

# Producción de equivalentes dermo-epidérmicos autólogos para el tratamiento de grandes quemados y cicatrices queloides

Miguel Concha M\*, Alejandra Vidal V\*, Christian Salem Z\*\*

## RESUMEN

*La piel tiene una función primordial en el control de la integridad del medio interno. En consecuencia, su pérdida en proporciones importantes como aquellas que ocurren en los grandes quemados, es incompatible con la vida. En las últimas décadas se han desarrollado diversos métodos que permiten reemplazar los principales componentes de la piel, epidermis y dermis, con equivalentes biológicos producidos in vitro. Es así como los queratinocitos autólogos pueden ser multiplicados en el laboratorio e inducidos a estratificarse, y el tejido dérmico ha sido homologado mediante matrices de biopolímeros de origen animal. El resultado del uso combinado de ambos procedimientos es un neotejido en que la estructura y la función cutánea han quedado preservadas. Los equivalentes epidérmicos poseen la ventaja de un notable rendimiento cuantitativo que permite obtener, en menos de tres semanas, importantes cantidades de epidermis autóloga. Los equivalentes dérmicos le confieren resistencia mecánica a los injertos y gradualmente facilitan su colonización y reemplazo por fibroblastos y células endoteliales del propio paciente. Además de analizar las bases biológicas de los equivalentes dermo-epidérmicos, en este artículo se da cuenta de los avances preliminares realizados en la introducción de esta técnica en el Hospital Clínico Regional de Valdivia. (Palabras claves/Key words: Substitutos epidérmicos autólogos/Autologous epidermal substitutes; Grandes quemados/Major burns; Queloides/Keloids).*

## INTRODUCCIÓN

Los traumas cutáneos, como las quemaduras, provocan importantes pérdidas de agua, electrolitos y proteínas desde el sitio injuriado. Simultáneamente, la herida queda expuesta a infecciones bacterianas. Sin embargo, el shock, la infección y las alteraciones metabólicas secundarias a la destrucción cutánea extensa, pueden ser manejadas con mejores resultados si la piel injuriada es reemplazada por sustitutos biológicos.

El desarrollo de equivalentes biológicos de la epidermis y dermis corresponde a uno de los objetivos clínicos prioritarios de la ingeniería de tejidos. Esta nueva área de la biomedicina utiliza

concepciones y métodos propios de la ingeniería para el desarrollo de órganos y tejidos de reemplazo que, en el caso de la piel, corresponden a su producción *in vitro* o incluso *in vivo*. La reconstrucción *in vitro* de la piel implica el aislamiento de queratinocitos de la epidermis del propio paciente y su multiplicación mediante técnicas de cultivo específicas; la reconstrucción de la dermis a partir de colágeno, glicosaminas y ocasionalmente fibroblastos; y finalmente, el crecimiento del equivalente epidérmico sobre la dermis reconstruida. Potencialmente, el compartimento epidérmico podría ser completado con melanocitos para asegurar la pigmentación normal de la piel injertada. En la piel sintética ideal todos los constituyentes tisulares, sus

\* Instituto de Histología y Patología Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

\*\* Instituto de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

relaciones espaciales y funcionales deben estar conservados, incluyendo las singulares propiedades estéticas de la piel. Los sustitutos actualmente disponibles permiten reemplazar la pérdida de piel en los quemados<sup>1</sup> o tratar heridas crónicas<sup>2</sup>. También han sido utilizados para corregir cicatrices hipertróficas o hiperpigmentadas<sup>3</sup>.

Sin embargo, conviene puntualizar que tradicionalmente se han utilizado diversos métodos quirúrgicos para restaurar la barrera defensiva cutánea dañada. La técnica usualmente más empleada corresponde al injerto de piel autólogo, que incluye epidermis y grados variables de dermis. Su utilización multifenestrada permite la máxima expansión de la piel disponible para el injerto. Sin embargo, las propiedades mecánicas y cosméticas de la piel injertada son pobres y a menudo evoluciona con cicatrización hipertrófica. Por otra parte, la disponibilidad de piel del área dadora es limitada y es causa, esta última, de molestias importantes para el paciente. El aloinjerto -entre individuos de una misma especie pero diferente constitución genética- o xenoinjerto -entre especies diferentes- así como la piel proveniente de cadáveres, proveen un medio de recuperación transitorio debido a que eventualmente todos ellos son rechazados. Otros materiales, tales como la aplicación de polímeros de polisiloxano (silicona) tienen la ventaja de una mayor accesibilidad clínica pero aún con la adición de componentes biológicos como proteoglicanos y colágeno, su duración en el sitio del implante es limitada. En síntesis, el problema esencial radica en la disponibilidad restringida de piel autóloga para el injerto, en mejorar su inserción y limitar el daño al área dadora.

Entre los métodos empleados para la preparación de equivalentes epidérmicos, probablemente el de mejor rendimiento corresponde al descrito entre los años 1975 y 1979 por Howard Green<sup>4-6</sup>. Este método fue introducido en nuestro laboratorio en la Universidad Austral de Chile en 1998, con el propósito de utilizarlo para investigar la participación de antígenos leucocitarios en la diferenciación del queratinocito<sup>7</sup>. Desde esa fecha, esta técnica ha sido utilizada de manera rutinaria con fines de investigación básica gracias a los aportes efectuados por la Dirección de Investigaciones de la Universidad Austral de Chile, el Fondo de Desarrollo de Ciencia y Tecnología (FONDECYT) y el Programa especial

FONDECYT Líneas Complementarias. Sin embargo, la experiencia adquirida y la infraestructura instalada han permitido utilizar, recientemente y de manera preliminar, cultivos epidérmicos con fines clínicos en el Hospital Clínico Regional de Valdivia.

## PRODUCCIÓN DE EPIDERMIS Y DERMIS *in vitro*

En 1953 Billingham y Reynolds<sup>8</sup> fueron los primeros en reconocer la importancia potencial de las '*láminas de epidermis pura*' o de las suspensiones de queratinocitos para cubrir zonas corporales con pérdidas extensas de piel. Sólo 22 años más tarde Rheinwald y Green<sup>4-6</sup> describieron el método homónimo que permite obtener colonias estratificadas de queratinocitos a partir de piel humana. Estos autores lograron asegurar la proliferación y crecimiento *in vitro* de los queratinocitos, hasta el estadio de formación de un epitelio estratificado, mediante el uso combinado de hidrocortisona, del factor de crecimiento epidérmico y fibroblastos murinos 3T3 irradiados. Los autores utilizaron en el medio de cultivo, además, diversos factores biológicos tales como insulina para facilitar la absorción de glucosa y aminoácidos; transferrina para la detoxificación del hierro; hidrocortisona que promueve la proliferación celular y la formación de contactos intercelulares; triyodotironina, que tiene acción mitogénica sobre los queratinocitos y la toxina colérica que activa el AMPc. Los fibroblastos irradiados contribuyen transitoriamente al crecimiento y adhesión de los queratinocitos mediante la producción de factores que en su mayor parte no son bien conocidos. Los medios de cultivo definidos que contienen bajos niveles de  $Ca^{+2}$  (0.1 mM) y que no utilizan suero humano o de animales ni factores indeterminados como los extractos de hipófisis de bovinos, inducen el crecimiento de queratinocitos en monocapa<sup>9</sup>. En estas condiciones estas células recuerdan funcionalmente a los queratinocitos del estrato basal epidérmico. En cambio, si se emplean medios de cultivos con niveles elevados de  $Ca^{+2}$  (2 mM) y suero fetal de bovino (10% v/v) se obtiene el crecimiento pluriestratificado de las células. En el método de Rheinwald y Green los queratinocitos son aislados de biopsias de piel mediante la digestión con tripsina en presencia del ácido [etilendiamina] tetra-acético (EDTA), un quelante de  $Ca^{+2}$ . La suspensión celular obtenida contiene

normalmente cierta cantidad de fibroblastos dérmicos, los cuales no entorpecen el cultivo de los queratinocitos. No obstante, para evitar el crecimiento excesivo de los fibroblastos, se prefiere como paso previo eliminar la dermis, separándola de la epidermis mediante tratamiento con dispasa. Es interesante mencionar que el uso clínico de los equivalentes epidérmicos autólogos sólo fue posible gracias al descubrimiento de la dispasa. En efecto, las uniones de las células al material plástico, sobre el cual se realizan los cultivos, son sensibles a dispasa pero ésta no afecta las uniones intercelulares<sup>7</sup>. Consecuentemente, los cultivos tratados con dispasa se despegan en forma de una lámina íntegra sin que ocurra su fragmentación.

Como resultado, estos procedimientos permiten expandir los queratinocitos en aproximadamente 10.000 veces su número inicial. Así, 2 cm<sup>2</sup> de piel donante son suficientes para cubrir una superficie corporal equivalente a 2 m<sup>2</sup>. Este sorprendente resultado constituye una de las bases fundamentales del interés clínico en los substitutos epidérmicos. Las células que previamente han proliferado *in vitro* pueden ser, además, conservadas indefinidamente en nitrógeno líquido, sin que ocurra pérdida de la viabilidad o alteraciones de sus características biológicas. Una vez '*despertadas*', y sembradas en los medios adecuados, reinician la proliferación y el crecimiento. Esta propiedad y las resiembras sucesivas permiten la preparación de los equivalentes epidérmicos suplementarios necesarios para un mismo individuo. La preparación de los cultivos tiene una demora media de 18 días si se realizan a partir de un cultivo primario, y de 10 días si son efectuados a partir de células congeladas.

La fiabilidad del método de Rheinwald y Green es elevada. Benathan y Labidi-Ubaldi<sup>10</sup> han señalado que de 65 preparaciones realizadas, sólo en cuatro casos detectaron anomalías en los equivalentes epidérmicos producidos. Dos de estos casos correspondieron a cultivos en los cuales la estratificación fue pobre; en los otros dos, las células revelaron signos de apoptosis. Estos autores, además observaron que no obstante la diferencia de tamaño entre las células de individuos jóvenes (20 años) e individuos de edad avanzada (60 años), ambos tipos de células no presentaban diferencias significativas, produciendo resultados similares.

Considerado desde una perspectiva clínica, el método de Rheinwald y Green presenta ciertamente dificultades. Las principales corresponden a la elevada fragilidad que los injertos de epidermis cultivada poseen en ausencia de equivalentes dérmicos, y al alto costo de los trasplantes. En efecto, los equivalentes epidérmicos se integran con resultados más pobres que los injertos autólogos clásicos. La experiencia clínica demuestra que la presión o fuerzas excesivas aplicadas sobre el injerto -especialmente en la espalda, nalgas, hombros y en la región posterior de los muslos- pueden tener desastrosos efectos sobre su adherencia. La inducción de flictenas mediante la aplicación de una bomba de succión demanda aproximadamente 65 minutos sobre la piel sana. Por el contrario, en la epidermis trasplantada sólo requiere unos 17 minutos<sup>11</sup>. Esta diferencia ha sido explicada por el escaso desarrollo de los pliegues epidérmicos y por la defectuosa formación de fibrillas de anclaje que unen a los queratinocitos a la membrana basal<sup>11</sup>. Además, se ha observado que independientemente si el injerto epidérmico se integre bien o no, la herida sufre contracción especialmente si las quemaduras son de tercer grado. Respecto a los altos costos del tratamiento con equivalentes epidérmicos, Rue y col publicaron en 1993 una revisión acerca de los gastos efectivos en 16 pacientes norteamericanos<sup>12</sup>. El costo promedio ascendió a US \$43.705 para una superficie corporal tratada del 15,9%. Sin embargo, otros autores<sup>9</sup> señalan que el costo global de la preparación de un cultivo equivalía en Suiza, durante 1998, a US \$7.200. Por otra parte, se ha llamado la atención acerca del uso de productos animales potencialmente inmunogénicos, los cuales podrían contribuir a la pérdida del injerto<sup>9</sup>. Sin embargo, los fibroblastos murinos irradiados no sobreviven en los cultivos más de 4-5 días y el uso de suero humano AB desde los tres días anteriores al trasplante disminuye el riesgo que ciertas proteínas animales puedan acceder al paciente.

La dermis participa en diferentes procesos biológicos. Contribuye al soporte mecánico de las estructuras de la piel; sus componentes están involucrados en funciones defensivas, de nutrición y en la transmisión de señales nerviosas; provee elasticidad a la piel y confiere resistencia a las fuerzas de tracción. La dermis funciona, además, como un medio de anclaje para glándulas epiteliales y estructuras

queratinizadas como pelos y uñas. Durante la cicatrización la dermis favorece la rápida re-epitelización, inhibe la contracción de las heridas y mejora su resultado estético. Es por esta razón que los equivalentes dérmicos permiten la diferenciación de los queratinocitos de manera más eficiente y completa y aumentan notablemente la estabilidad mecánica de la epidermis trasplantada y sus propiedades cosméticas<sup>13</sup>. En el primer sustituto dermo-epidérmico doble utilizado, se emplearon queratinocitos en suspensión dispersos sobre una malla de colágeno que contenía además fibroblastos<sup>14</sup>. A partir de este modelo, se han desarrollado diversas variantes en dos capas, pero probablemente el modelo que ha demostrado mayor eficiencia clínica corresponde al diseñado por Yannas y Burke<sup>15</sup> (distribuido con el nombre de Integra®, Integra Lifesciences Corp, Plainsboro, NJ). Estos autores construyeron una matriz de colágeno de bovino covalentemente unido a condroitin-6-sulfato. La naturaleza porosa de la matriz obtenida, facilita su colonización desde el tejido granulatorio subyacente, en particular por fibroblastos que secretan su propia matriz, células endoteliales que efectúan la regeneración vascular, y por otras células que actúan también en el remodelado de la matriz original<sup>16</sup>. El modelo de Yannas y Burke consta además de una cubierta de silicona que impide el paso de bacterias y la pérdida de líquidos corporales. Inmediatamente después de la limpieza de la herida la dermis artificial es implantada, iniciándose su progresiva infiltración por tejido granulatorio. Cuando los cultivos epidérmicos han alcanzado la madurez apropiada, la capa de silicona puede ser removida y la neoepidermis es superpuesta sobre el implante dérmico.

### INTRODUCCIÓN CLÍNICA DE LOS EQUIVALENTES EPIDÉRMICOS

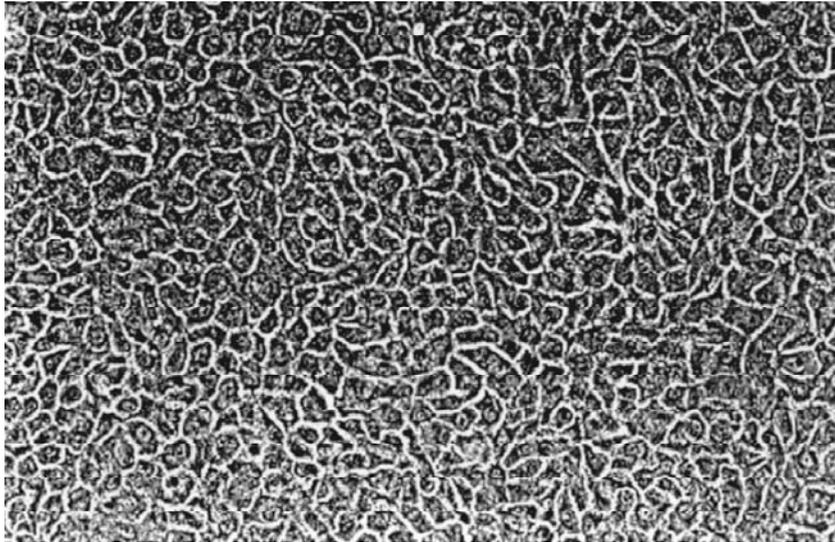
La paciente, mujer de 25 años, presentaba en su hombro izquierdo un queloide de antigua data, originado en área reactiva a vacunación por BCG. Una escisión y cierre quirúrgico primario, realizada a los 15 años de edad en su ciudad de origen, se acompañó de una recidiva precoz, con agravamiento clínico del queloide. Considerando la evidente predisposición de la paciente a cicatrización queloídea, la ubicación de la lesión y al antecedente de recidiva temprana post-cirugía, se evaluó la posibilidad

de efectuar una resección seguida de una cobertura con epidermis autóloga producida *in vitro*. En esta decisión se consideraron las evidencias clínicas que muestran que las áreas cruentas, post-cirugía de queloides y cubiertas con injertos de piel, no evolucionan a cicatrización queloídea con excepción de sus límites periféricos. Por lo demás, considerando que la formación de cicatrices hipertróficas y queloides podría estar influenciada por alteraciones de la epidermis inmediatamente adyacente<sup>17</sup>, existe la posibilidad que la neoepidermis posea un efecto control sobre futuras recidivas. Por otra parte, se descartó utilizar extirpación con cierre primario asociado a tratamiento con agujas de radioterapia, debido a que el tamaño y la ubicación de la lesión no permitían su realización. A la paciente se le informó de las alternativas terapéuticas, indicándole que la resección seguida de una cobertura con epidermis autóloga cultivada *in vitro* aún, si bien correspondía a un método en etapa de desarrollo experimental, constituía una buena opción, a lo cual ella entregó su consentimiento informado.

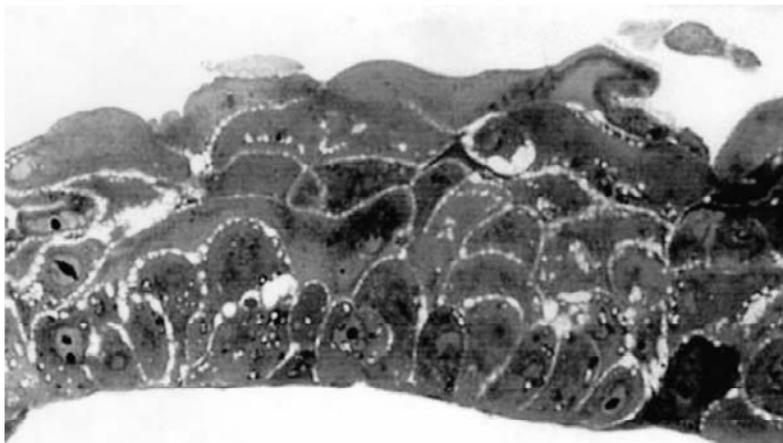
En una primera intervención se extirpó la lesión queloídea del hombro, dejando el área cruenta, afrontando sin tensión los bordes cutáneos a la profundidad y procediéndose a tomar una biopsia de piel sana de 2 x 2,5 cm de la cara interna de un muslo, en área cercana a la región genital, para prevenir secuelas estéticas. La biopsia fue procesada con tripsina 0.05% (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MA) en medio Hanks (Gibco BRL). Luego de separar la dermis de la epidermis, esta última fue disgregada y cultivada de acuerdo al procedimiento descrito por Rheinwald y Green<sup>5-7</sup>. Los queratinocitos se sembraron con fibroblastos 3T3 NIH irradiados en botellas de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> (Nalge Nunc, Naperville, IL). Se empleó medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco BRL), suplementado con factores de crecimiento, suero fetal de bovino 10% (Hyclone, Logan, UT) y antibióticos. El cultivo se realizó por 21 días a 37°C y en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Durante ese período los queratinocitos alcanzaron la confluencia y formaron un tapiz que ocupaba todo el fondo de la botella, exhibiendo el típico aspecto de 'camino empedrado' característico de células en activa proliferación (Figura 1). El epitelio formado presentó la apariencia propia de estos cultivos, es decir estaba organizado en los estratos basal,

intermedio y superficial (Figura 2). Es conocido que el estrato córneo, que está ausente durante la etapa del cultivo sumergido de las células, iniciará su formación una vez que las células injertadas entren en contacto con el  $O_2$  ambiental. Tres días antes del trasplante se eliminó el uso de tóxina colérica y el suero fetal de bovino fue reemplazado por el suero de la propia paciente. El día del trasplante los cultivos fueron despegados de la botella mediante dispasa II (Boehringer-Mannheim, Mannheim), lavados y trasladados a gasa parafinada

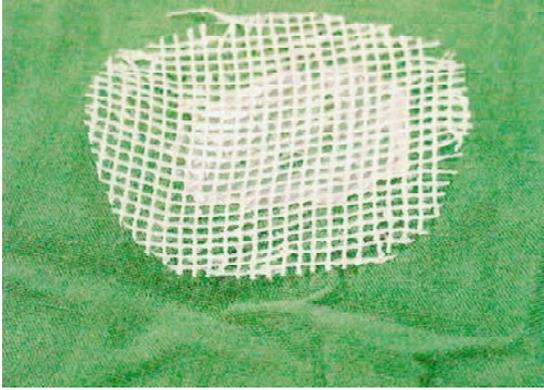
(Figura 3) (Paranet®, Vernon-Carus Limited, Preston, Lancashire, Inglaterra). La gasa con el cultivo de epidermis adherido fue adaptada al área receptora (Figura 4) y fijada mediante grapas. La zona fue cubierta con gasa húmeda, apósitos y Tensoplast®, manteniéndose esta curación durante 10 días para facilitar la queratinización de la epidermis y evitar daños al injerto. Tres semanas más tarde el injerto de epidermis estaba integrado en aproximadamente 90% (Figuras 5 y 6), lográndose luego de dos semanas adicionales la epidermización completa.



**FIGURA 1.** Apariencia de los cultivos de queratinocitos dos semanas antes de proceder al injerto autólogo 180X.



**FIGURA 2.** Imagen micrográfica de equivalente epidérmico de 10 días de cultivo (Inclusión en plástico, corte semifino. Azul de Toluidina 400X).



**FIGURA 3.** Equivalente epidérmico adherido a gaza parafinada Parane®.



**FIGURA 4.** Injerto adaptado al área receptora, antes de ser fijado y cubierto con apósitos.



**FIGURA 5.** Características de la lesión queloídea antes de su resección quirúrgica.



**FIGURA 6.** Apariencia del equivalente epidérmico tres semanas después de efectuado el injerto.

## CONCLUSIONES

A pesar que la estructura de la piel posee una aparente menor complejidad que otros órganos, su reemplazo por equivalentes epidérmicos y dérmicos ha tenido un lento desarrollo. No obstante, los resultados obtenidos con los substitutos actualmente disponibles son estimulantes. El éxito alcanzado por el método de Rheinwald y Green se explica por el notable rendimiento cuantitativo de la técnica, la cual permite obtener en menos de tres semanas importantes cantidades de epidermis autóloga, perfectamente viable. La primera experiencia de uso de un injerto de equivalentes epidérmicos autólogos, realizada en Valdivia, ha sido auspiciosa. Los resultados

alcanzados concuerdan, por lo demás, con la literatura internacional. Aunque el procedimiento realizado correspondió a una resección queloídea seguida de cobertura con epidermis autóloga cultivada *in vitro* -sin injerto de dermis artificial- la paciente ha tenido una buena evolución y luego de dos meses de seguimiento no muestra a la fecha signos de recidiva.

El interés de los autores es continuar este trabajo cooperativo, junto a otras instituciones del ámbito nacional público y privado, de manera tal de estandarizar el uso combinado de cultivos epidérmicos autólogos y equivalentes dérmicos para el tratamiento de grandes quemados, de cicatrizaciones hipertróficas y otras patologías. Con este fin se ha alcanzado un acuerdo preliminar para una asociación estratégica con el

Hospital del Trabajador y un laboratorio privado internacional que distribuye equivalentes dérmicos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Roberto Yulis por su dedicación y gentileza en la preparación del material fotográfico.

## REFERENCIAS

1. Krupp S, Benathan M, Meuli M, *et al*: Current concepts in pediatric burn care: management of burn wounds with cultured epidermal autografts. *Eur J Pediatr Surg* 1992; 2: 210-5
2. Limat A, Mauri D, Hunziker T: Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 128-35
3. Gobet R, Raghunath M, Alternatt S, *et al*: Efficacy of cultured epithelial autografts in pediatric burns and reconstructive surgery. *Surgery* 1997; 121: 654-61
4. Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-44
5. Rheinwald JG, Green H: Epidermal growth factor and multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 1977; 265: 421-4
6. Green H, Kehinde O, Thomas J: Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5665-8
7. Concha M, Vidal MA, Moreno I, *et al*: The remodeling and differentiation of human epidermis is modulated by CD40. *Br J Dermatol* 2002. (enviado a publicación)
8. Billingham RE, Reynolds J: Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. *Br J Plast Surg* 1953; 5: 25-36
9. Pomahač B, Svensjö, Yao F, Brown, Eriksson E: Tissue Engineering of skin. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 333-44
10. Benathan M, Labidi-Ubaldi F: Substituts épidermiques et dermo-épidermiques vivants pour le traitement des grands brûlés. *Rev Med Suisse Romande* 1998; 118: 149-53
11. Woodley DT, Peterson HD, Herzog SR, *et al*: Burn wounds resurfaced by cultured epidermal autografts show abnormal reconstitution of anchoring fibrils. *J Am Med Assoc* 1988; 259: 2566-71
12. Rue LW III, Cioffi WG, McManus WF, Pruitt BA: Wound closure and outcome in extensively burned patients treated with cultured autologous keratinocytes. *J Trauma* 1993; 34: 662-8
13. Kangesu T, Navsaria HA, Manek S, Fryer PR, Leigh IM, Green CJ: Kerato-dermal grafts: the importance of dermis for the in vivo growth of cultured keratinocytes. *Br J Plast Surg* 1993; 46: 401-9
14. Bell E, Ivarsson B, Merrill C: Production of a tissue like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1274-8
15. Yannas IV, Burke JF: Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res* 1980; 14: 65-81
16. Yannas IV, Burke JF, Orgill DP, Skrabut EM: Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. *Science* 1982; 215: 174-6
17. Niessen FB, Andriessen MP, Schalkwijk J, Visser L, Timens W: Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J Pathol* 2001; 194: 207-16