

ARTÍCULO ORIGINAL

DISPOSITIVO DERMOEPIDÉRMICO AUTÓLOGO

PRODUCIDO POR INGENIERÍA DE TEJIDOS
PARA TRATAR LAS ÚLCERAS CRÓNICAS DE
MIEMBROS

AUTORES:

RUBÉN FÉLIX VELLETTAZ¹,
MARÍA VICTORIA LAVIGNE
DANIELA DOMINICI²,
MARÍA LAURA CORREA²

1. Departamento de flebología
y linfología, Clínica Colón,
Mar del Plata, Argentina.

2. Licenciada en Ciencias
biológicas, División de
bioingeniería,
CRAVERI SAIC, Argentina.

Conflicto de interés:

Licenciada en Ciencias
biológicas, División de
bioingeniería, CRAVERI SAIC,
Argentina.

Correspondencia:

Alberti 1197, Mar del Plata,
Argentina, CP:7600.
drubenvelletaz@hotmail.com

RESUMEN:

Cuando el proceso biológico de reparación se cronifica, la cicatrización se altera y se desarrollan úlceras denominadas *crónicas*. En heridas crónicas, las células vivas, los factores de crecimiento y las moléculas biológicamente activas son necesarios para reiniciar los mecanismos de reparación. Por tal motivo, se requieren tratamientos más eficaces para mejorar y acelerar los procesos de cicatrización. El objetivo de este estudio fue desarrollar un dispositivo dermoepidérmico autólogo (ADED) y para evaluar su eficacia y seguridad se llevó a cabo un estudio clínico en un modelo animal.

Palabras Clave: Úlcera crónica de miembros, sustitutos de piel, cicatrización de heridas, dispositivo dermo epidermico (DED)

ABSTRACT:

When the biological process of tissues repair becomes chronic, healing is transformed by developing chronic ulcers. In chronic wounds, living cells, growth factors and biologically active molecules are necessary to restart mechanisms of repairing ; therefore, more effective treatments are needed to improve and accelerate the healing process. The aim of this study was to develop an autologous dermoepidermal device (ADED), and to assess its effectiveness and safety in an animal model.

INTRODUCCIÓN

El aumento en la expectativa de vida conlleva la aparición de nuevas enfermedades y el incremento en la frecuencia de manifestaciones de patologías ya conocidas. Entre estas, las heridas crónicas pueden ser muy difíciles de tratar. En especial, las úlceras de miembros inferiores, causadas, principalmente, por enfermedad venosa, debido al aumento de la presión venosa e hipoxia. Los objetivos del tratamiento son incrementar el retorno venoso, desbridar la úlcera y estimular la cicatrización. Cuando el proceso biológico de reparación se cronifica, la cicatrización se altera y se desarrollan úlceras crónicas. Son necesarios tratamientos más eficaces para mejorar y acelerar los procesos de cicatrización. En heridas crónicas, las células vivas, los factores de crecimiento y las moléculas biológicamente activas son necesarios para reiniciar los mecanismos de reparación. Por estos motivos, los sustitutos de piel por bioingeniería representan la mejor opción terapéutica para la cicatrización de la úlcera crónica¹.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un dispositivo dermoepidérmico autólogo (ADED) y para evaluar su eficacia y seguridad se llevó a cabo un estudio clínico en un modelo animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo del dispositivo dermoepidérmico autólogo

Se obtuvieron queratinocitos y fibroblastos de biopsias de piel de cerdos (biopsias por *punch* de 4 mm). Luego del lavado de las muestras de piel con concentraciones crecientes de gentamicina, anfotericina, estreptomycin y penicilina, se separó enzimáticamente la epidermis de la dermis (Dispasa 2 mg/mL). Los queratinocitos fueron aislados utilizando una digestión enzimática con Tripsina 0,05%-EDTA 0,2% por 15 minutos a 37 °C. Las células obtenidas se sembraron sobre una monocapa de células 3T3-J2 inactivadas previamente por irradiación subletal. El dispositivo se cultivó en atmósfera controlada compuesta por 5% CO₂ a 37 °C (como fue descrito previamente por Rheinwald and Green²). Los fibroblastos fueron aislados por digestión enzimática con Tripsina 0,05%-colagenasa 1mg/ml por 30 minutos a 37 °C. Las células aisladas fueron cultivadas sobre un DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina 100 µ/ml y estreptomycin 100 µ/ml. Se obtuvieron muestras de sangre de 30 ml de cerdos por punción intracardiaca. La sangre se centrifugó a 3500 rpm por 12 minutos a 4 °C para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP), que se adicionó al cultivo de fibroblastos dérmicos (2x10⁷ células en 10 mL de plasma). La coagulación fue

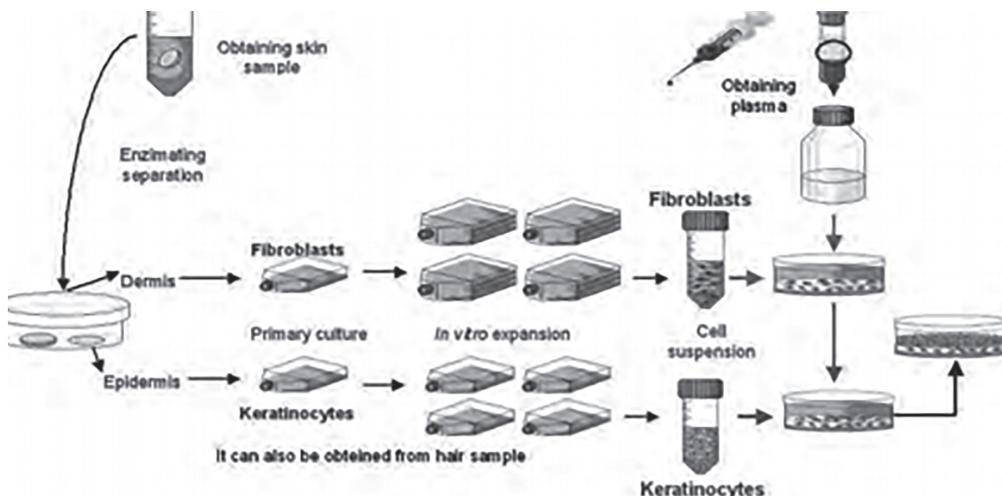


Figura 1. Resumen esquemático del procedimiento para obtener el dispositivo dermoepidérmico autólogo.

activada adicionando Ca^{2+}Cl . Antes de completarse la coagulación, se sembró el cultivo de fibroblastos en un soporte redondo que contenía una membrana permeable de 75 mm. Entre el 5^{to} y 7^{mo} día se sembraron los queratinocitos en gel y luego de 10 días se retiró el sobrenadante del medio para inducir la cornificación de las células epidérmicas. Las células se cultivaron por 10 días más. Un resumen del procedimiento se muestra en la Figura 1.

CARACTERIZACIÓN DEL ADED

Los ADED se fijaron en formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina. El análisis histológico para la evaluación de la histoarquitectura se realizó mediante tinción con HE. Se realizó inmunohistoquímica para establecer la formación de membrana basal (Colágeno Tipo IV (NOVOC, clon PHM- 12)), laminina (NOVOCASTRA, clon LAM- 89), dermis (vimentina (DAKO, clon V9)), epidermis (pancitoqueratinas (DAKO, clon AE1AE3)) y la ausencia de células de Langerhans (CD1A (DAKO, clon O10)). Se evaluó la potencia mediante la detección P63 (DAKO, clon 4 A 4), y se determinó el antígeno de proliferación nuclear Ki67 (DAKO, clon M1B- 1) para establecer el índice de proliferación. La oncogenicidad de las células cultivadas se evaluó utilizando pruebas en ágar blando y se chequearon mutaciones del oncogén N-ras en los codones 12 y 13.

PRUEBAS EN MODELOS ANIMALES

Los estudios en animales se realizaron de acuerdo a las *Guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio* (Publicación NIH N.º 85-3, Revisión 1985). Bajo anestesia se realizaron cortes de 3x3 cm de todo el espesor en la piel de cerdos (6 cortes en el dorso y 2 en cada miembro posterior). Se trasplantaron los ADED en 5 lesiones y las otras 5 quedaron como control. Todas las heridas se cubrieron con gasa vaselinada y, luego, con vendas (vendaje compresivo en miembros posteriores). A los 14 y a los 21 días, se tomó una muestra de tejido de cada lesión para el estudio histológico.

RESULTADOS

Fuimos capaces de generar un dispositivo dermoepidérmico autólogo a partir de una mínima biopsia de piel (Figuras 2A y 2B). No se observó oncogenicidad en el cultivo de queratinocitos y fibroblastos (luego de un máximo de 20 pasajes). Obtuvimos un tejido epidérmico completo, con cinco capas o más y cornificación incipiente. El linaje epidérmico se confirmó mediante pruebas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos panqueratina (AE1/AE3) (Figura 2C).

La ausencia de Langerhans fue confirmada por un CD1a negativo. La dermis fue positiva para vimentina y formada por al menos 80 células por 40x campo (Figura 2D). Se detectó la presencia de la membrana basal (Figuras 2E y 2F). El índice de proliferación epidérmico y dérmico fue del 50% (Figura 2G).

La tinción del tejido epidérmico fue positiva para p63 (Figura 2H) indicando la presencia de queratinocitos con capacidad proliferativa. Las pruebas de trasplante en animales para evaluar la tolerancia tisular no evidenciaron respuestas de rechazo agudo. El trasplante de ADED en cerdos aceleró el proceso de cicatrización en comparación con los controles (Figura 3). En la evaluación histológica se observó angiogénesis y reparación tisular (Figura 4).

DISCUSIÓN

En la actualidad, existen varios productos disponibles desarrollados como sustitutos epidérmicos³. La mayoría utiliza tejidos homólogos, que permiten una producción a gran escala y disponibilidad, pero conllevan el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas. El trasplante homólogo de queratinocitos mejora la cicatrización de heridas en los estadios iniciales, pero no se mantiene por más de un par de semanas⁴⁻⁶.

El sustituto epidérmico de dos capas ha sido reconocido como una estrategia terapéutica efectiva para la curación de heridas. El mecanismo de acción propuesto sería doble. Cubre la herida, evitando infecciones y pérdida de fluidos, pero también actúa estimulando la producción de citoquinas y factores de crecimiento. Esto promueve la angiogénesis y la proliferación de queratinocitos y fibroblastos en los bordes de las heridas⁷⁻⁸. Dado que los dispositivos dermoepidérmicos no permanecen en el tejido por un período prolongado⁹, la estimulación de la cicatrización, más que el reemplazo tisular, es probablemente el principal mecanismo de acción. Las moléculas más importantes que se demostró fueron estimuladas por el dispositivo son las citoquinas (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8), factores de crecimiento (TGF α , TGF β , bFGF), inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz (TIMPs) y proteínas de la matriz extracelular¹⁰. En úlceras crónicas hay un balance alterado entre estos factores, lo que favorece la actividad proteolítica y, por tanto, la inhibición del proceso de cicatrización. La aplicación de DDE en este contexto podría revertir esta situación⁹. El ADED representaría una solución para la cicatrización de heridas de

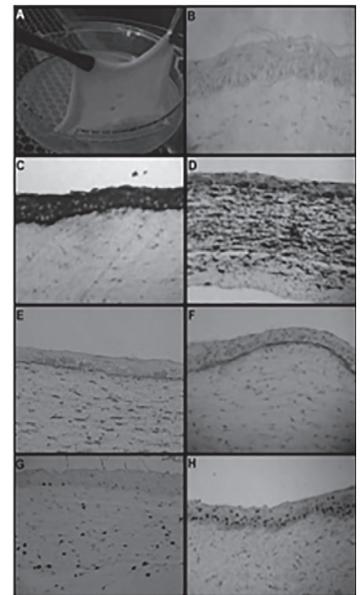


Figura 2. Características macro y microscópicas del dispositivo dermoepidérmico autólogo (ver descripción en el texto).

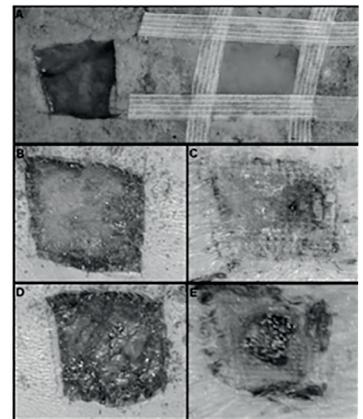


Figura 3. Evolución macroscópica del proceso de cicatrización espontáneo (A, B y D) versus cicatrización con el uso del dispositivo dermoepidérmico autólogo (A, C y E).

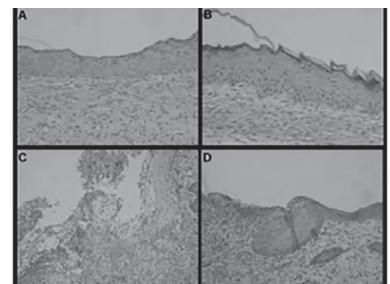


Figura 4. Angiogénesis y reparación tisular determinadas por histología.

acción rápida y costo efectiva, que acelera el proceso de cicatrización y disminuye la incidencia de infecciones y otras complicaciones de la herida.

CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado un método ADED reproducible con características estructurales y ultraestructurales compatibles con injertos de piel. Fue efectivo en el tratamiento de heridas quirúrgicas inducidas en cerdos. Las células se encuentran en fase de crecimiento y tienen alta viabilidad. Los sustitutos epidérmicos bicapa producen más factores extracelulares que la matriz biológica monocapa de PPP. Brinda un soporte óptimo para la proliferación y migración de las células involucradas en la cicatrización. El ADED se absorbe rápidamente, entre 7 y 14 días, y actúa como un potente estimulante en la cicatrización en vez de actuar como reemplazo tisular. El mecanismo de acción es proveer células "inteligentes" que modifiquen el microambiente molecular. Este es el primer sustituto tisular autólogo bicapa mundial producido por ingeniería de tejidos. ■

REFERENCIAS

1. Dini V, Romanelli M, Piaggese A, Stefani A, Mosca F. Cutaneous Tissue Engineering and Lower Extremity Wounds (Part 2). *Int J Low Extrem Wounds* 2006;5:27-34.
2. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331-43.
3. Ehrenreich M, Ruzszzak Z. Update on Tissue-Engineered Biological Dressings. *Tissue Eng* 2006;12:2407-24.
4. Shevchenko RV, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface* 2010;7:229-58.
5. Strande LF, Foley ST, Doolin EJ, Hewitt CW. In vitro bioartificial skin culture model of tissue rejection and inflammatory/immune mechanisms. *Transplant Proc* 1997;29:2118-9.
6. Supp DM, Boyce ST. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin Dermatol* 2005;23:403-12.
7. Sabolinski M, Alvarez O, Auletta M, Mulder G, Parenteau N. Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers. *Biomaterials* 1996;17:311-20.
8. Zaulyanov L, Kirsner RS. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clin Interv Aging* 2007;2:93-8.
9. Hu S, Kirsner RS, Falanga V, Phillips T, Eaglstein WH. Evaluation of Apligraf persistence and basement membrane restoration in donor site wounds: a pilot study. *Wound Repair Regen* 2006;14:427-33.
10. Milstone LM, Asgari MM, Schwartz PM. Growth factor expression, healing, and structural characteristics of Graftskin (Apligraf®). *Wounds* 2000;12:12A-19A.