que los factores anteriormente mencionados están estrechamente relacionados con el mantenimiento, alimentación y todos sus requerimientos como temperatura, presión de CO<sub>2</sub>, además de mantener los niveles de calcio, formado por un grupo macromoléculas polipeptídicas las cuales presentan acciones específicas, que comprenden desde la regulación, proliferación, muerte, y diferenciación de células. Es decir, existen una serie de factores que se deben considerar durante el cultivo de células *in vitro*<sup>37,38</sup>.

## **PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTÓLOGOS**

Para iniciar, es importante aclarar, que existe el cultivo de tejidos propiamente para realizar un injerto de láminas en capa, pero se han publicado una serie de desventajas asociadas a este proceso, por ejemplo la lentitud del proceso, uniones dermoepidérmicas anormales y su alto costo. Por tal razón, la tendencia se basa en el cultivo de células en suspensión obtenidas de un fragmento de tejido del paciente<sup>39</sup>. Es decir, un cultivo primario que se obtiene a través de un fragmento de tejido donado por el propio paciente (autólogo) y el cual se somete a una serie de procesos para su crecimiento celular bajo condiciones controladas.

El primer paso se basa en la extracción del tejido, es decir, se obtienen muestras a través de biopsias de piel sana de espesor total (2 x 2 cm hasta 6 x 3 cm, según disponibilidad), la toma de esta biopsia debe hacerla personal médico utilizando una técnica de fragmentación inicial, la cual tenga dermis, epidermis y tejido celular subcutáneo obtenidas de forma estéril con el uso de un bisturí, la biopsia de debe obtener predominantemente de las áreas con la mayor cantidad de folículos pilosos (ingle, axila y abdomen)<sup>40</sup>.

El material extraído se lava con solución salina y se almacena en un medio de transporte de Roswell Park Memorial Institute (RPMI), el cual proporciona nutrientes al tejido. Estas muestras deben ser enviadas al laboratorio de cultivo celular para el aislamiento de queratinocitos del tejido (biopsia), siendo necesario mantener la muestra a una temperatura aproximada de 4°C. Una vez en el laboratorio, las muestras se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) mezclada con penicilina 100 µg/mL. La epidermis y dermis se separan, y se cortan en fragmentos pequeños (0,5 x 0,5 cm).

### **Cultivo de queratinocitos**

Los fragmentos de epidermis se incuban durante la noche en una solución de proteasas (dispasa 13,7 mg/mL de medio Eagle modificado de Dulbecco-DMEM, este medio permite un mayor mantenimiento de las células *in vitro*, mientras que la dispasa disocia suavemente los tejidos, liberando las células con un daño celular mínimo<sup>41</sup>). Posteriormente los



fragmentos digeridos se lavan nuevamente con PBS, por último los fragmentos de epidermis se colocan en tripsina al 0,25% y Versene® 1:5000 EDTA<sup>40</sup>.

Los queratinocitos se obtienen por centrifugación y se siembran en un medio de queratinocitos exento de suero (con L-glutamina) con 25 µg/mL de extracto de pituitaria bovina y 1 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, luego se cultivan a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo celular se cambia cada dos días. Cuando las células se vuelven confluentes en un 70-75%, se subcultivan separándolas de la placa de cultivo con tripsina al 0,25% y Versene® 1:5000 EDTA y se lavan con una solución de DMEM, suero de ternera fetal y antibiótico. Por último, las células se separan, se cuentan con azul tripán y se preparan como 1x10<sup>6</sup> células viables/ 1 mL de PBS<sup>40</sup>.

#### Cultivo de fibroblastos

Los fragmentos de la dermis se incuban durante dos horas con colagenasa tipo I al 0,10% durante 2 horas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Después se lavan con PBS y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos y el sedimento se añade a pocillos con medio DMEM con alto contenido de glucosa, suplementando con suero bovino al 10%. El medio se cambia cada 2 días. Al alcanzar un 80-90% de confluencia, las células se separan con tripsina al 0,25% y se subcultivan en un recipiente. Después de 3-4 semanas, se aíslan los fibroblastos y se suspenden en 1 mL de PBS para el trasplante<sup>42</sup>.

Posterior al cultivo de las células, el tratamiento consiste en retirar la cubierta temporal y se realiza un desbridamiento del tejido con un chorro de agua o un bisturí. Se rocía sobre la superficie la suspensión celular de queratinocitos y fibroblastos, los cuales se han mezclado con un pegamento de fibrina, cubriéndose la zona con un apósito<sup>43</sup>, cada área debe ser evaluada y fotografiada para ver los cambios durante el proceso de cicatrización<sup>40</sup>. Por último, durante los cultivos celulares se deben realizar controles para detectar micoplasmas, hongos y contaminación bacteriana, así como la calidad de las células (recuento celular, viabilidad, análisis morfológicos, inmunofenotipificación, entre otras)<sup>44</sup>.

## CONCLUSIONES

Finalmente en este trabajo de investigación hemos sido capaces de concluir que, en el área médica la regeneración de la piel es esencial como otros procesos terapéuticos, más cuando en estos últimos años se han mejorado las técnicas y su estudio. El cultivo celular *in vitro* de células autólogas para injertos de piel, se considera como un avance tecnológico que ha venido a mejorar el trabajo de los profesionales de la salud y la calidad de vida del paciente.

Ahora bien, las quemaduras son lesiones en los tejidos del cuerpo que pueden ser causadas por calor, sustancias químicas, electricidad o radiación, ocasionando una desnaturalización de las proteínas tisulares, trayendo como consecuencia la pérdida del tejido. Debido a esto se da la importancia del uso de los cultivos celulares de queratinocitos y fibroblastos autólogos para realizar trasplantes en el tejido afectado y poder lograr su recuperación para restablecer la función que ejerce como barrera de protección.

Por consiguiente, para lograr un injerto de piel que se genere a través de un cultivo celular *in vitro* se debe conocer las características citológicas y moleculares de los queratinocitos y fibroblastos para que la piel del paciente origine un epitelio plano estratificado queratinizado que sea capaz de cumplir con sus funciones. Asimismo, los factores que inducen el crecimiento celular; son sustancias que ayudan a generar la proliferación y estimular la diferenciación de estas células, además de que mantienen la supervivencia y las condiciones óptimas del cultivo, con base a lo anterior, al realizar el injerto se puede desarrollarse una cicatrización con defectos mínimos.

Por lo tanto, la regeneración del tejido dermoépidermico es posible gracias a la gran utilidad médica de este método clínico, además gestiona mejores resultados en función de las articulaciones y extremidades, siendo esto beneficioso para la salud del paciente. El éxito del uso de este método, radica en una buena integración del injerto, aumentado posibilidad de autoinjerto exitoso, disminuye el riesgo de pérdida de tejido como también rechazo por reacción inmunológica.

Cabe considerar, por otra parte que es una técnica laboriosa y costosa, comúnmente no utilizada debido a que los laboratorios para realizar estos procedimientos no son muy habituales. En general, los resultados de este estudio tienen un impacto positivo para la sociedad, y para profesionales de la histotecnología; es conveniente mencionar este aporte servirá a futuras investigaciones colocando en ventaja a nuestros profesionales, como también a nuestra casa de estudio.

## RECOMENDACIONES

Como la bioingeniería tisular es un área de constante investigación, requiere de un estudio que permite el crecimiento de los cultivos celulares con un número óptimo de células viables en un corto tiempo para minimizar el tiempo de espera de los pacientes quemados para su tratamiento. Por tal razón, la Universidad de Carabobo debe fomentar las investigaciones biomédicas enfocadas en las necesidades de la sociedad, en este particular, en materia de salud a través de líneas de investigación enmarcadas en el cultivo celular como terapia en diversos procesos patológicos.

Los autores estamos conscientes de los altos costos que puede generar esta terapia y la creación de un laboratorio dedicado a esta área, pero la formación de los profesionales de la histotecnología, así como otros profesionales de la salud y ciencias de la vida deben aportar a la sociedad a través de sus conocimientos, habilidades y destrezas, entonces cualquier inversión económica representará una inversión social y una oportunidad para vincular la academia con los centros de salud.

Por ejemplo, la Universidad de Carabobo queda cerca del Hospital Carabobo, al crear una alianza institucional se pueden desarrollar proyectos, y dentro de estos la creación de un laboratorio de cultivo de células y tejidos para la atención de pacientes quemados, entre otros. Además, con el tiempo la estandarización de los protocolos acortaría el tiempo de espera y los costos asociados a pesar que se trata de una terapia personalizada; por lo cual, esta investigación es un primer paso para develar una necesidad sentida a nivel nacional

## REFERENCIAS

1. Wong C, LeGrand C, Kinnerar B, Sobota R, Ramalingam R, Dye D, Raghunath M, Lane E, Coombe D. In vitro expansion of keratinocytes on human dermal fibroblast derived matrix retains their stem-like characteristics. *Scientific Reports*. 2019;9:18561. Doi: 10.1038/s41598-019-54793-9
2. Liz Z, Maitz P. Cell therapy for severe burn wound healing. *Burns Trauma*. 2018;6:13. Doi: 10.1186/s41038-018-0117-0
3. Jeschke M, van Baar M, Choudhry M, Chung K, Gibran N, Logsetty S. *Nature Publica Health Emergency Collection*. 2020;6(1):11. Doi: 10.1038/s41572-020-0145-5
4. World Health Organization Violence and Injury Prevention. *Burns*. Available online: [https://www.who.int/violence\\_injury\\_prevention/other\\_injury/burns/en/](https://www.who.int/violence_injury_prevention/other_injury/burns/en/)
5. Abril R. Quemaduras en pediatría. *Enfermería Investigativa*. 2018;3(1):53-58. Doi: 10.29033/ei.v3sup1.2018.09
6. Domaszewska A, Kryzanowska M, Czarnecka A, Siemionow M. Local treatment of burns with cell-based therapies tested in clinical studies. *Journal Clinical Medicine*. 2021;10(3):396. Doi: 10.3390/jcm10030396
7. Ramírez C, Ramírez C, González L, Ramírez N, Vélez K. fisiopatología del paciente quemado. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*. 2010;42(1):55-65.
8. Kazmi B, Inglefield C, Lewis M. Autologous cell therapy: current treatments and future prospect. *Wounds*. 2009;21(9):234-242.
9. Kwon S, Barrera J, Noishiki C, Chen K, Henn D, Sheckter C, Gurtner G. Current and emerging topical scar mitigation therapies for craniofacial burn wound healing. *Frontiers in Physiology*. 2020;11(916). Doi: 103389/fphys.2020.00916
10. Nuñez J, Calzolaio V. Fuentes de aprendizajes y criterios para la acreditación de competencias del personal de anatomía patológica. *Revista Electrónica de Investigación e Innovación*. 2020;5(2):8-20. Doi: 10.5281/zenodo.3759809
11. Schlottmann F, Bucan V, Vogt P, Krezdorn. A short history of skin grafting in burns: From the gold standard of autologous skin grafting to the possibilities of allogeneic skin grafting with immunomodulatory approaches. *Medicina*. 2021;57(3):225. Doi: 10.3390/medicina57030225
12. Boyce S, Simpson P, Rieman M, Warner P, Yakuboff K, Bailey J, Nelson J, Fowler L, Kagan R. Randomized, paired-site comparison of autologous engineered skin

- substitutes and split-thickness skin graft for closure of extensive, full-thickness burns. *Journal of Burn Care & Research*. 2017;38(2):61-70. Doi: 10.1097/BCR.0000000000000401
13. Tang Y, Xu Q, Yan M, Zhang Y, Zhu P, Li X, et al. Autologous culture method improve retention of tumors native properties. *Scientific Reports*. 2020;10:20455. Doi: 10.1038/s41598-020-77238-0
  14. Arno A, Smith A, Blit P, Al Shehab M, Gauglitz G, Jeschke M. Stem cell therapy: A new treatment for burns?. *Pharmaceuticals*. 2011;4(10):1355-1380. doi: 10.3390/ph4101355
  15. Francis E, Kearney L, Clover J. The effects of stem cells on burn wounds: a review. *International Journal of Burns and Trauma*. 2019;9(1):1-12.
  16. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, Dixit S, Sahu R, Pillai S, et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(4):789. Doi: 10.3390/ijms18040789
  17. Dearman B, Boyce S, Greenwood J. Advances in skin tissue bioengineering and the challenges of clinical translation. *Frontiers n Surgery*. 2021;8:640879. Doi: 10.3389/fsurg.2021.640879
  18. Sierra Á, Kim K, Blanco G, Arias S. Cellular human tissue-engineered skin substitutes investigated for deep and difficult to heal injuries. *Regenerative Medicine*. 2021;6:35. Doi: 10-1038/s41536-021-00144-0
  19. Guo S, DiPietro L. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*. 2010;89(3):219-229. Doi: 10.1177/0022034509359125
  20. Qing C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese Journal of Traumatology*. 2017;20(4):189-193. Doi: 10.1016/j.cjtee.2017.06.001
  21. Čoma M, Fröhlichová L, Urban L, Zajíček R, Urban T, Szabo P, Novák Š, et al. Molecular changes underlying hypertrophic scarring following burns involve specific deregulations at all wound healing stages (inflammation, proliferation and maturation). *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(2):897. Doi: 10.3390/ijms22020897
  22. Wang Y, Graves D. Keratinocyte function in normal and diabetic wounds and modulation by FOXO1. *Journal of Diabetes Research*. 2020;2020:3714704. Doi: 10.1155/2020/3714704
  23. Mcheik J, Barrault C, Levard G, Morel F, Bernad F, Lecron J. Epidermal healing in burns: Autologous keratinocyte transplantation as a standar procedure: Update and

perspective. *Plastic and Reconstructive Surgery- Global Open*. 2014;2(9):e218. Doi: 10.1097/GOX.0000000000000176

24. Chrapusta A, Nessler M, Drukala J, Nartoszewicz M, Madry R. A comparative analysis of advanced techniques for skin reconstruction with autologous keratinocyte culture in severely burned children: own experience. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2014;31(3):164-169. Doi: 10.5114/pdia.2014.43190
25. Fuchs E. Epithelial skin biology. *Current topics in developmental biology*. 2016;116:357-374. Doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.11.033
26. Narauskaite D, Vydmantaitė G, Rusteikaite J, Sampath R, Rudaityte A, Stašyte G, Aparicio M, Jekabsone A. Extracellular vesicles in skin wound healing. *Pharmaceuticals*. 2021;14(8):811. Doi: 10.3390/ph14080811
27. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annual review of cell and developmental biology*. 2006;22:339-373. Doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104357
28. Sehgal B, DeBiase P, Matzno S, Chew T, Claiborne J, Hopkinson S, Russell A, Marinkovich M, Jones J. Integrin  $\beta 4$  regulates migratory behavior of keratinocytes by determining laminin-332 organization. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(46):35487. Doi: 10.1074/jbc.M606317200
29. Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*. 2004;72(8):387-395. Doi: 10.1111/j.1432-0436.2004.07208005.x
30. Li F, Adase C, Zhang L. Isolation and culture of primary mouse keratinocytes from neonatal and adult mouse skin. *Journal of Visualized Experiments*. 2017;125:56027. Doi: 10.3791/56027
31. Mathew S, Roy S, Sen C. Collagen in wound healing. *Bioengineering*. 2021;8(5):63. Doi: 10.3390/bioengineering8050063
32. Chakrabarti S, Mazumder B, Rajkonwar J, Pathak M, Patowary P, Chattopadhyay P. bFGF and collagen matrix hydrogel attenuates burn wound inflammation through activation of ERK and TRK pathway. *Scientific Reports*. 2021;11:3357. Doi: 10.1038/s41598-021-82888-9
33. Thangapazham R, Darling T, Meyerle J. Alteration of skin properties with autologous dermal fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(5):8407-8427. Doi: 10.3390/ijms15058407
34. Guillaumat G. The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration. *Cells*. 2021;10(7):1729. Doi: 10.3390/celss10071729

35. Gauglitz G, Zedler S, Spiegel F, Fuhr J, Henkel G, Faist E. Functional characterization of cultured keratinocytes after acute cutaneous burn injury. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e29942. Doi: 10.1371/journal.pone.0029942
36. Sérgio L, Pereira F, Kenupp J, Jackson C, Pellizzon C. Cutaneous wound healing: An update from physiopatology to current therapies. *Life*. 2021;11(7):665. Doi: 10.3390/life11070665
37. Van Der Sanden B, Dhobb M, Beger F, Wion D. Optimizing stem cell culture. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2010;111(4):801-807. Doi: 10.1002/jcb.22847
38. Vis M, Ito K, Hofmann S. Impact of culture medium on cellular interactions in in vitro co-culture systems. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8:911. Doi: 10.3389/fbioe.2020.00911
39. Shpichka A, Butnaru D, Bezrukov E, Sukhanov R, Atala A, Burdukovskii V, Zhang Y, Timashev P. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Research & Therapy*. 2019;10:94. Doi: 10.1186/s13287-019-1203-3
40. Karlsson M, Steinvall I, Olofsson P, Thorfinn J, Sjöberg F, Astrand L, et al. Sprayed cultured autologous keratinocytes in the treatment of severe burns: a retrospective matched cohort study. *Annals of Burns and Fore Disasters*. 2020;33(2):134-142
41. Autengruber A, Gereke M, Hansen G, Henning C, Bruder D. Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function. *European Journal of Microbiology & Immunology*. 2012;2(2):112-120. Doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.2.3
42. Nilforoushzadeh M, Kazemikhoo N, Mokmeli S, Zare S, Dahmardehei M, Doost R, et al. An open-label study of low-level laser therapy followed by autologous fibroblast transplantation for healing grade 3 burn wounds in diabetic patients. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2019;10(1):7-12. Doi: 10.15171/jlms.2019.s2
43. Dinato M, Puzzi M, Rehder J, Batista F. Tissue therapy with autologous dermal and epidermal culture cells for diabetic foot ulcers. *Cell Tissue Bank*. 2012;13:241-249. Doi: 10.1007/s10561-011-9249-1
44. Oram Y, Turgut G. Autologous dermal filler derived from cultured dermal fibroblasts and plasma gel (fibrogel): one-year follow-up of a case. *Journal of cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2019;12(4):237-239. Doi: 10.4103/JCAS.JCAS\_122-19