

Cultivo *in vitro* de células de piel canina para su aplicación en tratamientos veterinarios

Culture of canine epithelial cells for veterinarian therapy

Irene Gómez-Murillo¹, Maritza Guerrero-Barrantes², Laura A. Calvo-Castro³, Carolina Centeno-Cerdas⁴, Miguel Rojas-Chaves⁵

Fecha de recepción: 11 de febrero del 2014

Fecha de aprobación: 6 de junio del 2014

Gómez-Murillo, I; Calvo-Castro, L.A.; Centeno-Cerdas, C. Cultivo *in vitro* de células de piel canina para su aplicación en tratamientos veterinarios. *Tecnología en Marcha*. Edición especial Ingeniería de Tejidos. Pág 27-32.

1 Ingeniera en Biotecnología. Escuela de Biología. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ire.go.08@gmail.com.

2 Bióloga. Máster en Ecología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-2479. Correo electrónico: mguerrero@itcr.ac.cr.

3 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Microbiología. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ancalvo@itcr.ac.cr.

4 Ingeniera en Biotecnología. Máster en Ciencias Biomédicas. Profesora de la Escuela de Biología e Investigadora del Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9027. Correo electrónico: ccenteno@itcr.ac.cr.

5 Microbiólogo. Doctor en Biquímica. Profesor-Investigador de la Escuela de Biología y Coordinador del Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Teléfono: (506) 2550-9406. Correo electrónico: mirojas@itcr.ac.cr.

Palabras clave

Fibroblastos; ingeniería de tejidos; fibrinógeno; trasplante celular.

Resumen

En este artículo se presenta el caso clínico de un paciente canino con un trauma a nivel de piel, que fue tratado mediante un trasplante heterólogo en una matriz gelificada de fibrinógeno con fibroblastos cultivados *in vitro*. La aplicación de fibroblastos en el paciente logró una mejoría notoria con respecto a la disminución del tamaño de la herida y la ausencia de reacciones alérgicas y efectos adversos frente al tratamiento. Esta experiencia abre las puertas para un desarrollo en la investigación en el área de ingeniería de tejidos veterinaria con fines terapéuticos en Costa Rica.

Keywords

Fibroblasts; tissue engineering; fibrinogen; cellular therapy.

Abstract

We present the clinical case of a canine patient with a cutaneous trauma. The injure was treated with a heterologous transplant of *in vitro* cultured fibroblasts on a fibrinogen-based matrix gel. This resulted on a noticeable reduction on the wound size and the patient did not present any allergic reactions or adverse effects to the treatment. This experience opens an opportunity for the development of the veterinary Tissue Engineering area with therapeutic applications in Costa Rica.

Introducción

En las últimas décadas se han desarrollado numerosos modelos de cultivo *in vitro* que permiten la reconstrucción de tejidos animales a partir de cultivos celulares para diferentes propósitos (Ponec, 1992; Serra *et al.*, 2007; Nilforoushzadeh, Esfahani, Fesharaki, Siadat y HaftBaradaran, 2010; Groeber, Holeiter, Hampel, Hinderer y Schenke-Layland, 2011; Yang y Xiong, 2012).

Uno de los tejidos más estudiados en este campo ha sido la piel, debido a su importancia para la supervivencia como capa protectora ante cambios de temperatura, radiación, trauma, infecciones e invasión de microorganismos. A pesar de la fuerte estructura que conforma este órgano, su funcionalidad puede ser afectada negativamente por quemaduras, enfermedades, accidentes, infecciones y procesos de envejecimiento, privando al individuo de una de sus principales barreras ambientales.

Es así que surge la necesidad de crear sustitutos que cumplan con eficacia las funciones antes mencionadas (Chen, Przyborowski y Berthiaume, 2009).

El desarrollo de cocultivos organotípicos de queratinocitos y fibroblastos se ha realizado en diversas especies, siendo útiles en la investigación dermatológica, en estudios biológicos y fisiológicos de la piel, en pruebas de toxicidad, en sustitutos de piel y para uso farmacológico (Ponec, 2002; Groeber *et al.*, 2011; Yang y Xiong, 2012). Aunque la incorporación de estos modelos en la clínica regenerativa canina no ha sido el eje principal de las investigaciones, sí se ha evaluado su utilización en la medicina regenerativa veterinaria (Serra *et al.*, 2007).

Las ventajas del cultivo celular *in vitro* de piel incluyen la facilidad de obtención de células deseadas a partir de una pequeña muestra de tejido sano del paciente, lo cual permite el aislamiento, cultivo y expansión de estas células en el laboratorio, con el fin de que puedan sobrevivir y ser trasplantadas al paciente. Por otro lado, aunque de preferencia se recomienda el trasplante celular autólogo (de un mismo individuo), también es posible realizar tratamientos con células heterólogas (de un individuo de la misma especie) (Groeber *et al.*, 2011). El propósito de este estudio consistió en la implementación de un sistema de cultivo *in vitro* y trasplante de células de la piel, con el fin de mejorar la calidad de vida de un paciente veterinario.

Presentación del caso

El paciente fue un canino hembra de raza no definida de aproximadamente tres años de edad, que presentaba un trauma de 10 cm de ancho por 11,7 cm de largo en la zona lateral derecha del cuerpo. Bajo anestesia total y en condiciones asépticas, se procedió a tomar una muestra de piel del paciente para establecer los cultivos primarios necesarios para un posterior trasplante. La muestra se trasladó al Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, donde fue procesada con protocolos basados en los procedimientos del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo, España), así como de la Unidad de Traducción Clínica del Hospital Universitario Austral (Buenos Aires, Argentina) y de la Unidad de Medicina Regenerativa del CIEMAT (España), donde los autores de este trabajo recibieron diversas capacitaciones. Sin embargo, debido a que la paciente presentaba una seborrea oleosa, no fue posible obtener un cultivo primario autólogo. Alternativamente, se utilizó un cultivo primario de fibroblastos de otro paciente veterinario de la misma especie, utilizando los mismos protocolos.

El cultivo primario se obtuvo a partir de un fragmento de tejido de piel (dermis y epidermis) de un canino sano, mediante un protocolo aséptico y bajo anestesia general. Luego de pasar por un tratamiento de desinfección para eliminar los contaminantes ambientales, se separó la dermis de la epidermis mediante incubación con colagenasa (1 mg/ml). Para obtener células individuales, el tejido dérmico se disgregó con esta misma enzima y tratamientos mecánicos. Finalmente, las células se cultivaron a 37 °C, 5% de CO₂ en un ambiente de alta humedad, utilizando el medio de cultivo DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (SIGMA), 2% de glutamina (4 mM, GIBCO), 1% de penicilina-estreptomicina (10 000 u/ml penicilina G, 10 000 µg/ml de sulfato de sulfato de estreptomicina; GIBCO) y 1% de piruvato de sodio (0.11 mg/ml, SIGMA), a un pH final de 7,5-7,7.

Los fibroblastos obtenidos se cultivaron en monocapa hasta alcanzar 70-80% de confluencia. Las células fueron suspendidas mediante el método enzimático con tripsina-EDTA (Freshney, 2010). Estas células se diluyeron en solución salina con dextrosa al 5% para el trasplante. Por cada trasplante se colocaron aproximadamente 2 x 10⁶ células. Cabe mencionar que durante todo el periodo de cultivo *in vitro* de las células, el animal fue médicamente tratado según el protocolo estándar del hospital veterinario, donde el paciente fue atendido. Para ello, se le aplicó glucosa y antibiótico (cefalexina) sobre la herida para evitar infecciones. Además, la aplicación del trasplante celular fue hecha por personal médico veterinario calificado.

La herida tenía más de un mes de evolución y presentó una medida de 11,7 cm x 10 cm al momento en que se procedió a realizar el primer trasplante celular. Para ello, se preparó un gel a base de fibrinógeno (obtenido a partir de plasma canino) en el hospital veterinario, manteniendo condiciones asépticas. Se aspiró 1 ml de aire en la jeringa, se tomó el plasma junto con las células y se agitó. Posteriormente, se aspiró una mezcla de Ca²⁺/trombina para inducir la coagulación, se mezcló rápidamente y se colocó sobre la lesión. El gel tomó la consistencia adecuada de viscosidad entre 10 y 30 segundos después de que se realizó la mezcla.

Tras la colocación del gel, se cubrió la herida con gasa vaselinada y se vendó al animal, procurando que el vendaje se mantuviera por un lapso de 2-3 días. Después de este período, la herida se mantuvo sin vendaje, lavándola con solución salina de manera delicada cada dos días hasta la siguiente aplicación. El gel con fibroblastos se aplicó una vez por semana a lo largo de siete semanas, periodo tras el cual se observó una reducción significativa en el tamaño de la herida (figura 1). Durante este procedimiento no se le aplicó ningún otro medicamento sobre la herida, con el fin de que no afectar los resultados del estudio.

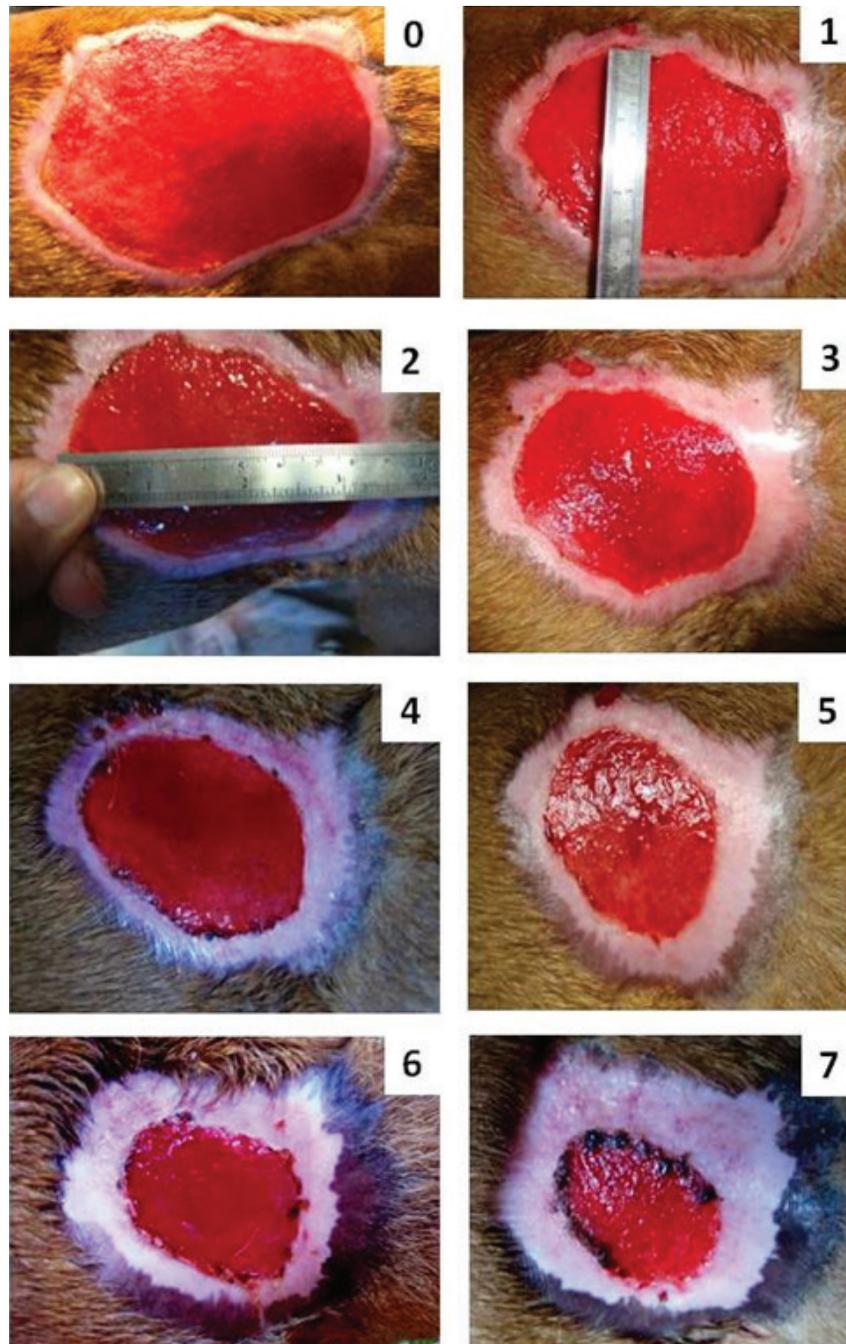


Figura 1. Evolución del proceso de cicatrización de la herida a lo largo de siete semanas, indicadas en la esquina

superior derecha de cada imagen en el panel. Nótese la presencia de tejido de granulación sano durante todo el tratamiento, así como la colonización de vellos y melanocitos en los bordes de la lesión.

Para conocer la mejoría de la paciente durante el tratamiento, se midieron los parámetros de temperatura, peso, estado de ánimo, ritmo cardíaco y examen sanguíneo, observables tanto al inicio como al final del tratamiento para comparar el avance durante el procedimiento. Al comparar al estado corporal antes y después del tratamiento (cuadro 1) se observó una mejoría notoria, sobre todo en el estado de ánimo del animal, así como mayor actividad física.

Cuadro 1. Parámetros medibles de la condición corporal de la paciente canina antes y después de la terapia celular.

PARÁMETRO	CONDICIÓN INICIAL	CONDICIÓN FINAL
Peso	23,4 kg	33 kg
Temperatura	38,8 °C	38,5 °C
Estado de ánimo	Depresión	Normal/Condición alerta
Frecuencia cardíaca	121	124
Hematocrito	20%	33%

Discusión

Durante el cierre de las heridas de la piel se dan varios procesos, los cuales incluyen diferentes respuestas celulares para permitir la formación de una matriz extracelular por parte de los fibroblastos. La colocación del gel en el sitio de la lesión hace que las plaquetas interactúen con la matriz extracelular lesionada, para ejecutar procesos en los que se fomenta la formación de coágulos a través de la inducción de trombina y fibrina, mientras que la síntesis del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) ayuda a promover la migración y proliferación de los fibroblastos en el sitio de la lesión (Cárdenas, Garzón y Peinado, 2010). El uso del gel también favorece la constitución de un estroma provisional para el ingreso de los fibroblastos, a la vez que la secreción de proteínas como el colágeno y la fibronectina ayudan a construir la nueva matriz extracelular (Reinke y Sorg, 2012) donde estos se establecerán.

Los resultados demostraron una reducción visible en el tamaño de la herida, así como una mejoría en el estado anímico y fisiológico general del animal. Además, al final del tratamiento se observó crecimiento de vello en la zona de la herida, lo cual se ha demostrado que indica una mejoría de la zona dañada (Pavletic, 1991).

Conclusiones

La terapia celular constituye una opción prometedora para utilizar como tratamiento de heridas en la piel de caninos. Este trabajo demostró resultados satisfactorios que posibilitan el heterotrasplante (y en consecuencia también el autotrasplante) de células para la regeneración de heridas de caninos en Costa Rica.

Es importante hacer un seguimiento constante del paciente animal con el fin de que el tratamiento pueda permanecer en el sitio de aplicación por más tiempo, posibilitando una recuperación más rápida y efectiva del canino.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Organismo Internacional de Energía Atómica y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del ITCR por el apoyo financiero que permitió la ejecución de este trabajo. Además, agradecemos al Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo, España), a la Dra. Marcela del Río de la Unidad de Medicina Regenerativa (CIEMAT-UC3M) (España), y a la Dra. Alicia Lorenti, de la Unidad de Traducción Clínica del Hospital Universitario Austral (Buenos Aires, Argentina), por la capacitación en los protocolos descritos en este trabajo.

Bibliografía

- Cárdenas, R., Garzón, D. & Peinado, L. (2010). Modelo matemático del proceso de migración de fibroblastos en la lesión del ligamento. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 29(1), 1-10.
- Chen, M., Przyborowski, M. & Berthiaume, F. (2009). Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Crit Rev. Biomed. Eng*, 37(4-5), 399-421.
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6 ed. New Jersey, EUA: John Wiley & Sons.
- Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S. & Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering: *In vivo* and *in vitro* applications. *Advance Drug Delivery Reviews*, 128(2011), 352-366.
- Nilforoushzadeh, M., Esfahani, M., Fesharaki, M., Siadat, A. & HaftBaradaran, E. (2010). Treatment of Recalcitrant Electrical Burn Ulcer with Application of Topical Trichloroacetic Acid and Autologous Cultured Fibroblast. *Cell & Tissue Transplantation & Therapy*, 3, 1-4.
- Pavletic, M. (1991). Anatomy and Circulation of the Canine Skin. *Microsurgery*, 12, 103-112.
- Ponec, M. (1992). *In vitro* cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *International Journal of Cosmetic Science*, 14, 245-264.
- Ponec, M. (2002). Skin constructs for replacement of skin tissues for *in vitro* testing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(S1), 19-30.
- Reinke, J. & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49, 35-43.
- Serra, M., Brazis, P., Puigdemont, A., Fondevila, D., Romano, V., Torre, C. & Ferrer, L. (2007). Development and characterization of a canine skin equivalent. *Experimental Dermatology*, 16, 135-142.
- Yang, Z. & Xiong, H. (2012). *In vitro*, Tissue-Based Models as a Replacement for Animal Models in Testing of Drugs at the Preclinical Stages. En: L. Ceccherini-Nelli (Ed.), *Biomedical Tissue Culture*. InTech, DOI:10.5772/52300.