



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

---

UNIDAD IZTAPALAPA  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Posgrado en Biología Experimental

**“Integración de Células de Langerhans en un  
Equivalente Cutáneo con Base Dérmica de Fibrina”**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

**Maestra en Biología Experimental**

**P R E S E N T A:**

**Biól. Exp. Jessica Miriam Medrano Hernández**

**Codirectores:**

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Dr. Eduardo Casas Hernández

**Asesor:**

M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez



México, D.F.

Marzo, 2012.

## COMITÉ TUTORAL

Codirector

**Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez**

Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

castell@servidor.unam.mx

Codirector

**Dr. Eduardo Casas Hernández**

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

dino@xanum.uam.mx

Asesor

**M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez**

Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México

mike@liceaga.unam.mx

El programa de la **Maestría en Biología Experimental** de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I 309-1) pertenece al **Padrón de Posgrados de Excelencia CONACyTn (PNPC) registro 001481** y cuenta con apoyo del mismo consejo **Clave DAFCyT 2003IMPTNNN0020**.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunoterapia Experimental e Ingeniería en Tejidos del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM con apoyo **CONACYT 50396-M, DGAPA PAPIIT IN213510 e IN214109-3** y en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud UAM-Iztapalapa

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca **CONACYT** otorgada a la alumna Jessica Miriam Medrano Hernández con número de registro **CVU/Becario: 268388/224667**.

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión de posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada "**Integración de Células de Langerhans en un Equivalente Cutáneo con Base Dérmica de Fibrina**" con fecha de presentación para obtener el grado de Maestría el día 7 de Marzo del 2012.

**Dr. Mario García Lorenzana**

Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa



(Presidente)

**Dra. María Cristina González Torres**

Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa



(Secretario)

**M. en C. Gabriela Piñón Zárate**

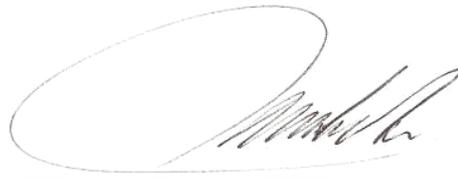
Departamento de Biología Celular y Tisular  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México.



(Vocal)

**M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez**

Departamento de Biología Celular y Tisular,  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México.



(Vocal)

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión de posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada “**Integración de Células de Langerhans en un Equivalente Cutáneo con Base Dérmica de Fibrina**” con fecha de presentación para obtener el grado de Maestría el día 7 de Marzo del 2012.

**Dr. Mario García Lorenzana**

Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

\_\_\_\_\_  
(Presidente)

**Dra. María Cristina González Torres**

Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

\_\_\_\_\_  
(Secretario)

**M. en C. Gabriela Piñón Zárate**

Departamento de Biología Celular y Tisular  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México.

\_\_\_\_\_  
(Vocal)

**M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez**

Departamento de Biología Celular y Tisular,  
Facultad de Medicina  
Universidad Nacional Autónoma de México.

\_\_\_\_\_  
(Vocal)

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa**.

Al jurado revisor de esta tesis:

**Dr. Mario García Lorenzana**

**Dra. María Cristina González Torres**

**M. en C. Gabriela Piñón Zárate**

**M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez**

A mi Comité Tutorial:

**Dr. Andrés Castell Rodríguez**

**Dr. Eduardo Casas Hernández**

**M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez**

Al laboratorio de Inmunoterapia Experimental e Ingeniería en Tejidos y al departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

Por contribuir en mi formación y por su asesoría técnica y académica:

**Biól. Beatriz Hernández Téllez**

**M. en C. Katia Jarquín Yáñez**

**M. en C. Gabriela Piñón Zárate**

**M. en C. Norma Cortés Lozano**

Por su apoyo técnico en histología y tinciones.

**T.H. Verónica Rodríguez Mata**

Por su apoyo técnico en microscopía electrónica.

**Biól. Armando Zepeda Rodríguez**

Por su asesora y apoyo técnico en el manejo del Irradiador Gamma Cell-1000

**Q.F.B. Carlos Castellanos Barba**

## DEDICATORIAS

*A mis padres Margarita y Jacinto,*

*A Diana, José y Luis mis  
queridos hermanos,*

*A mi latoso Arturo y a su mamá Soledad,*

*A mis amigos y compañeros: Gaby,  
Katy, Bety, Rodri, Marlene, Pau, Dani,  
Norma, Karlita, Ana Laura, por que  
supimos compartir penas y gloria,*

*A Jorge mi compañero, mi mejor  
amigo y mi gran amor.*

*“La naturaleza crea nuevas formas eternamente. Lo que hoy es, nunca antes fue. Lo que fue, nunca mas será... cada una de sus creaciones tiene su propio ser, cada una representa un concepto, aunque en conjunto, ellas sean una sola”.*

*W. Goethe 1749-1832.*

*“Aprendan el ABC de la ciencia antes de intentar ascender a sus alturas. Nunca aborden el siguiente paso sin haber dominado el precedente. Nunca intenten cubrir las lagunas en su conocimiento ni por las más atrevidas conjeturas e hipótesis; aunque los colores de ésta pompa de jabón puedan agradar a la vista, inevitablemente estallara dejándoles en ridículo. Entréñense a ser discretos y pacientes, aprendan a hacer el trabajo manual de la ciencia. Estudien, comparen y acumulen hechos.”*

*I. Pavlov 1849-1936.*

## ÍNDICE

I. Abreviaturas

II. Resumen

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Piel	1
1.1.1 Dermis	1
1.1.2 Epidermis	3
1.1.2a. Histología y estructura de la epidermis	3
1.1.2b. Tipos de células de la epidermis	5
1.2 Células de Langerhans (CL)	6
1.2.1 Histología y ultraestructura	6
1.2.2 Ciclo biológico	9
1.2.3 Métodos de estudio	12
1.2.3a. Aislamiento	12
1.2.3b. Diferenciación	13
1.2.4 Nuevos modelos de estudio de CL	15
1.3 Ingeniería de tejidos	16
1.3.1 Ingeniería de piel	17
1.3.2 Fibrina como biomaterial	17
1.3.3 Fibrina y su uso en la ingeniería de piel	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. METODOLOGÍA	22
5.1 Extracción de queratinocitos y fibroblastos a partir de piel de ratón	25
5.2 Obtención de fibroblastos 3T3 para cultivo de queratinocitos	25
5.3 Obtención de snGMCSF a partir de células CHO	27
5.4 Diferenciación de células dendríticas a partir de médula ósea (MO)	28
5.4.1 Citometría de flujo	28
5.4.2 Separación de CL y CD por Súper MACS	29
5.4.3 Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	29

5.5 Evaluación de geles de fibrina	30
5.6 Construcción de geles de fibrina con queratinocitos y fibroblastos y/o CL.	31
5.7 Determinación de la permanencia de CL implantadas <i>in vivo</i>	32
5.7.1 Inmunohistoquímica	33
5.8 Evaluación de la presencia de CL en co-cultivos con queratinocitos y fibroblastos	35
5.8.1 Inmunofluorescencia	35
5.9 Análisis estadístico	36
6. RESULTADOS	37
6.1 Rendimiento celular	37
6.1.1 Cultivo Primario de Queratinocitos (CPQn)	37
6.1.2 Cultivo Primario de Fibroblastos (CPFb)	38
6.1.3 Cultivo y diferenciación de células dendríticas (CD) y CL	38
6.2 Fenotipo de CL diferenciadas en cultivo	42
6.3 Degradación de fibrina en cultivo	43
6.4 Equivalentes cutáneos de fibrina con fibroblastos y queratinocitos	46
6.5 Presencia de CL en co-cultivos con queratinocitos y fibroblastos	48
6.6 Determinación de la permanencia de CL implantadas <i>in vivo</i>	50
7. DISCUSIÓN	53
8. CONCLUSIONES	62
9. PERSPECTIVAS	63
10. REFERENCIAS	64

## I. ABREVIATURAS

APC	Aloficocianina
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
CD	Células dendríticas
CHO	Células de ovario de hámster chino
CL	Células de Langerhans
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPFb	Cultivo Primario de Fibroblastos
CPQn	Cultivo Primario de Queratinocitos
Cy5	Cianina 5
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Medio Minino Esencial Modificado de Dulbecco
DOPA	Dihidroxifenilalanina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
FACS	Clasificación Celular Activada por Fluorescencia.
Fc	Fracción cristalizable
FGF-10	Factor de crecimientos de fibroblastos 10
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersión frontal
GM-CSF	Factor de Crecimiento de Colonias de Granulocitos Macrófagos
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hanks
HE	Tinción Hematoxilina- Eosina
ICAM	Moléculas de Adhesión Celular
IgG	Inmunoglobulinas G
IL 1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
KGF	Factor de Crecimiento de Queratinocitos
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido
MFb	Medio para Crecimiento de Fibroblastos
MHCI	Complejo Principal de Histocompatibilidad I
MHCII	Complejo Principal de Histoconpatibilidad II
MO	Médula ósea
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
Pe	Ficoeritrina
QC	Medio de Crecimiento de Queratinocitos
Qn	Medio de Siembra de Queratinocitos
SBF	Suero Bovino Fetal
snGMCSF	Sobrenadante de Factor de Crecimiento de Granulocitos Macrófagos
SSC	Tamaño de la dispersión
TGF $\alpha$	Factor de Crecimiento Transformante alfa
TGF $\beta$	Factor de Crecimiento Transfómate beta
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

## II. RESUMEN

En la epidermis se localizan las células de Langerhans (CL) que son células presentadoras de antígenos. Es necesario establecer un método de estudio rentable en el cual las CL estén aisladas sin la interferencia de otras células del sistema inmune, para así poder evaluar los procesos tempranos de su respuesta inmunológica. Se han logrado progresos notables en la construcción de sustitutos de piel en el laboratorio mediante ingeniería tisular. La fibrina ha sido utilizada en la construcción de equivalentes cutáneos aprovechando la facilidad con que se obtiene y su interacción con las células dérmicas y epidérmicas. En el presente trabajo se planteó evaluar el potencial de un equivalente cutáneo con base dérmica de fibrina como un posible modelo de estudio de CL. Para lo cual fibroblastos y queratinocitos de ratón fueron extraídos y expandidos en cultivo y se diferenciaron células de médula ósea (MO) de ratón para producir CL y CD. La diferenciación se evaluó por FACS obteniendo células positivas para CD207, MHCII, CD11c, E-cadherina y CD205 que indican un fenotipo de CL, por otro lado la baja expresión de CD80 y CD40 demostró que las células no estaban activadas. Se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de plasma (40%, 60 %, 80%, y 80%/Agarosa 0.1%) para evaluar la disminución del volumen del gel de fibrina dando como resultado que el plasma al 80%/Agarosa 0.1% se conserva mejor, aun así, permaneció la pérdida del volumen de la fibrina en cultivos con densidades celulares altas. En las muestras que se procesaron para HE y Masson se observó la formación de un epitelio pero este no presentó integridad a lo largo de la superficie del gel. Se injertaron constructos cutáneos con CL sobre la zona dorsal superior de ratones, y estas se procesaron para realizar inmunohistoquímicas para evidenciar MHCII. La expresión de esta molécula en la epidermis indicó la presencia de las CL en la zona del injerto, no obstante los grupos se mantuvieron estadísticamente sin diferencia comparados con el grupo donde solo se sembraron queratinocitos. Por otro lado, CL o CD fueron sembradas con queratinocitos y fibroblastos sin la fibrina para evaluar la capacidad de las células de convivir en cultivo, se les realizó una inmunofluorescencia contra CD207 y se observaron células positivas en los grupos tanto de CL como de CD indicando que las células sembradas pueden adherirse a los cultivos e integrarse con los queratinocitos, así como diferenciarse desde precursores de CD. Estos resultados indican que la fibrina no puede soportar una gran densidad celular ni períodos largos de cultivo, y al mismo tiempo se demostró que es posible diferenciar y mantener CL en co-cultivo con queratinocitos.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 La piel**

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano con una superficie de entre 1.5 a 2.0 m<sup>2</sup> y con un peso aproximado de 8 a 10 kilos (Martinhão *et al.*, 2006), cuya función es constituir una interfase entre el medio interno y el externo del cuerpo, protegiéndolo contra fuerzas mecánicas como fricciones y del contacto de agentes químicos, radiaciones, cambios de temperatura y microorganismos. Además, la piel posee funciones metabólicas importantes como la síntesis de vitamina D, ser un reservorio de grasas, eliminación de desechos, equilibrio de electrolitos, secuestro de toxinas, manifestación de signos y síntomas de enfermedades sistémicas, y ser el asiento de receptores nerviosos (para sensaciones como el tacto, temperatura, presión, dolor) así como, estar involucrada en aspectos psicológicos como en la expresión de emociones, contacto afectivo, autoimagen y cosmética (Arvelo, 2007).

La piel está constituida por tres capas: la hipodermis, la dermis y la epidermis. La capa más interna es la hipodermis y está formada por tejido conjuntivo laxo y tejido adiposo, por lo que contribuye a los mecanismos de aislamiento térmico termorregulación y amortiguación mecánica (Metcalf y Ferguson, 2007).

#### **1.1.1 Dermis**

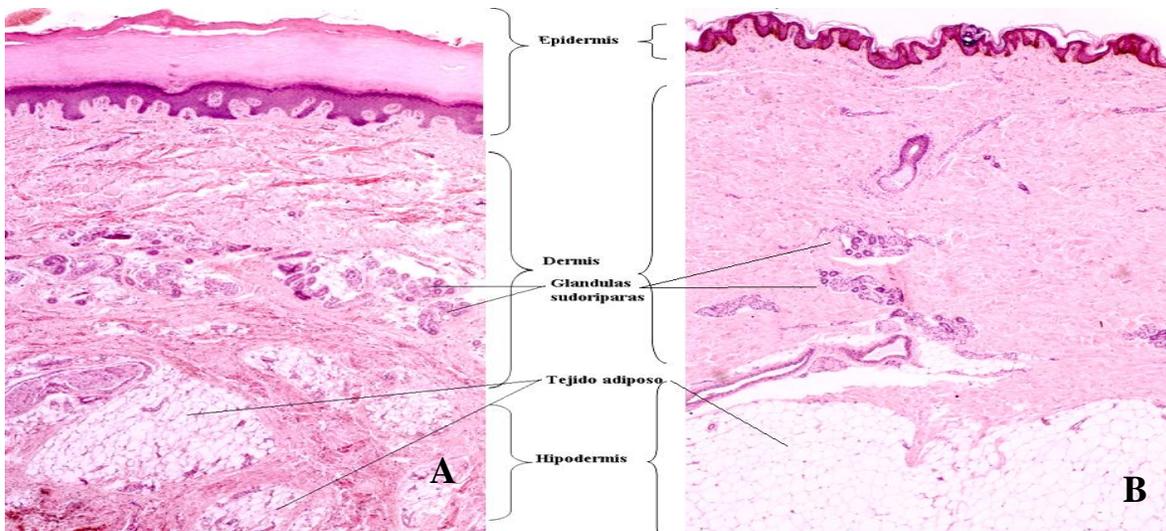
Sobre la hipodermis está situada la dermis que es la capa de la piel más gruesa, en su porción superficial es conocida como dermis papilar o estrato papilar, que está conformado de tejido conjuntivo laxo, gran cantidad de células como fibroblastos, adipocitos, macrófagos, mastocitos, linfocitos y células dendríticas dérmicas (CD) y una matriz extracelular con presencia de colágenas tipo I, III y V (Geneser, 2000), elastina así como abundantes glucosaminoglucanos. Por debajo de la dermis papilar y de mayor grosor se encuentra la dermis reticular o estrato reticular, el cual está conformado por

tejido conjuntivo denso irregular con gruesas fibras de colágena principalmente de tipo I. En esta capa están alojados los anexos cutáneos como son: las glándulas sudoríparas y los folículos pilosos con las glándulas sebáceas asociadas (Geneser, 2000; Ramírez-González *et al.*, 2009).

El tipo celular más abundante en la dermis son los fibroblastos, que en las tinciones con H-E (Hematoxilina y Eosina) se observan como células grandes, aplanadas o ahusadas, con finas prolongaciones, con citoplasma eosinófilo y debido a que la colágena a su alrededor es también eosinófila, a menudo sólo se distingue su núcleo oval que contiene uno o dos nucleolos y escasa cromatina muy granulada (Geneser, 2000). Los fibroblastos tienen un origen mesenquimatoso y pertenecen a una población de células muy heterogénea que se puede localizar en diferentes tipos de tejido conjuntivo (Wong *et al.*, 2007). Los fibroblastos de la dermis producen todos los elementos de la matriz extracelular y también son responsables de la síntesis de diversas proteínas como factores de crecimiento, citocinas, proteasas y colagenasas que regulan el crecimiento, remodelación y reparación dérmica (Martinhão *et al.*, 2006; Metcalfe y Ferguson, 2007). Tienen la capacidad de proliferar y migrar en respuesta a citocinas moduladoras y mitógenas, responden a interacciones paracrinas y autocrinas, al producir TGF $\beta$  y factores de crecimiento de tejido conjuntivo que tienen un efecto autocrino al promover la síntesis de colágena y la proliferación de los fibroblastos. Por otro lado, secretan factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), interleucina-6 (IL-6) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-10) cuya actividad paracrina tiene efectos sobre el crecimiento y diferenciación de queratinocitos (Wong *et al.*, 2007).

### 1.1.2 Epidermis

La epidermis está localizada sobre la dermis y es la capa más superficial, se encuentra constituida por un tejido epitelial plano estratificado con estrato córneo cuya principal función es la de proteger contra la pérdida de líquidos y contra acciones lesivas (Ross y Pawlina, 2007). El principal tipo celular de la epidermis son los queratinocitos que representan más del 90% de las células epidérmicas (Merad *et al.*, 2008) y sufren un proceso llamado queratinización y al irse diferenciando de manera gradual da como resultado la formación de varios estratos epidérmicos denominados estratos basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (Proksch *et al.*, 2008).



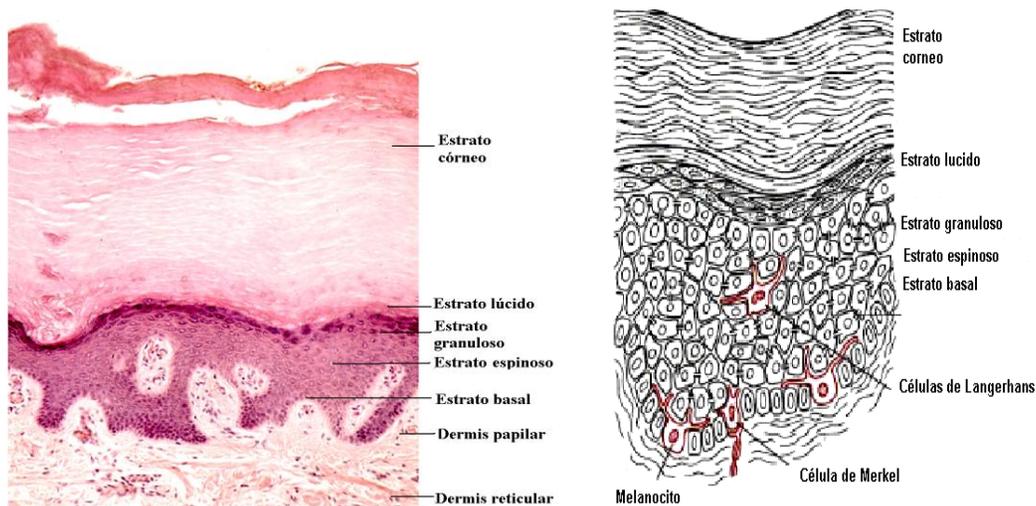
**Figura 1.** Comparación de cortes de piel gruesa de la planta del pie (A) y piel delgada del abdomen (B) con sus tres principales capas: epidermis, dermis e hipodermis. La denominación de piel gruesa o delgada se refiere al grosor de la epidermis. Corte teñido con H-E. x30. Modificado de Geneser, 2000.

#### 1.1.2a. Histología de la epidermis

La piel que se encuentra en zonas lampiñas de las palmas de las manos y plantas de los pies se denomina piel gruesa en donde la epidermis puede alcanzar más de 1 mm de espesor. En ésta se distinguen, por su aspecto en microscopia óptica, cinco diferentes estratos denominados: basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (Figura 1A). El estrato

basal esta constituido por una única capa de células epiteliales cilíndricas bajas o cúbicas con núcleos ovales y citoplasma basófilo, que están ancladas a la membrana basal con hemidesmosomas y entre ellas mediante desmosomas y en su citoplasma se pueden encontrar tonofibrillas. En el estrato espinoso las células adoptan forma poligonal, con un ligero aplanamiento horizontal en la parte superior de la capa, los núcleos son redondeados y tienen ubicación central, el citoplasma posee moderada basofilia, con mayor cantidad de tonofibrillas que las células basales (Geneser, 2000); estas células por el proceso de la técnica histológica sufren retracción de su citoplasma, quedando unidas por los desmosomas lo que asemeja a que tuvieran espinas razón por la cual se denominan células espinosas (Ross y Pawlina, 2007). El estrato granuloso se compone de 3-5 capas de células aplanadas, el citoplasma contiene una gran cantidad de gránulos muy basófilos denominados gránulos de queratohialina. El estrato lúcido se distingue como una delgada capa eosinófila localizada entre el estrato córneo y granuloso que está compuesta por escasas capas de células aplanadas densamente empaquetadas. Los núcleos comienzan a degenerar en las células externas del estrato espinoso y desaparecen en el estrato lúcido, donde el contorno de los núcleos sólo se distingue en algunas células. El estrato córneo se compone de numerosas capas de células aplanadas totalmente queratinizadas y anucleadas a las que se les llama células corneas. Estas células se visualizan como una gruesa y muy eosinófila capa de láminas onduladas en la que no se diferencian células y en la que tiene lugar una continua descamación (Geneser, 2000; Ross y Pawlina, 2007).

Por otro lado se denomina piel delgada al tipo de piel mas abundante que recubre al resto del organismo en esta, la epidermis es mucho más delgada, el estrato córneo es más angosto, el estrato espinoso se compone de menos capas celulares y a menudo el estrato granuloso sólo tiene una capa, mientras que el estrato lúcido no se observa (Figura 1B) (Geneser, 2000).



**Figura 2. A)** Fotomicrografía de piel gruesa de la planta del pie, donde se distinguen todas las capas epidérmicas, además del estrato papilar de la dermis y la parte superior del estrato reticular. Corté teñido con HE. x30. **B)** Esquema de la epidermis y sus capas además de los melanocitos y las células de Merkel en la capa basal y las células de Langerhans en la zona suprabasal del estrato córneo y basal. A) Modificado de Geneser, 2000 y B) Kenneth, 1996.

### 1.1.2b. Tipos de células de la epidermis.

En la epidermis además de los queratinocitos (Figura 2B), coexisten otros tres tipos celulares menos abundantes: los melanocitos, las células de Merckel y las células de Langerhans (CL) (Martinhão *et al.*, 2006). Los melanocitos son las células responsables de la pigmentación de la piel mediante la síntesis de melanina y se localizan en la capa basal de la epidermis, poseen un cuerpo celular redondeado del que parten numerosas prolongaciones ramificadas. La melanina se observa como gránulos pardo-amarillentos que en condiciones normales, sólo se encuentran en las prolongaciones y en escasa cantidad, dado que se liberan a los queratinocitos circundantes por un proceso llamado secreción citocrina. Es necesario hacer notar que los melanocitos sólo se observan en los preparados de H-E como células claras en el estrato basal y rara vez se aprecian las prolongaciones. La mejor forma de revelar la presencia de melanocitos es mediante la

reacción de DOPA o por medio de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de la proteína S-100 (Geneser, 2000).

En el estrato basal también se localizan las células de Merckel que son células derivadas de queratinocitos que funcionan como mecanorreceptores de adaptación lenta para el tacto fino. Estas células realizan contactos sinápticos con prolongaciones nerviosas aferentes y se estimulan ante la deformación leve de la piel. Esto implica que estos receptores se adaptan lentamente a los estímulos y continúan enviando potenciales de acción mientras dure un estímulo. Las células de Merckel están localizadas de manera preferencial en la epidermis de los labios, de las yemas de los dedos y en la vaina radicular externa de los folículos pilosos (Geneser, 2000; Boulais y Misery, 2008).

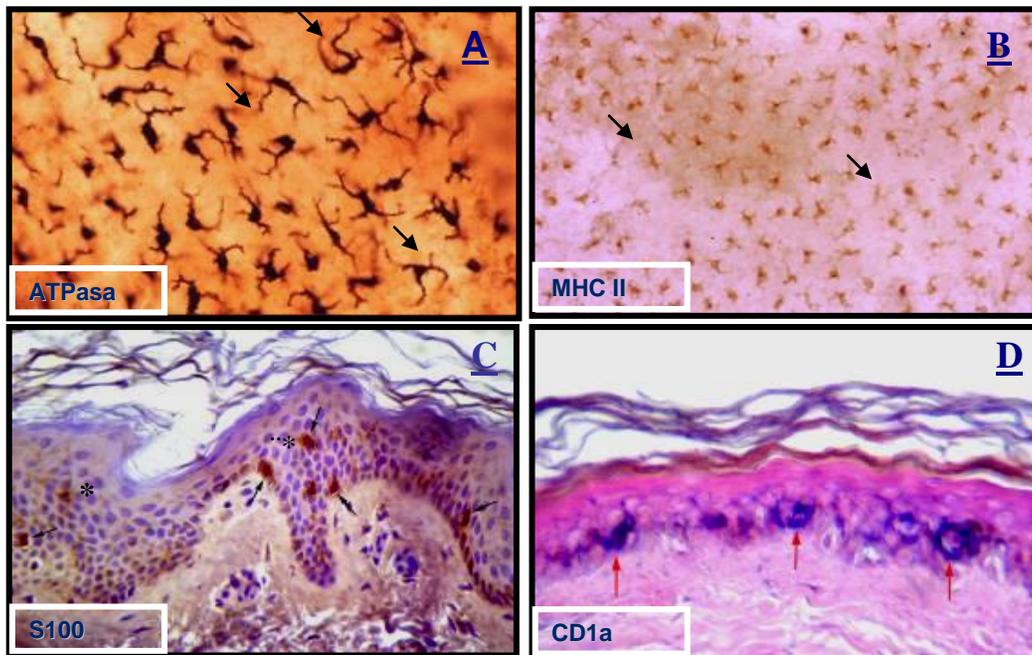
## **1.2 Células de Langerhans (CL)**

En las capas suprabasales del estrato espinoso se localizan las células de Langerhans (CL), que constituyen alrededor del 3-5% de todas las células en la epidermis, tanto en ratón como en humanos. Las CL son células de origen mieloide que pertenecen al sistema de células dendríticas presentadoras de antígenos (CD) y poseen una función de inmunovigilancia monitoreando el medio extracelular para detectar, captar y procesar antígenos externos o propios, y posteriormente migran a los órganos linfoides secundarios y ahí presentan el antígeno en cuestión a linfocitos T CD4+ o CD8+ para inducir algún tipo de respuesta inmunológica. El término de CL se ha extendido para las CD que están presentes en todos los epitelios estratificados del organismo (Cooper *et al.*, 1985; Cuéllar-Ávila *et al.*, 2004; Merad *et al.*, 2008).

### **1.2.1 Histología y Ultraestructura**

En cortes histológicos las CL presentan un núcleo oscuro y un citoplasma muy claro, con tendencia a encoger dado que no presentan desmosomas por lo cual no se adhieren a las

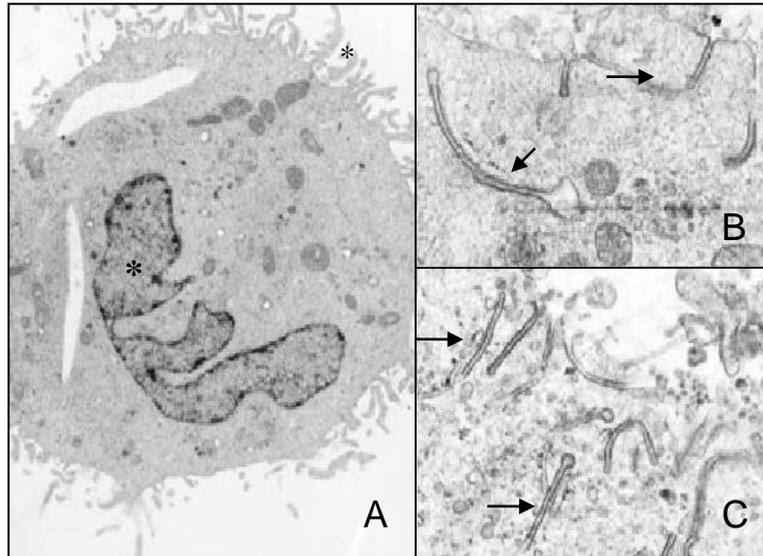
células que están alrededor. Mediante inmunohistoquímica contra receptores de superficie específicos (CD1a, CD207, MHCII, etc.) (Figura 3) en las CL se distinguen numerosas prolongaciones que se extienden desde el cuerpo celular hacia los espacios intermedios de los queratinocitos adyacentes, por lo que se forma un reticulado regular y casi totalmente cerrado (Figura 3 A y B). Las células de Langerhans además también se encuentran en otros epitelios planos estratificados como el esófago, vagina, córnea lengua, etc (Geneser, 2000).



**Figura 3.** Láminas epidérmicas (A y B) y cortes transversales (C y D) de piel donde se observan las células de Langerhans. En A y B note la estrecha red que forman las CL en la epidermis y las largas proyecciones dendríticas (flechas) interdigitándose entre los queratinocitos. En C y D su presencia desde el estrato espinoso (asteriscos) al estrato basal (flechas). Histoquímica enzimática para ATPasa 40x (A), inmunohistoquímica para S100 20x (C), MHCII 20x (B) y CD1a 40x (D). *Fotomicrografías cortesía del Dr. Andrés Castell R.*

Estas células fueron descritas por Paul Langerhans en 1868, quien las observó en piel de cadáveres y consideró que formaban parte del sistema nervioso, posteriormente otros investigadores las relacionaron con los melanocitos. Sólo después de ser identificados los receptores para el tercer componente del complemento (C3b), la fracción cristalizable (Fc) de la IgG (Stingl, *et. al* 1977; Stingl, *et. al* 1978) y la demostración de la expresión de moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC II) (Rowden *et al.*,

1977; Klareskog *et al.*, 1977), Billingham y Silvers (1991) sugirieron, casi un siglo después de su descubrimiento, que las CL podían capturar antígenos e inducir respuestas inmunológicas.



**Figura 4.** Microscopía electrónica de transmisión de CL. En A) CL que muestra las prolongaciones de su membrana plasmática y un núcleo celular con amplias hendiduras (asteriscos). En B y C se muestra el gránulo de Birbeck con su particular forma de “bastones y raqueta de tenis” así como su estriación más electrodensa en la porción que corresponde al bastón. A) 10.000x: B v C) 100.000x. *Modificado de Caux et al., 1999.*

Birbeck y colaboradores (1961) describieron la ultraestructura de las CL, mediante microscopía electrónica, con un núcleo celular de apariencia marcadamente indentada debido a la presencia de profundas hendiduras (Figura 4C), un aparato de Golgi bien desarrollado, un citoplasma claro en comparación con el de los queratinocitos adyacentes, la ausencia de filamentos intermedios de prequeratina, escasos lisosomas, carencia de desmosomas en su membrana plasmática y la presencia de un organelo al que se le denominó gránulo de Birbeck que puede tener forma de “bastón” con una longitud variable y que se caracteriza por tener una estriación central periódica más electrodensa en forma de “zipper”. En algunos casos puede observarse a este bastón con una dilatación en uno de sus extremos que le da un aspecto de “raqueta de tenis” (Figura 4 A y B). La función exacta del gránulo de Birbeck aún permanece en debate (Thépaut *et al.*, 2009), pero ya

se ha demostrado que su formación está estrechamente relacionada con la presencia de la molécula CD207 y que debe estar involucrado en el procesamiento de antígenos (Valladeau *et al.*, 2000; Thépaut *et al.*, 2009).

### **1.2.2 Ciclo biológico**

Las CL se encargan de captar, internalizar y procesar antígenos endógenos y exógenos y transportarlos desde la piel hasta los ganglios linfáticos regionales donde inducen respuestas inmunes activadoras o tolerogénicas, al activar o inhibir a los linfocitos T antígeno específicos (Cumberbatch *et al.*, 2003). En humanos y ratones las CL son fácilmente identificadas ya que expresan el marcador hematopoyético CD45 así como grandes cantidades de las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Además, las CL expresan en su membrana de manera específica una lectina tipo-II tipo-C, denominada CD207 y conocida comúnmente como langerina. Esta lectina está involucrada en el reconocimiento e internalización de múltiples antígenos presentes en diversos patógenos como el VIH-1, así como en la formación de gránulos de Birbeck (Valladeau *et al.*, 2000). Otra que está presente en la membrana de las CL es la proteína DEC205 (CD205) la cual está involucrada en procesos de captación de antígenos ya que también es una lectina tipo-II tipo-C. (Swiggard *et al.*, 1995) En humanos y en ratones las CL expresan E-cadherina que les permite formar uniones temporales con los queratinocitos (Tang *et al.*, 1993; Merad *et al.*, 2008).

Se considera que las CL epidérmicas son CD inmaduras ya que tienen la capacidad de captar y procesar eficientemente los antígenos pero poseen una reducida capacidad presentadora de antígenos, debido a la débil expresión de moléculas coestimuladoras de células T en su superficie como CD80, CD86 y CD40 (Teunissen, 1992). Una vez que las CL han captado un antígeno, migran de la epidermis hacia los ganglios linfáticos regionales de drenaje y adquieren un fenotipo de CD maduras (Figura 5) caracterizado



Los cambios producidos en este proceso de maduración de las CL son dirigidos por algunas citocinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrofágos (GM-CSF), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) los cuales son secretados de manera constitutiva e inducida tanto por los queratinocitos o por las mismas CL. El TNF- $\alpha$  es producido por los queratinocitos y estimula una respuesta rápida de migración de las CL, al mismo tiempo que potencia la liberación de IL-1 $\beta$  por las mismas CL inmaduras o maduras. La actividad de IL-1 $\beta$  es similar a la de TNF- $\alpha$ , pero la velocidad de respuesta de las CL es menor, debido a que la administración de IL-1 $\beta$  está relacionada con la elevación de RNA de TNF- $\alpha$  en los queratinocitos, sugiriendo que la intervención de IL-1 $\beta$  contribuye a la estimulación de la producción de TNF- $\alpha$  por los queratinocitos. Así, ambas citocinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  son señales esenciales para la movilización de las CL hacia los ganglios linfáticos (Cumberbatch *et al.*, 2001).

Por otro lado, de manera esencial se requiere que las CL expresen el receptor de quimiocina 7 (CCR7) para que migren hacia los ganglios linfáticos. El CCR7 es el receptor de las quimiocinas CCL19 y CCL21. Existen diferentes formas de CCL21 en ratón (CCL21 a, b, c), pero al ser expresadas en tejido linfoide en grandes cantidades pueden reclutar células CCR7+ hacia los ganglios linfáticos. En general, las células endoteliales de los vasos linfáticos dérmicos en condiciones de inflamación, selectivamente expresan CCL21 junto con CCL19 en zonas T-dependientes en ganglios linfáticos, predominantemente en las células del estroma, guiando a las células CD incluyendo CL maduras CCL7+ a este tejido para la presentación de los antígenos acarreados a las células T y de ésta manera inducir una respuesta inmune (Teunissen, 2005).

Las CL migratorias expresan además CD205, CD11c+ (Merad *et al.*, 2008a) y CD40. Ésta última es una molécula de activación de CD (Stoitzner *et al.*, 2005). Por otro lado, durante el proceso de maduración funcional de las CL, la expresión de E-cadherina o CDH1 es regulada a la baja permitiendo que las CL se separen de los queratinocitos y con ello se

facilita el movimiento de las CL hacia la dermis (Merad *et al.*, 2008). Antes de que la presentación de antígenos por las CL a los linfocitos se produzca, se requiere de un estrecho contacto entre ambos tipos celulares, para ello las CL expresan moléculas de adhesión como las moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1 ó CD54) y el antígeno funcional linfocítico-3 (LFA-3 ó CD58) y las moléculas CD11c (Teunissen *et al.*, 1994).

### **1.2.3. Métodos de estudio de CL**

#### **1.2.3a. Aislamiento**

Muchos aspectos permanecen sin ser conocidos acerca de la biología de las CL debido a que su número es escaso tanto en la dermis como en el porcentaje de células CD207 que migran a ganglio. Para su estudio las CL se han aislado desde la piel y algunos métodos de extracción y purificación de CL son por ejemplo aquellos en los que se utilizan perlas magnéticas (Morris *et al.*, 1992) o centrifugación por gradiente de densidad (Teunissen *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1994; Peguet-Navarro *et al.*, 1994). Sin embargo, para esto es necesario la degradación enzimática de la piel y posterior purificación de las CL y es necesario considerar que algunos procesos pueden dañar o activar a las células, como el uso de perlas magnéticas que pueden inducir la activación y maduración de las CL (Tchou *et al.*, 2003), o el empleo de algunas enzimas que pueden dañar receptores de membrana que son importantes para el análisis posterior, por ejemplo el receptor CD11c.

Una vez aisladas, las CL sólo pueden ser mantenidas en cultivo por poco tiempo y no pueden multiplicarse, debido a que maduran rápidamente y después de 2 días se parecen a las CD interdigitantes (maduras) de los ganglios linfáticos. En algunos casos se han utilizado explantes cutáneos, pero esto no es recomendado puesto que las células adquieren cierto grado de activación al día uno de cultivo además de abandonar la piel a la semana de obtenida la muestra (Tchou *et al.*, 2003). La cantidad de CL o CD que pueden ser obtenidas por cualquier método es muy reducida debido, por un lado a la

pequeña cantidad de células que pueden encontrarse en los diversos tejidos del cuerpo (2 al 5% de CL en piel y 0.1% de CD207+ en ganglio) y, por el otro, los procedimientos de extracción por si solos disminuyen considerablemente el rendimiento celular (Williams *et al.*, 1994).

### **1.2.3b. Diferenciación**

En la década de los 90s se implementaron diversas técnicas para obtener mayor cantidad de CD inmaduras, mediante su diferenciación a partir de precursores de monocitos CD14+ aislados de sangre (Inaba *et al.*, 1992) o precursores de médula ósea (Lutz *et al.*, 1999) en los cuales se implementó el cultivo de precursores en presencia de diferentes citocinas para promover el desarrollo hacia CD como Factor de Crecimiento de Colonias de Granulocitos Macrófagos (GM-CSF) y el Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Inaba *et al.*, 1992; Lutz *et al.*, 1999). En 1996, un intento por mejorar el rendimiento de CDs en medios libres de suero, Strobl y colaboradores (1996), identificaron al TGF $\beta$ 1 como una citocina estrechamente relacionada con la obtención de un fenotipo de células de Langerhans en medios adicionados con GM-CSF y TNF $\alpha$ . El mismo año, Borkowski y colaboradores, encontraron que ratones TGF $\beta$ 1 -/- carecían de CL en la epidermis, con lo que quedó establecida la importancia del TGF $\beta$ 1 en la ontogenia de las CL (Borkowski *et al.*, 1996).

Se pueden obtener CD o CL a partir de células hematopoyéticas CD34+ de sangre adulta, médula ósea o cordón umbilical. En cultivos suplementados con GM CSF y TNF  $\alpha$  de precursores hematopoyéticos CD34+ de cordón umbilical se demostró que se pueden obtener dos tipos de progenitores de CDs: el primero CD1a+/CD14- y el otro CD14+/CD1a-, de los cuales sólo del progenitor CD1a+/CD14- es posible obtener cierta cantidad de células con características de CL (CD1a+, CD207+ y gránulos de Birbeck+).

Por otro lado, del progenitor CD14<sup>+</sup> se diferencian a CL con características de las que están localizadas en la dermis o circulantes en sangre. En estudios posteriores se demostró que el TGFβ1 es necesario para hacer que los precursores CD14<sup>+</sup> se diferencien a CL, con lo que quedó establecido que existe una ruta de diferenciación dependiente de TGFβ1 y otra que es independiente de TGFβ1 (Caux *et al.*, 1996, y Caux *et al.*, 1999) y desde estos progenitores CD14<sup>+</sup> el papel de la interleucina 4 (IL4) es producir CLs sin características de CL aún en presencia de TGFβ1 (Caux *et al.*, 1999) lo que pone de manifiesto el papel diferencial de varias citocinas en la generación de CL o de CL partiendo desde diferentes precursores. Monocitos aislados de sangre periférica (monocitos CD14<sup>+</sup>) también pueden diferenciarse en cultivo con GM-CSF, IL4 y TNFα a CL maduras (Zhou *et al.*, 1996) y a CL si se les agrega TGFβ1 (Geissmann *et al.*, 1998). Otro estudio demostró que existe una subpoblación más directa de diferenciación a CL que son las células CD1a<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> que se encuentran en sangre y responden más rápido al estímulo del TGFβ1 (Ito *et al.*, 1999).

Varios estudios *in vitro*, además de mejorar el rendimiento de CL en cultivo, han descrito las vías de diferenciación a CL, de esta manera en la actualidad se conoce que los precursores (células precursores CD14<sup>+</sup> de monocitos) *in vivo* pueden ser inducidos para diferenciarse en condiciones donde se crea un ambiente que favorezca su diferenciación, como por ejemplo en la inflamación (Jaksits *et al.*, 1999) y, por otro lado, en condiciones basales y de remodelamiento donde las mismas CL mantengan su número al entrar selectivamente a división celular o reclutar precursores CL dérmicos o de sangre periférica (Chorro *et al.*, 2009). Además, se ha estudiado el papel de otras moléculas y su participación *in vivo* como la activina A, miembro de la familia de los TGFβ1, con una bien conocida función particular en epidermis que es capaz de diferenciar CL en ausencia del

TGF $\beta$ 1 (Musso *et al.*, 2008) o la participación de M-CSF en lugar de GM-CSF para la producción tanto de CD como de CL (Molla *et al.*, 2003).

#### **1.2.4 Nuevos modelos de estudio de CL.**

La importancia del estudio de las CL radica en los numerosos procesos biológicos y también médicos en los que están involucradas. Por ejemplo, las CL están implicadas en enfermedades como dermatitis y procesos alérgicos cutáneos, en la inmunidad inducida por vacunas (ya que se ha involucrado a la langerina con la capacidad de las CL para reconocer antígenos virales), en oncología se estudia el potencial de las CD y CL en respuestas antitumorales como el melanoma (Merad *et al.*, 2008b) y en general en los procesos involucrados en estados tempranos de la respuesta inmune.

Se han propuesto modelos que permitan estudiar las CL en un microambiente libre de otras CD dérmicas, macrófagos, linfocitos T y B y células cebadas para poder analizar los distintos aspectos de su biología celular, los complejos mecanismos que existen entre las interacciones de las células epidérmicas con las CL y la contribución de estos dos tipos celulares en la respuesta inmune de la piel. Éstos también permitirían desarrollar herramientas para evaluar varios compuestos de interés toxicológico de gran importancia en la industria farmacéutica y cosmética. De esta forma, se han construido equivalentes cutáneos mediante ingeniería de tejidos, en los que se han introducido CL (Regnier *et al.*, 1998; Facy *et al.*, 2004; Facy *et al.*, 2005). Por un lado, Regnier y colaboradores reconstruyeron una epidermis que incluía CL humanas obtenidas de la diferenciación de precursores CD34+ y sembradas con queratinocitos y melanocitos sobre una dermis humana desvitalizada (Regnier *et al.*, 1998), posteriormente se obtuvo una epidermis que incluía CL sobre un soporte dérmico de colágena comercial (Episkin<sup>(R)</sup>) en donde las CL se obtuvieron de cultivos de precursores CD34+ (Facy *et al.*, 2004; Facy *et al.*, 2005). Estos constructos cutáneos con CL al parecer son excelentes modelos, sin embargo,

tienen el inconveniente de que la base dérmica que se emplea es colágena desvitalizada o derivados lo que la convierte en un material costoso y limitante ya que la disponibilidad de tener piel humana obtenida mediante cirugía es limitada, por otro lado aunque se consiguieron buenos resultados en cuanto a morfología, los constructos carecen de fibroblastos los cuales son células necesarias para propiciar una mejora en el microambiente necesario para el crecimiento de los queratinocitos (Wong *et al.*, 2007).

### **1.3 Ingeniería de tejidos**

La ingeniería de tejidos es un área interdisciplinaria científica que tiene el propósito de reparar, reemplazar mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido. Este término fue acuñado hace 30 años en 1987, pero muchas de las técnicas utilizadas en ella han sido desarrolladas desde décadas anteriores (Falke y Atala, 2000). Existe un gran interés en esta área pues tiene un enorme potencial terapéutico para ser aplicado en el reemplazo de órganos o tejidos dañados por enfermedad o lesión. Actualmente sólo piel, hueso, cartílago, capilares y tejido periodontal pueden ser conseguidos mediante esta tecnología, aunque su empleo en pacientes todavía es muy limitado, se espera implementar protocolos adecuados y cada vez mas confiables para su uso (Metcalf y Ferguson, 2007).

Para regenerar nuevos tejidos se deben de tener en cuenta tres elementos básicos: las células, el andamio y los factores de crecimiento. Las células sintetizan la matriz del nuevo tejido, mientras que el andamio provee un ambiente apropiado a las células para que se comprometan efectivamente con su función y los factores de crecimiento facilitarían y/o promoverían la regeneración, diferenciación y multiplicación de las células (Ikada, 2006; Macri y Clark, 2009).

### **1.3.1 Ingeniería de piel**

La bioingeniería para la construcción de piel artificial representa una perspectiva de terapia avanzada para el combate de heridas crónicas o agudas en piel. Sin embargo, en la actualidad no existe piel artificial que imite completamente la anatomía, fisiología, estabilidad biológica y estética natural de la piel (Ikada, 2006; Metcalfe y Ferguson, 2007). Entre las características deseables que tendrían que cumplir los sustitutos de piel se incluyen: facilidad en la manipulación y aplicación en el sitio de la lesión, proveer de una barrera vital con un apropiado flujo hídrico, ser adherente, con adecuadas propiedades físicas y mecánicas, que se tenga control de su degradación, ser estéril, no tóxica o antigénica y que no provoque ninguna reacción inflamatoria, además de tener un bajo costo (Ikada, 2006).

En los últimos años se han conseguido progresos muy importantes en los materiales que se emplean para la producción de un equivalente cutáneo para que sea funcional y durable. Las matrices extracelulares artificiales incluyen las derivadas de materiales naturales y las manufacturadas sintéticamente. Como ejemplos de materiales naturales se incluyen a las hidroxiapatitas, el hialuronano, los glucosaminoglucanos, la fibrina, la colágena, y el quitosán, todas ellas tienen la ventaja de tener baja toxicidad y baja respuesta inflamatoria. Algunos ejemplos de materiales sintéticos incluyen poliglicilidos, polilácticos y polilácticos coglicólicos que son usados en la industria para suturas y mallas. Otros ejemplos incluyen los politetrafluoroetilenos y polietilenos tereftalatos (Metcalfe y Ferguson, 2007).

### **1.3.2 Fibrina como biomaterial**

La fibrina es un sustrato natural que desempeña un importante papel en la cicatrización de cualquier herida en el cuerpo humano. En el plasma soluble se encuentra el fibrinógeno el cual se deposita en una herida en presencia de trombina y calcio es

convertido a monómeros de fibrina y posteriormente en presencia del factor XIIIa se convierte en un polímero estable de fibrina. La fibrina tiene una tasa de formación-degradación, en donde actúan los factores estabilizantes como el factor XIIIa de la coagulación, la aptotina es una antiplasmina que inhibe la fibrinólisis, y por otro lado, se encuentran las enzimas proteolíticas como la plasmina que permiten su degradación (Geneser, 2000). La fibrina se puede conseguir comercialmente en preparados con una alta concentración de esta proteína entre 70 a 120 mg/ml, más factor XIIIa y aptotina. Es posible utilizar plasma autólogo para obtener fibrina con una concentración alrededor de 6 a 12 mg/ml ó una mezcla de varios plasmas y su posterior crioprecipitación para obtener una concentración final de entre 40 y 50 mg/ml (Currie *et al.*, 2001).

La fibrina tiene grandes cualidades como soporte o andamio, es un material 100% absorbible en comparación con los biomateriales sintéticos; se asocia con fibronectina lo que permite una comunicación célula-matriz, lo que a su vez permite la migración celular. Además, tiene un rango de degradación adecuado ya que se encuentra en las heridas por aproximadamente 4 días y es indetectable alrededor de los 10 días (Metcalf y Ferguson, 2007). De manera adicional, el empleo del plasma como fuente de fibrina proporciona factores de crecimiento, algunos de los cuales son acarreados por la misma fibrina y pueden ser liberados, otros pueden estar inactivos o ausentes en los concentrados que se comercializan pero que pueden estar muy activos en plasmas autólogos. Entre estos factores podemos encontrar: el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Factor de Crecimiento Transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) (Currie *et al.*, 2001). En la práctica médica se ha descrito a la fibrina como un buen material adhesivo usado para fijar injertos de piel en quemaduras y/o para propiciar el cierre de heridas expuestas grandes, en cirugía particularmente en la cirugía plástica y reconstructiva se usa para promover una curación rápida de las heridas (Currie *et al.*, 2001).

### **1.3.3 Fibrina y su uso en la ingeniería de piel.**

En la ingeniería de piel la fibrina se ha empleado ampliamente, aprovechando la facilidad con que se obtiene y que naturalmente funciona como factor cicatrizante e interacciona en más de una vía con las células dérmicas y epidérmicas. Así, desde mediados del siglo pasado se utilizaba para fijar insertos de piel para transplante, los cuales eran sumergidos en plasma y luego se dejaban solidificar en el sitio de la lesión (Tridrick y Warner, 1944) y en los años 70s se popularizó el utilizar el adhesivo de fibrina para sellar las heridas colocando capas de fibrina a las cuales se les adicionaba trombina y factor XIIIa (Spangler, 1976). Como adhesivo se utilizó para fijar queratinocitos en andamios de colágena (Grant *et al.*, 1998) o soluciones de fibrina con queratinocitos inmersos en ella como terapia para reconstruir epidermis dañada (Hotch *et al.*, 1998). Sin embargo, es en 1988 que se sembraron queratinocitos sobre un gel de fibrina y posteriormente se aplicó en úlceras obteniendo como resultado una mejora en la rapidez de la curación en comparación con el grupo control (Hunyadi *et al.*, 1988). En 1991 se reportó el uso de queratinocitos autólogos provenientes de un cultivo primario con una capa alimentadora de fibroblastos 3T3 de ratón y la formación de láminas de queratinocitos sobre el gel para su posterior empleo en pacientes quemados (Ronfard *et al.*, 1991). Finalmente, Meana y colaboradores (1998) emplearon como matriz dérmica al mismo gel de fibrina crioprecipitada adicionada con trombina en el que sumergieron fibroblastos autólogos humanos y arriba del gel sembraron los queratinocitos autólogos obteniendo así una mejora importante en la rapidez de la proliferación de los queratinocitos.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las CL tienen una función fundamental en la inducción de respuestas inmunológicas contra antígenos exógenos y endógenos, ya que son capaces de estimular a linfocitos vírgenes de una manera muy eficaz. Para llevar a cabo tal estimulación, las CL necesitan migrar acarreando los antígenos hacia los ganglios linfáticos y al mismo tiempo cambiar su fenotipo de una célula eficaz en la captación y procesamiento de antígenos en un fenotipo de una célula más eficiente en la presentación de los mismos. Muchas cuestiones acerca de la biología de las CL aún permanecen sin resolver y necesitan ser estudiadas a fondo, por lo que se hacen necesarios modelos confiables que permitan la realización de ensayos experimentales y su análisis posterior. Se han construido equivalentes cutáneos con una base dérmica de colágena en los cuales se han insertado CL en la epidermis. Estos constructos cutáneos con CL al parecer son excelentes modelos, sin embargo, tienen el inconveniente de que son costosos y que la disponibilidad de tener piel obtenida mediante cirugía es limitada. La construcción de un equivalente cutáneo con una base dérmica de fibrina en el cual se inserten CL derivadas de médula ósea en la epidermis podría obtenerse a bajo costo además de ser fácil de obtener, por lo que se podría estandarizar el empleo de este tipo de modelos para el estudio de la biología de las CL.

### **3. HIPÓTESIS**

Si un constructo cutáneo con una base dérmica de fibrina elaborado en el laboratorio proporciona condiciones semejantes a las de la piel de ratón entonces es posible que las células de Langerhans derivadas de células madre de médula ósea tendrán un fenotipo y comportamiento similar al de las células de Langerhans de piel.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

- Construir un equivalente cutáneo con base dérmica de fibrina como un posible modelo de estudio de células de Langerhans.

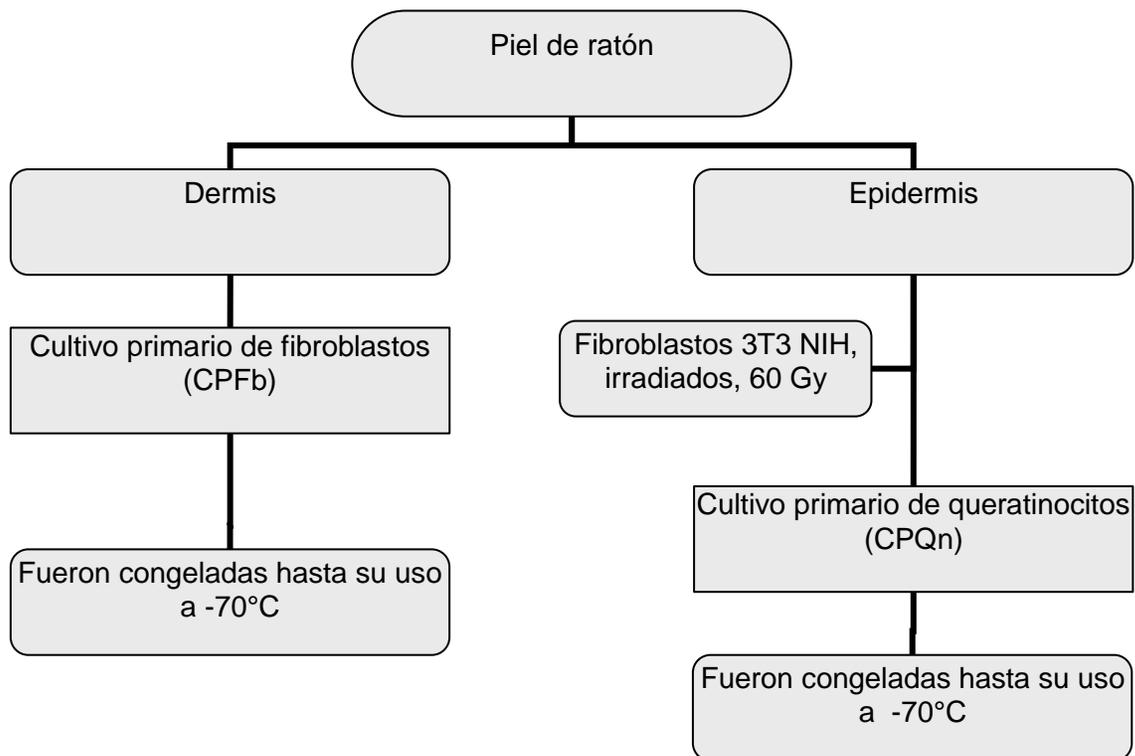
#### **4.2 Objetivos particulares**

- Construir un equivalente cutáneo con una base dérmica de fibrina que contenga un epitelio con células de Langerhans derivadas de médula ósea.
- Comparar la morfología y presencia de las células de Langerhans derivadas de médula ósea del constructo cutáneo en una base dérmica de fibrina con células de Langerhans obtenidas directamente de piel de ratón.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Extracción de queratinocitos y fibroblastos a partir de piel de ratón

En los experimentos de este trabajo se emplearon ratones de la cepa Balb/c de entre 6 a 8 semanas y 40-60 gr de peso, obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina y manejados de acuerdo a los lineamientos del comité de ética de la Facultad de Medicina apoyado en el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud y en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999, fueron alimentados con alimento Purina-Chow para ratones, agua *ad-libitum*, ciclos de luz oscuridad de 12 h y a una temperatura constante de 23 °C.



**Diagrama 1.** Obtención del cultivo primario de queratinocitos y cultivo primario de fibroblastos a partir de piel de ratón.

Los cultivos primario de queratinocitos y de fibroblastos (CPQn y CPFb respectivamente) se obtuvieron de la disgregación de dermis y epidermis de piel de ratón (Diagrama 1), para lo cual, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente depilados con una crema depiladora comercial la cual se utilizó siguiendo las instrucciones del empaque. Se cortó la piel de las zonas ventral y dorsal, y se removió mecánicamente el tejido adiposo y el muscular subyacente. Una vez retirados, la piel se cortó en trozos de 0.5 x 0.5 cm o de 0.5 x 2 cm si es que se deseaba separar la epidermis, fueron inmediatamente colocados en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) estéril a 4 °C. Para desinfectar los fragmentos de piel se lavaron con etanol frío 70% por 30 segundos con agitación ligera y después se lavaron tres veces con HBSS estéril por 60 segundos en cada ocasión.

Para separar la epidermis de la dermis, los fragmentos grandes (0.5 x 0.2 cm) de piel fueron colocados en una caja de Petri con RPMI 1640/Dispasa (Gibco) (1mg/ml) durante 18 horas a 4°C procurando que se mantuvieran flotando con la dermis hacia abajo para permitir la adecuada difusión de la enzima hacia el epitelio, pasado este tiempo se incubaron una hora más a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Una vez terminado este periodo fue posible separar con ayuda de unas pinzas las láminas epidérmicas de las dérmicas. Posteriormente las láminas epidérmicas se incubaron con una solución RPMI 1640/Tripsina 0.05%/EDTA 0.02% (Gibco) a 37 °C por dos horas y terminado este tiempo, se sometieron a pipeteos continuos para forzar mecánicamente el desprendimiento celular. La suspensión celular se hizo pasar por un filtro de 100µm para eliminar restos de tejido y se centrifugó a 300 G durante 10 minutos, el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI 1640 para posteriormente determinar el número de células por mililitro en cada experimento.

Los fragmentos de piel pequeños (0.5X 0.5 cm) se colocaron en un tubo de 50 ml con solución RPMI 1640/Tripsina 0.05%/EDTA 0.02% y se incubaron una hora a 37 °C en

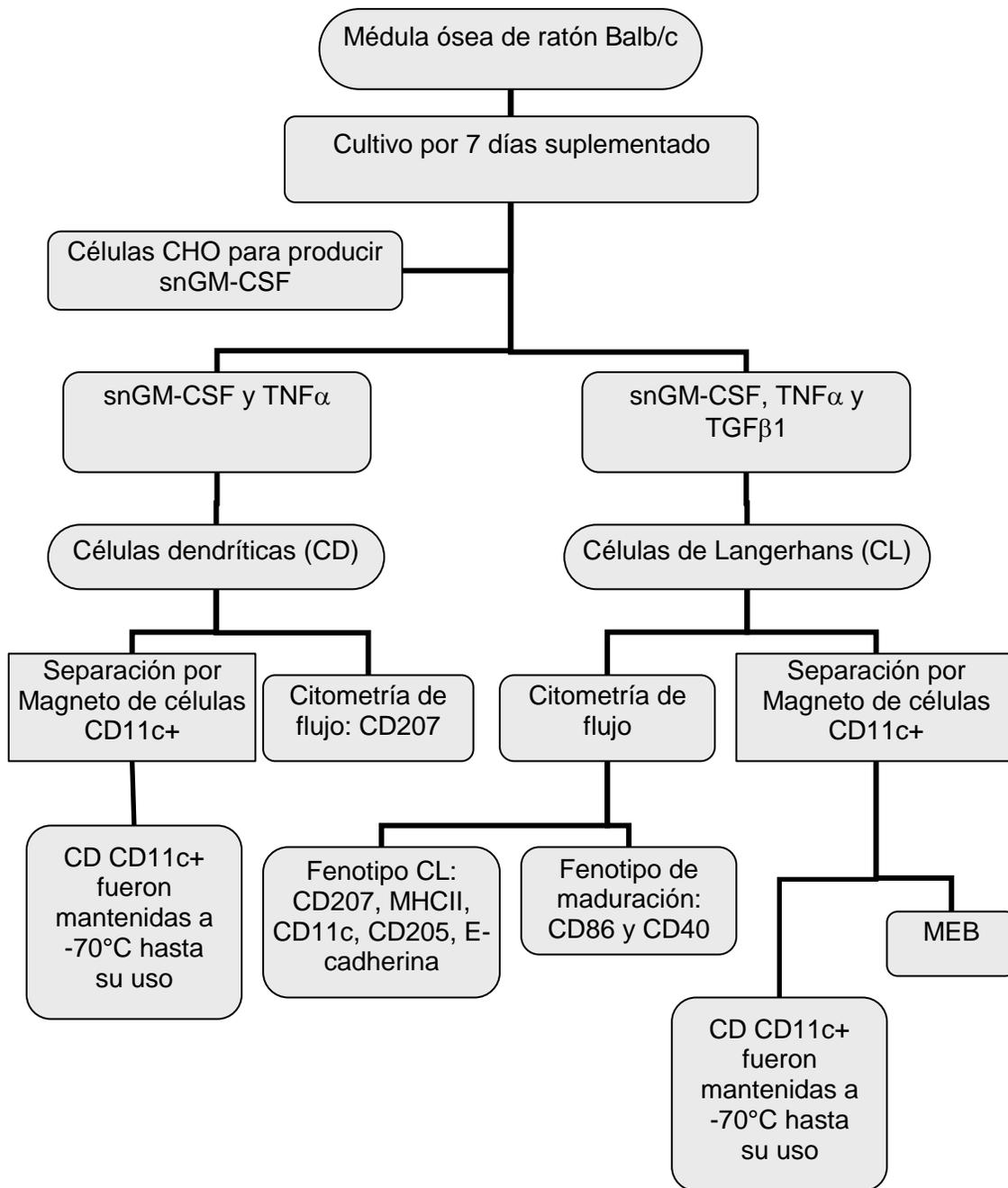
baño María con agitación máxima para permitir el desprendimiento de las células. Posteriormente se agregó un mililitro de solución al 10x de RPMI 1640/Tripsina 0.05% / EDTA 0.02% y se incubaron una hora y media más. Una vez terminado este tiempo el medio se recolectó y se centrifugó a 300 G durante 10 minutos, el sobrenadante fue devuelto con el resto de las muestras de piel y se agitó para recolectar más células desprendidas de las epidermis. De la misma manera el medio fue centrifugado dos veces más, el botón celular resultante se resuspendió en 1 ml de medio completo para determinar el número de células por mililitro en cada experimento. Los queratinocitos así obtenidos fueron sembrados en una proporción 1:3 con fibroblastos 3T3 irradiados hasta el momento de ser transferidos al andamio o directamente sembrados en este.

Para obtener fibroblastos de las muestras de dermis, éstas fueron puestas en una solución de colagenasa 2 mg/ml (Gibco) por 1 hora en baño María con agitación intensa para permitir la degradación de la dermis, e incubadas por 30 minutos, 1, 2 y 12 horas para determinar el tiempo adecuado para la piel de ratón (Llames *et al.*, 2006). Posterior a la digestión con colagenasa la suspensión celular se centrifugó y el botón celular fue resuspendido en medio de crecimiento de fibroblastos DMEM/SBF10% o MFb y sembrado en una caja Petri, se incubaron por 24 horas para que los fibroblastos se adhirieran al fondo de las cajas, posteriormente se realizaron lavados con HBSS para excluir los restos de células u otras partes de tejidos y se adicionó medio fresco MFb. Estas células se dejaron en incubación a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con cambio de medio cada tercer día, hasta que alcanzaran alrededor de 80% de confluencia, una vez alcanzado este número celular se eliminó el medio y se realizó un lavado con HBSS el cual se eliminó y se adicionó Tripsina/ EDTA/ HBSS por 5 minutos a 37 °C. Para inactivar la enzima se adicionó medio completo, las cajas se lavaron, el medio con las células fue recolectado y centrifugado a 300 G por 10 minutos, el botón celular se lavó tres veces con HBSS para eliminar los restos de la tripsina. Las células obtenidas fueron contadas y congeladas a una densidad

de  $100 \times 10^3$  células/ml de medio de congelación para fibroblastos a  $-70^\circ\text{C}$  para ser usadas después o sembradas en el doble de cajas para aumentar el número celular y ser usadas en el andamio. De esta manera se obtuvieron por cada caja de Petri entre  $3 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  células/ml.

## **5.2 Obtención de fibroblastos 3T3 para cultivo de queratinocitos**

Para la expansión de los queratinocitos obtenidos de ratón es necesario sembrarlos en presencia de fibroblastos los cuales los ayudan a crecer; para este propósito, es necesario una capa alimentadora de fibroblastos 3T3 (Diagrama 1). Los viales de la línea celular de fibroblastos NIH/3T3 de ratón (ATCC) fueron descongelados en baño María a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente se centrifugó a 300 G para eliminar el medio de congelación y el botón celular se sembró en una caja de  $75 \text{ cm}^2$  que fue incubada a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y humedad a saturación con cambio de medio cada tercer día esperando que las células alcanzaran 70 a 80%. A este tiempo se cosecharon con la solución de Tripsina/EDTA y la suspensión se centrifugó para eliminar la tripsina, el botón celular se repartió entre 3 a 5 cajas dependiendo de la expansión requerida. Una vez que fue alcanzando un número adecuado de células, parte de ellas se ocuparon para mantener la línea y la otra fue sometida a una dosis de 6000 Rads de radiación en el aparato Gamma Cell-1000 de Nordion. Una vez listas para su uso en la siembra con los queratinocitos a razón de  $2 \times 10^6$  de 3T3 por caja de  $25 \text{ cm}^2$ .



**Diagrama 2.** Obtención de CD y CL en cultivo diferenciadas a partir de MO de ratón con GM-CSF obtenido de células CHO.

### **5.3 Obtención de snGMCSF a partir de células CHO**

Para la diferenciación de células de médula ósea a células dendríticas y células de Langerhans es necesaria la adición de GM-CSF, que es posible obtener de células de ovario de hamster chino (CHO) modificadas con un gen que produce el GM-CSF (Diagrama 2). Estas células fueron descongeladas a baño María a 37°C y sembradas en una caja de 25 cm<sup>2</sup> con medio F12 /SBF (Gibco) 10%/ geneticina 1 mg/ml (medio denominado F12 S). Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se les agregó Tripsina 0.05%/EDTA 0.02% y las células desprendidas fueron eliminadas y a las células adheridas se les colocó medio F12S nuevo, este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, las células fueron tripsinadas y las células que se desprendieron se pasaron a una caja de 75cm<sup>2</sup> y se les agregó medio F12 de crecimiento (F12C) (F12/SBF10%) que se dejó hasta que alcanzaran 90% de confluencia, momento en el cual las células se tripsinaron y se sembraron en 6 cajas de 75 cm<sup>2</sup> con medio F12C. Una vez que las células alcanzaron 90% de confluencia se lavaron con HBSS y se les adicionó medio F12 plano (F12 P) y se incubaron entre 48 y 72 horas. Posteriormente, el medio fue recolectado, filtrado con filtro de 0.22 µm y congelado a -20 hasta su uso, las células de las cajas se tripsinaron y lavaron con HBSS, a las células que no se desprendieron se les adicionó medio F12 C y se esperó a que alcanzaran la confluencia adecuada. Este procedimiento de producción-crecimiento se repitió 4 veces más, tiempo después del cual las células se regresaban al medio de selección. El snGM-CSF obtenido de las células CHO se degenera con el tiempo por lo que es necesario mantener una línea de producción constante y no almacenar por más de dos meses el sobrenadante obtenido por esta metodología.

#### **5.4 Diferenciación de células Langerhans a partir de médula ósea (MO)**

Se extrajo la MO para diferenciar las CL y CD (Diagrama 2). De ratones Balb/c de 6 a 8 semanas se utilizaron fémures y tibias completos quitando la mayor parte del tejido muscular adyacente. Los huesos fueron puestos en HBSS frío; posteriormente fueron desinfectados con etanol 70% por 60 segundos y lavados tres veces con HBSS. En una caja Petri con medio DMEM/SBF 10% se colocaron los huesos a los cuales se les cortaron las epífisis y con ayuda de una jeringa se inyectó medio a través de ellos para forzar la salida de las células de la médula ósea. Las células obtenidas se homogenizaron y pasaron por un filtro de 100  $\mu\text{m}$  para eliminar restos de tejido y posteriormente se centrifugaron a 300 G por 10 minutos. Para eliminar los eritrocitos al botón celular se adicionó 1 ml de una solución de cloruro de amonio 0.84% como solución de lisis, el cual se incubó a temperatura ambiente por 3-4 minutos, posteriormente se le adicionó medio completo (DMEM/SBF 10%) y se centrifugó 300 G. Las células obtenidas fueron sembradas en cajas Petri a razón de  $1-2 \times 10^6$  células/ml, con medio DMEM (Gibco) suplementado con SBF 10%,  $\text{snGM-CSF}$  20%,  $\text{TNF}\alpha$  50 U/ml (Chemicon-Millipore) y  $\text{TGF}\beta 1$  0.5 ng/ml (Santa cruz Biotechnology) como se ha reportado (Strobl *et al* 1996; Jaksist *et al.*, 1999; Geissmanm *et al.*, 1998), posteriormente se hicieron cambios de medio completo en los días 3 y 6 y fueron cosechados al séptimo día de cultivo (Facy *et al.*, 2004). Se realizaron pruebas con cultivos con  $\text{snGM-CSF}$  y  $\text{TNF}\alpha$  por los cuatro primeros días y  $\text{TGF}\beta 1$  los siguientes días hasta completar los 7 días de diferenciación, y uno paralelo donde se adicionaron todas las citocinas desde el día 1.

##### **5.4.1 Citometría de flujo**

Las células fueron teñidas para citometría de flujo para evaluar su fenotipo de CL (Diagrama 2) usando los siguientes anticuerpos: I-A/I-E (para evidenciar MHCII), CD11c (BD Biosciences), CD207 (e Biosciences), CD205 y E-cadherina (RD System), y para

evaluar el grado de activación de las células se usaron los anticuerpos CD40 y CD86 (BD Biosciences). Las células recolectadas de las cajas, se lavaron con PBS/SBF 0.5% y se centrifugaron a 300 G. El botón celular, se resuspendió en una solución de PBS/SBF 0.5% con el anticuerpo según las instrucciones de uso de cada uno y fue incubado por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y posteriormente se lavó y se repitió el procedimiento para colocarles Streptavidina acoplada a FITC, APC, Cy5 o Pe (BD biosciences) que son los fluorocromos con los que se marcaron los anticuerpos (FITC con CD207; APC con CD11c; Cy5 con I-A/I-E y Pe para CD205, E-cadherina, CD40 y CD86) Las muestras teñidas se conservaron en refrigeración y oscuridad hasta ser leídas por el FACScalibur (BD Biosciences). El análisis de los resultados se realizó con ayuda del programa WinMDI 2.9 y Flow Jo 3.4.

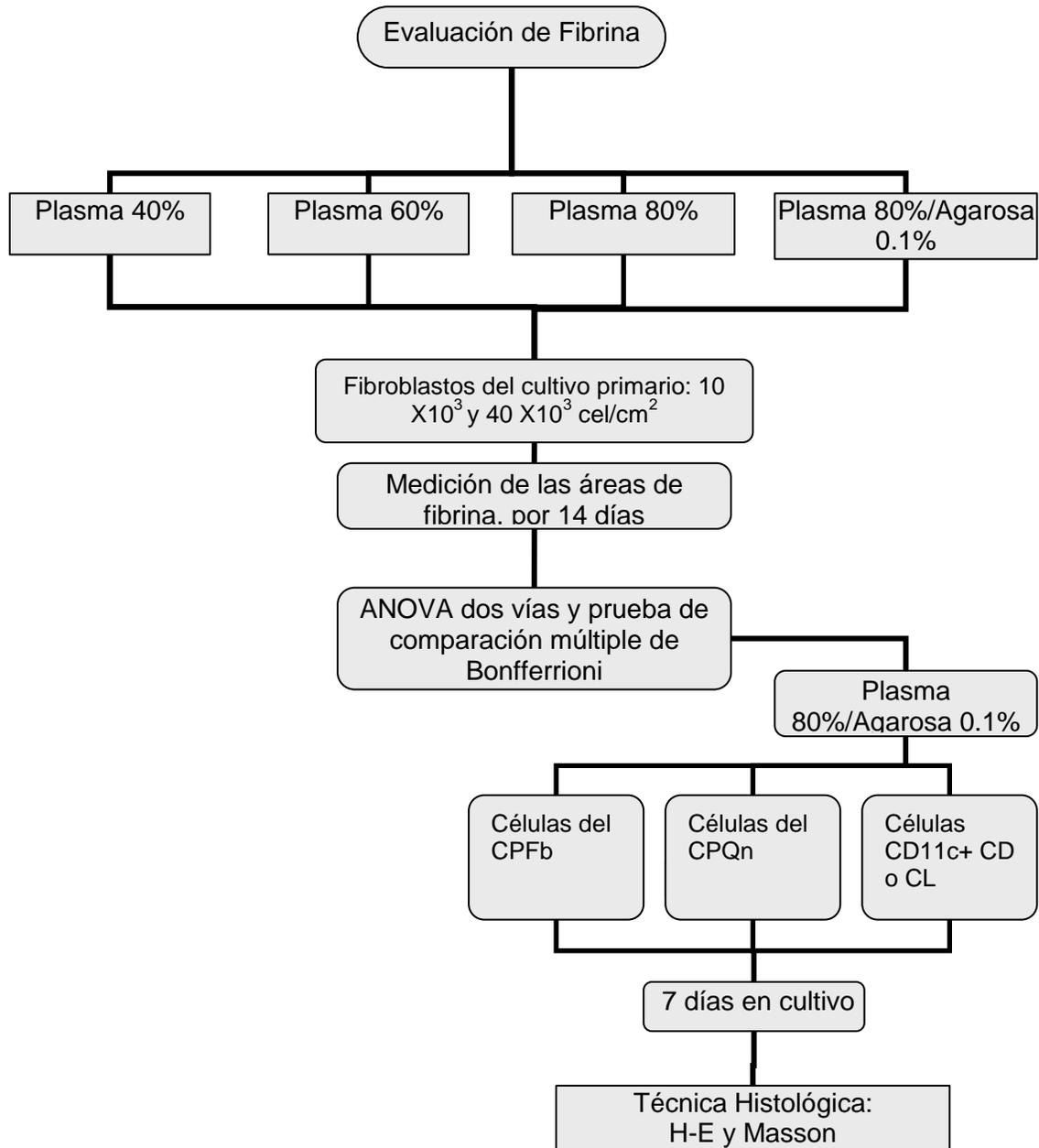
#### **5.4.2 Separación de CL y CD por Súper MACS**

Posteriormente, se procedió a la separación de células CD11c+ para purificar la cantidad de células dendríticas del cultivo inicial, la cual se realizó mediante separación con perlas magnéticas acopladas a CD11c (Miltenlli Biotec) y posteriormente se utilizó el magneto Super MACS (Miltenlli Biotec) por donde se pasó la suspensión de células marcadas con perlas CD11c, recuperando después solo las células CD11c positivas. Estas fueron inmediatamente sembradas o congeladas a -70 °C hasta su uso (Diagrama 2).

#### **5.4.3 Microscopia electrónica de barrido (MEB)**

Se tomó una alícuota de CD separadas con CD11c por MACS para poder ser vistas en por microscopia electrónica de barrido (Diagrama 2), para lo cual, se realizó un frotis sobre cubreobjetos de 10 mm X 10mm. Las células fueron fijadas con glutaraldehído 2.5% en buffer de cacodilatos 0.1M pH 7.2-7.4 por 15 minutos a temperatura ambiente, una vez fijadas se incubaron con osmio durante 1 hora, se lavaron y conservaron en buffer de

cacodilatos, hasta la deshidratación de la muestra con gradiente de etanol, desecación por punto crítico de CO<sub>2</sub> y el revestimiento de la muestra con una película de oro. Por último la muestra fue observada en un Microscopio Electrónico de Barrido. Zeiss DSM50 1987.



**Diagrama 3.** Evaluación del rendimiento de los geles de fibrina a diferentes concentraciones de plasma.

## 5.5 Evaluación de los geles de fibrina

El andamio de fibrina se obtuvo solidificando plasma humano donado por el banco de sangre del Hospital General de México, el cual fue obtenido de sangre anticoagulada con citrato de sodio 0.1M. Se analizaron cuatro proporciones de plasma en las soluciones (n=6) (Diagrama 3):

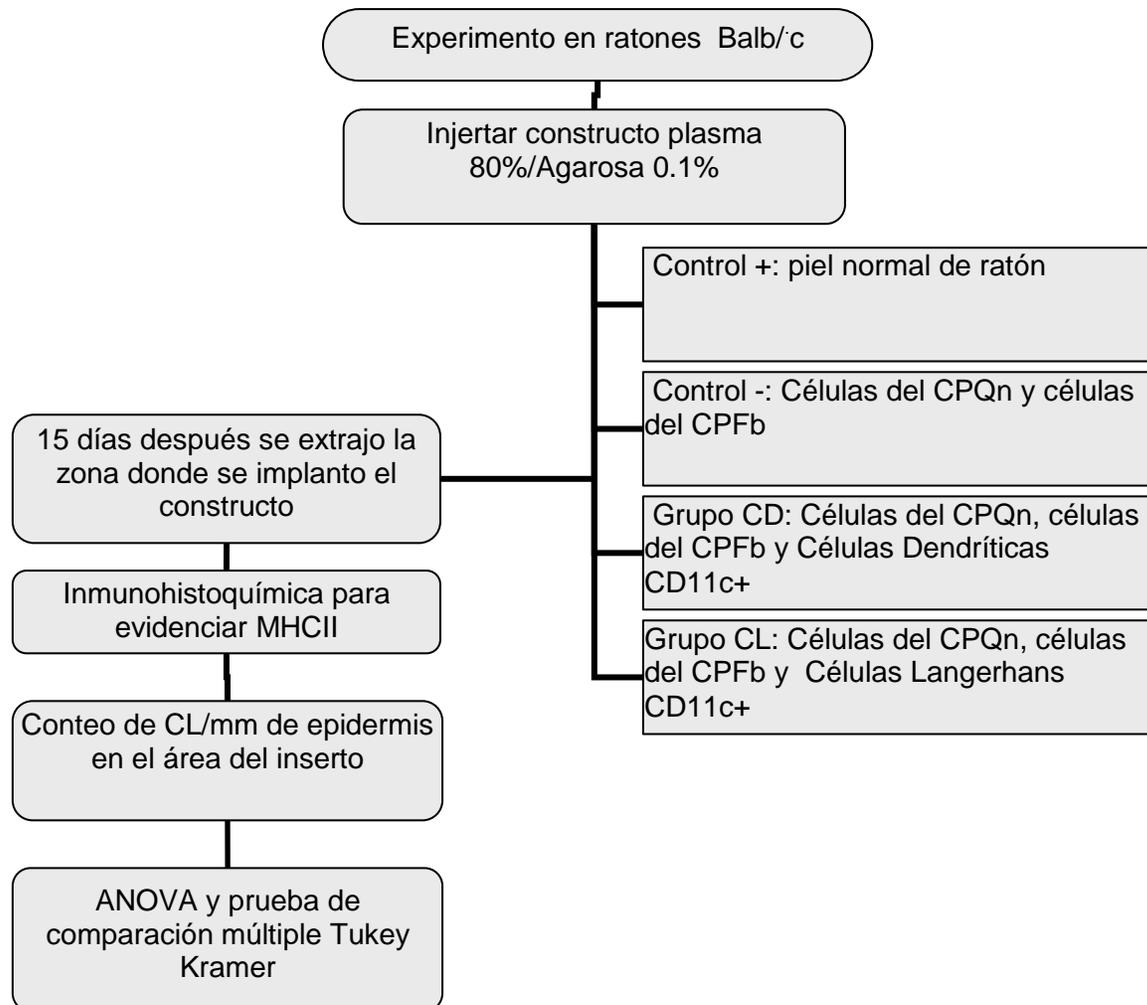
- Plasma 40%: 10ml de Plasma, 2ml de DMEM, 0.200 ml de ácido tranexámico (Sigma) 100mg/ml, 10.8 ml de Cloruro de sodio 0.9%, 0.200 ml de Cloruro de Calcio 1% (Llames *et al.*, 2006).
- Plasma 60 %: 17 ml de Plasma, 3.5 ml de Cloruro de Sodio 0.9%, 1 ml DMEM, 0.450 ml de ácido tranexámico 100 mg/ml, 5 ml de Cloruro de Calcio 1% (Comunicación personal, Miguel Herrera).
- Plasma 80%: 21 ml de Plasma, 2 ml de DMEM, 0.200 ml de ácido tranexámico 100 mg/ml, 2 ml de Cloruro de Calcio 1% (Serrato, 2010).
- Plasma 80%/Agarosa 0.1%: 21 ml de Plasma, 2 ml de DMEM, 0.200 ml de ácido tranexámico 100 mg/ml, 2 ml de Cloruro de Calcio 1% y 1 ml de Agarosa 0.1% (Serrato, 2010).

Después de la solidificación se sembraron 10 mil o 40 mil Fibroblastos/cm<sup>2</sup> sobre el gel y se registró en fotografías la degradación del gel de fibrina en la presencia de las células cada dos días durante 14 días, al final se midió el área de fibrina en cada día de prueba con ayuda del programa Motic Images Plus 2.0.

## 5.6 Construcción de geles de fibrina queratinocitos y fibroblastos y/o CL

Sobre el gel de Plasma 80%/Agarosa 0.1% se sembraron 40x10<sup>3</sup> fibroblastos/cm<sup>2</sup> y 400x10<sup>3</sup> queratinocitos/cm<sup>2</sup> con o sin 100x10<sup>3</sup> células CD11c+/cm<sup>2</sup> y se dejaron incubando entre 7 y 14 días con medio QC. Pocas muestras llegaban al final del periodo de cultivo y/o con un adecuado volumen para ser procesadas. Las muestras recuperadas

se fijaron y sometieron a técnica histológica de rutina y fueron teñidas para H-E y Masson para evaluar la estructura tisular general (Diagrama 3).



**Diagrama 4.** Experimentos *in vivo* injertando constructos con CL o CD.

### 5.7 Determinación de la permanencia de CL implantadas *in vivo*

Para evaluar la permanencia de las CL, éstas fueron implantadas sobre el constructo cutáneo de fibrina; se construyeron los geles de fibrina con Plasma 80%/Agarosa 0.1%,  $40 \times 10^3$  Fibroblastos/cm<sup>3</sup> de plasma y  $400 \times 10^3$  queratinocitos/cm<sup>2</sup> con o sin  $100 \times 10^3$  células CD11c+/cm<sup>2</sup> y se dejaron incubando 7 días (Diagrama 4). Posteriormente a ratones de la cepa Balb/c se les aplicó el gel adherido a una malla de tul con cianocrilato

como pegamento (Kola Loka Johnson®) y a su vez con este mismo pegamento se fijó el constructo sobre una herida de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> hecha sobre la parte dorsal superior de cada ratón. Se realizaron 4 grupos experimentales con n=3 (Diagrama 4):

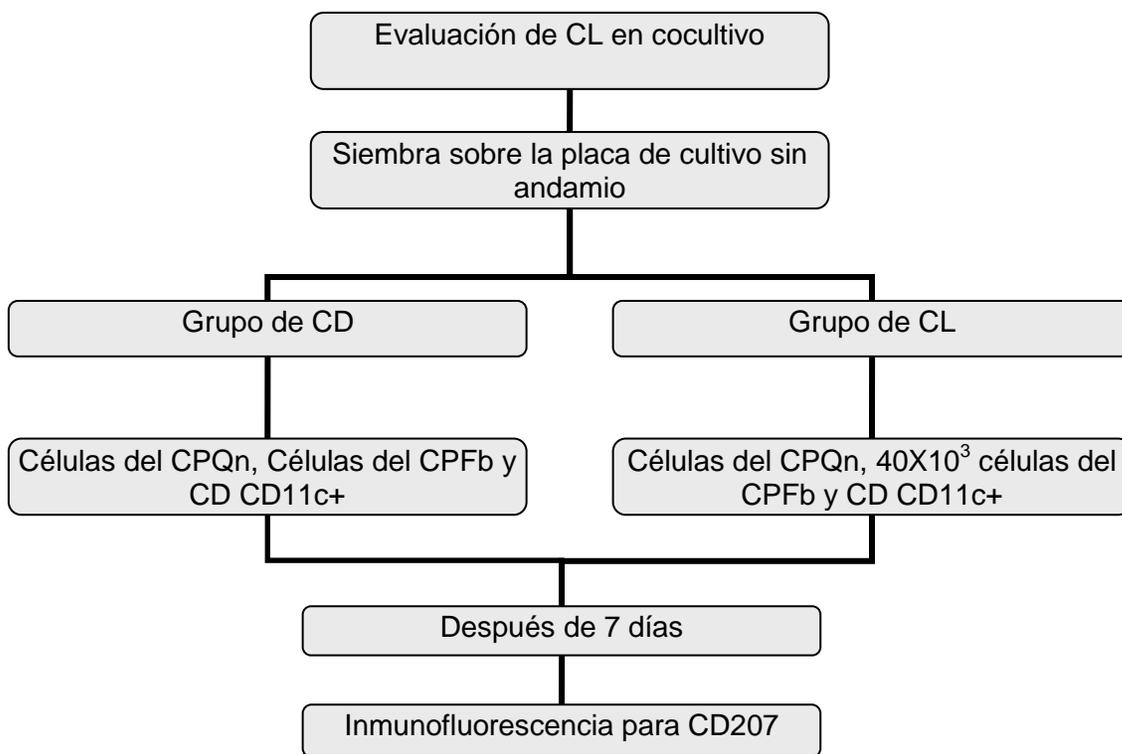
- Control +: Piel Sana de ratón sin tratamiento.
- Control -: Andamio de fibrina con queratinocitos y fibroblastos
- CL: Andamio de fibrina con CL separadas por MASC que fueron diferenciadas a partir de MO con TNF $\alpha$  y TGF $\beta$ 1
- CD: Andamio de fibrina con células dendríticas separada con MACS diferenciadas a partir de MO pero el medio de cultivo no se suplemento con TGF $\beta$ 1 o TNF $\alpha$ .

Una vez transcurridos 15 días los ratones fueron sacrificados y las cicatrices se retiraron y fijaron en una solución de Formaldehído 10%/Acido Pírico, posteriormente se procesaron por técnica histológica convencional. Se realizaron sobre cada una de las ellas una inmunohistoquímica contra las moléculas I-A/I-E del MHCII y así evaluar la presencia de CL en la epidermis.

### **5.7.1 Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica se realizó para evidenciar la presencia de células positivas a moléculas I-A/I-E de ratón en los cortes de cicatrices de ratón después de la inserción de un constructo cutáneo con base dérmica de fibrina (Diagrama 4), para la cual los cortes de 5  $\mu$ m fueron desparafinados con xileno y un gradiente de etanol desde absoluto hasta 70%, posteriormente se colocaron en agua destilada y PBS por 5 minutos respectivamente. Se inhibió la peroxidasa endógena con una solución de Peróxido de Hidrógeno (Baker) al 10% por 10 minutos, posteriormente se incubó 1 hora con el anticuerpo producido en rata contra ratón I-A/I-E (BD Biosciences, MHCII en ratón) en una dilución 1:200 a 37°C, posteriormente se lavó e incubó con un anticuerpo secundario

producido en cabra contra rata por 30 minutos 37°C (MP Biomedicas), y a continuación se lavó con PBS y se incubó con el complejo streptavidina-peroxidasa de rábano por 30 minutos 37°C; las muestras fueron lavadas y reveladas con un Kit de Revelado de Diaminobenzidina (DAB) de Zymed vigilando bajo el microscopio la aparición de la marca (10 minutos aproximadamente), posteriormente fueron lavadas con agua destilada y se deshidrataron en un gradiente de etanol desde 70% hasta absoluto y baños de xileno para poder ser montadas con resina. Las muestras se observaron en el microscopio de campo claro Nikon Eclipse 80i y con el programa de captura Nis Element-F de Nikon se tomaron fotografías de cada muestra. Se utilizó el programa Motic Image Plus para contar las células positivas por milímetro lineal de epidermis (CL/mm de epidermis).



**Diagrama 5.** Evaluación de las CL y CD cultivadas en presencia de queratinocitos y fibroblastos después de 7 días.

## **5.8 Evaluación de la presencia de CL en co-cultivos con queratinocitos y fibroblastos**

Todas las células fueron sembradas sin el gel sobre una placa de cultivo en las que primero se dejaron proliferar  $40 \times 10^3$  fibroblastos/cm<sup>2</sup> y se incubaron hasta que alcanzaron confluencia; sobre ellos se sembraron  $400 \times 10^3$  queratinocitos/cm<sup>2</sup> y posteriormente se formaron 2 grupos experimentales sembrando células derivadas de MO (Diagrama 3) como a continuación se describe:

1. Grupo con CL CD11c+:  $100 \times 10^3$  células CL/cm<sup>2</sup> diferenciadas de células de MO en cultivo suplementado con TGFβ1.
2. Grupo con CD CD11c+:  $100 \times 10^3$  células CD/cm<sup>2</sup> diferenciadas de células de MO en cultivo sin suplementar con TGFβ1.

Todas las células fueron incubadas con medio DMEM/F12 (Gibco) en proporción 3:1 adicionado con SBF 10%, Estreptomina-Gentamicina (PAA) 1%, Adenina 24 μg/ml (Sigma), Insulina 5 μg/ml (Humulin R), toxina de cólera 8ng/ml (Sigma), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)10ng/ml, triyodotironina 1.3 ng/ml (Sigma), Hidrocortisona 0.4 μg/ml (Sigma), al cual se le denomina medio QC. Se hicieron los grupos experimentales con n=3.

### **5.8.1 Inmunofluorescencia**

Para evaluar la diferenciación a CL se procesaron las muestras de cultivo para inmunofluorescencia contra CD207 (eBioscience) (Diagrama 5). Las células fueron fijadas con acetona y posteriormente se permeabilizaron las membranas con Tritón X100 0.2% para poder acceder al CD207 citoplasmático. Se incubaron a 6-8° C toda la noche con el anticuerpo biotinilado producido en rata contra ratón CD207 (eBioscience), y posteriormente se incubaron con Streptavidina FITC (BDBiosciences) 30 min a 37°C.

Finalmente, las muestras se montaron con glicerol y fueron observadas en el microscopio para inmunofluorescencia Nikon eclipse 80i utilizando el programa de captura Nis Element-f de Nikon.

### **5.9 Análisis estadístico**

Para evaluar la desintegración de los geles se realizó una prueba de análisis de varianzas (ANOVA) de dos vías seguida de una post prueba de comparación múltiple de Bonfferroni. Para comparar la cantidad de CL retenidas en la epidermis se realizó un ANOVA de una sola vía con una post prueba de comparación múltiple de Tukey. Se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

## 6. RESULTADOS

### 6.1.1 Cultivo Primario de Queratinocitos (CPQn)

Para la extracción tanto de fibroblastos como de queratinocitos se determinó la mejor metodología que permitiera obtener un número suficiente de células además de un alto grado de viabilidad. Para la extracción de queratinocitos se utilizaron dos metodologías. En la primera (Método 1, Tabla 1) se utilizaron fragmentos de piel grandes, que fueron sometidos a una incubación con dispasa para separar dermis de epidermis y posteriormente, por separado, a una disgregación en tripsina para la epidermis y colagenasa para la dermis, toda ésta metodología llevó mucho tiempo y resultó complicada, además de obtener pobres resultados en cuanto a número celular y viabilidad. Así, se obtuvo en promedio  $1.5 \times 10^6 \pm 5.2 \times 10^5$  DS con un porcentaje de viabilidad de  $63.2\% \pm 8.7$  DS lo anterior se considera como un número insuficiente de células y relativamente poca viabilidad con el gasto de recursos y tiempo del doble. En una segunda metodología (Método 2, Tabla 1) la piel en trozos pequeños fue puesta en un tubo a baño María con las enzimas tripsina o dispasa sin la necesidad de separar la dermis de la epidermis y evitando así 12 a 16 horas de incubación adicional; mediante esta metodología se obtienen en menos de la mitad de tiempo una cantidad de  $2.8 \times 10^6 \pm 5.7 \times 10^5$  DS células con  $91.7 \pm 1.4$  DS de viabilidad en el primer día, que es considerado un nivel aceptable de viabilidad celular.

	<b><i>Células/ml</i></b>	<b><i>% viabilidad</i></b>
<b>Método 1</b>	$1.5 \times 10^6 \pm 5.2 \times 10^5$ DS	$63.2 \pm 8.7$ DS
<b>Método 2</b>	$2.8 \times 10^6 \pm 5.7 \times 10^5$ DS	$91.7 \pm 1.4$ DS

**Tabla 1.** Número de queratinocitos extraídos por dos metodologías diferentes y el porcentaje de viabilidad de cada una. Datos  $\pm$  desviación estándar DS. n=3.

### 6.1.2 Cultivo Primario de Fibroblastos (CPFb)

La degradación de la dermis por 12 horas como indica el protocolo de Llames *et al.*, 2006, resultó ser excesiva para la piel de ratón que es mucho más delgada, frágil y con menor cantidad de colágena en comparación con la de humano, lo que provocó que no se obtuvieran células viables debido a una sobreexposición a la enzima, por lo cual se procedió a realizar varias extracciones para probar diferentes periodos de incubación y determinar el tiempo en que se obtienen más células con mejor porcentaje de viabilidad (Tabla 2). Los resultados obtenidos indican que para la piel de ratón es recomendable una incubación de una hora ya que es suficiente para obtener un número considerable de células viables para iniciar el CPFb y las cuales pueden reproducirse en cultivo en aproximadamente 7 días, después de los cuales por cada caja de Petri sembrada con entre 50-100X10<sup>3</sup> fibroblastos se cosechaban entre 300-500 X10<sup>3</sup> fibroblastos/ml.

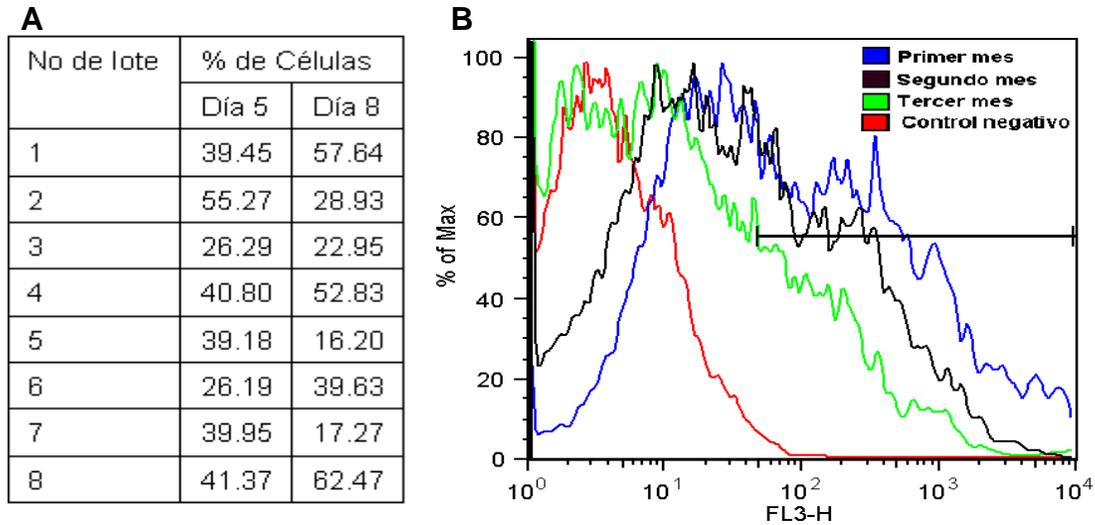
<b>Horas</b>	<b>Células/ml</b>	<b>% de viabilidad</b>
<b>12 hora</b>	0	0
<b>2 horas</b>	3X10 <sup>5</sup>	21.95%
<b>1 hora</b>	2.3X10 <sup>5</sup>	24.5%
<b>30 minutos</b>	2.8X10 <sup>5</sup>	4.436%

**Tabla 2.** Número de células extraídas de la piel de un ratón y porcentajes de viabilidad después de la incubación con 2 mg/ml de colagenasa/ RPMI 1640 a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, humedad a saturación.

### 6.1.3 Cultivo y diferenciación de células dendríticas (CD) y CL

La obtención de a CD o CL a partir de células de médula ósea se realizó con el snGM-CSF que fue obtenido de las células CHO. Para determinar la eficiencia de cada lote de células, se realizaron varias citometrías para los marcadores CD11c y MHCII. Los resultados de las prueba se muestran en la Tabla de la Figura 6, donde se observa que con la mayoría de los sobrenadantes en el día 5 se obtienen alrededor del 40% de células dendríticas y que sólo el lote número 4 el 8 y alcanza cerca entre 52% y 60% de células

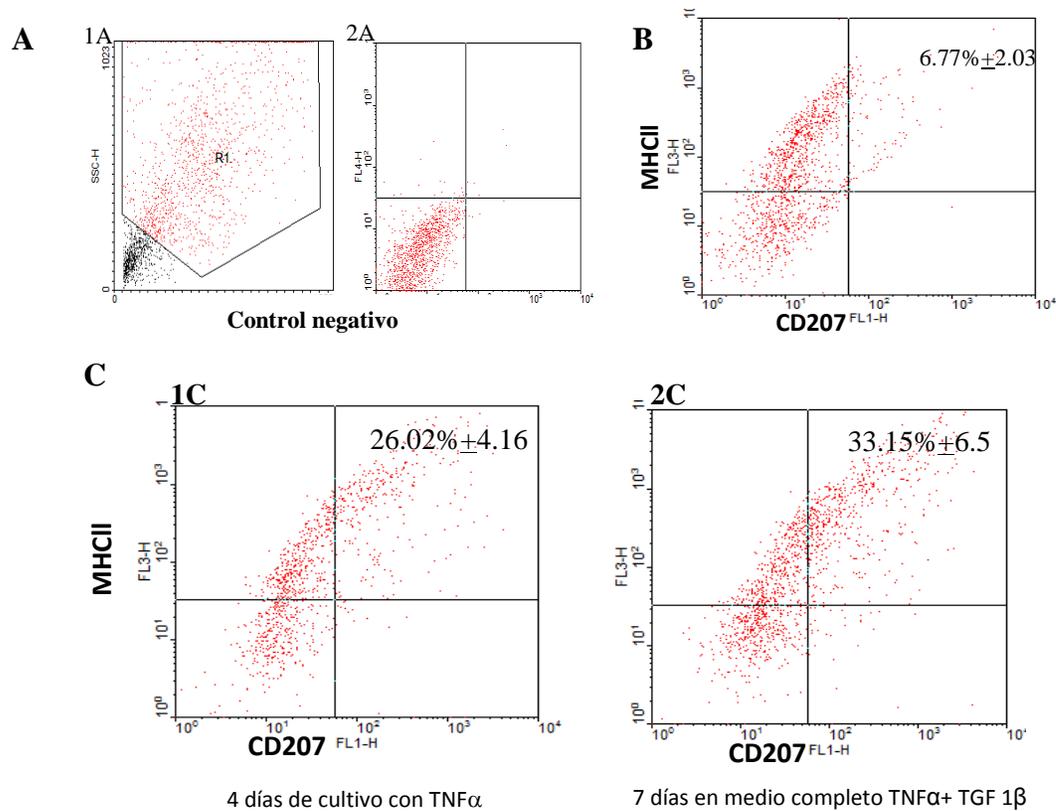
(Figura 6A). El snGM-CSF obtenido de las células CHO se degenera con el tiempo como se muestra en la Figura 6B, por lo que es necesario mantener una línea de producción constante y no almacenar más de dos meses el sobrenadante obtenido por esta metodología.



**Figura 6.** A) Tabla de los porcentajes de células positivas a MHCII y CD11c usando diferentes lotes de producción de snGMCSF. B) Citometría contra MHCII (Cy5-FL3) en cultivos realizados con un mes de diferencia entre cada uno, usando el mismo lote de snGM-CSF obtenido de células CHO, al paso del tiempo la capacidad de diferenciación disminuye. 20000 eventos adquiridos.

Para la obtención de un control positivo del marcador CD207, se emplearon CL extraídas de piel de ratones de la cepa Balb/c, que fueron incubadas en tripsina 0.05%/EDTA 0.02%/ DMEM en baño María por 3 horas a 37°C. Las células fueron analizadas por citometría de flujo y los resultados se muestran en la Figura 7. La citometría de flujo distingue células por tamaño (Size Scater, SSC) y granularidad (Foward Scater FSC), mediante lo cual se seleccionan sólo las células con estas características en la región R1. Para la determinación de los cuadrantes y de la región negativa se utilizaron células sin anticuerpos (región R1 en rojo Figura 7A). Una vez determinado lo anterior, las células disgregadas de piel de ratón se marcaron con los anticuerpos para CD207 y MHCII (FL1 y FL3 en la gráfica de puntos de Figura 7B) obteniendo  $6.77\% \pm 2.03$  de células positivas

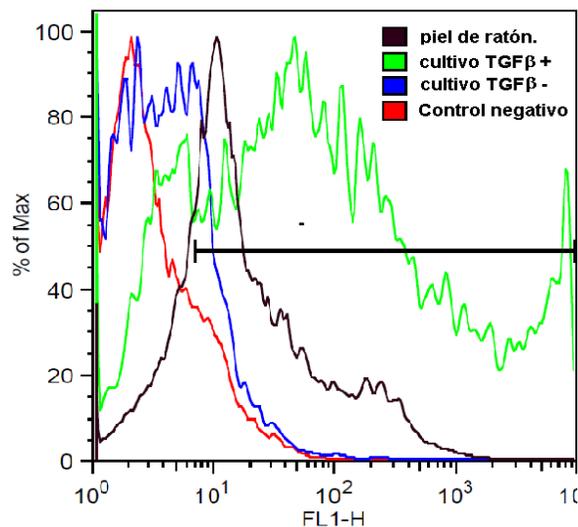
tanto para CD207 como para MHCII. Estas células dobles positivas se localizan en el cuadrante superior derecho de la gráfica de puntos Figura 7B, en donde podemos ver que los niveles de MHCII son elevados y no se expresa mucho CD207, lo que significa que las células se encuentran activadas como resultado de la manipulación y tratamiento que reciben las CL de ratón para su extracción desde piel.



**Figura 7.** Gráfica de puntos para evaluar los marcadores MHCII, CD207 y CD11c. 1A) Tamaño y granularidad de las células y región R1 en rojo considerando sólo células con tamaño y granularidad altas, A2) control negativo células sin señal para los anticuerpos. B) Porcentajes de CL de piel de ratón como control. 1C) Porcentaje de células dobles positivas para CD207 y MHCII y CD 11c con 4 días de cultivo con TNF $\alpha$  o 7 días de cultivo con medio completo TNF $\alpha$  y TGF $\beta$ 1. Determinación realizada en BD FACScalibur y anticuerpos con los siguientes flourocromos Anti CD207 (eBioscience), Anti I-A/I-E (MHCII) (BDbiosciences) y CD11c (BDbiosciences) con FITC (FL-1), Cy5 (FL-3), Apc (FL-4) (BDbiosciences) respectivamente. 5,000 células adquiridas. Gráficas representativas de 3 experimentos.

En cultivos de células humanas con TNF $\alpha$  se promueve la aparición de células precursoras CD14+ y CD1a+, estas células finalmente se diferencian a CL independientemente de TGF $\beta$ 1 (Jaksist *et al.*, 1999), en base a esto se realizaron pruebas

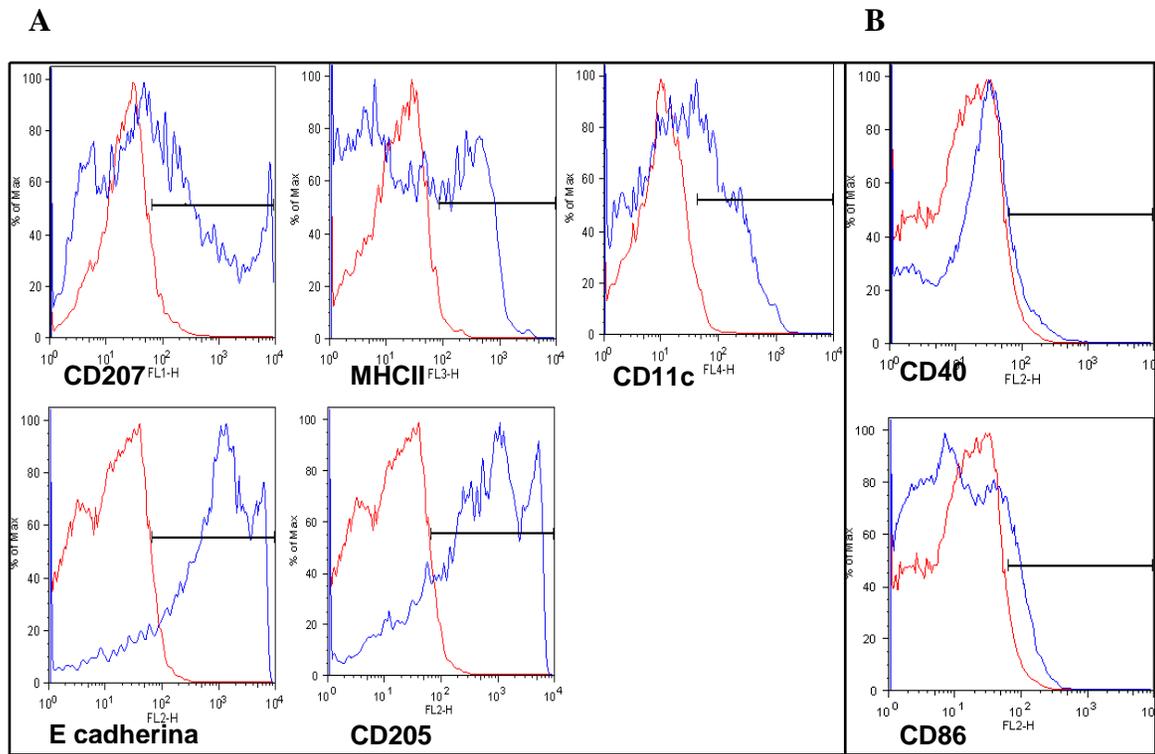
para evaluar la capacidad del  $TNF\alpha$  para permitir mayor diferenciación a CL en cultivos de médula ósea de ratón, los resultados se presentan en la Figura 7C y D. La diferenciación con medio completo desde el primer día ( $33.15\% \pm 6.5$ ) mejora el rendimiento en aproximadamente 5% en comparación con los cultivos con  $TNF\alpha$  los primeros 4 días ( $26.02\% \pm 4.16$ ). Los porcentajes de células obtenidas de un cultivo de médula ósea ( $33.15\% \pm 6.5$  Figura 7C) son significativamente mayores a los que se obtienen de células de epidermis ( $6.77\% \pm 2.03$ ) por lo que esta metodología es recomendable para obtener células positivas a CD207.



**Figura 8.** Histograma de la expresión de CD207 en células disgregadas de piel de ratón, diferenciadas en cultivo a partir de médula ósea en presencia de TGFβ1 o sin TGFβ1. Nótese que las células de médula ósea son más positivas a CD207 que las obtenidas de piel de ratón. CD207 (eBioscience) FITC (FL1) (BDbioscience) 10 000 eventos. Representativo de varios experimentos.

Para comparar la marca de CD207 en diferentes condiciones de cultivo se realizó una citometría cuyos resultados se muestran en el histograma de la Figura 8. Se analizó un cultivo de médula ósea con medio suplementado con  $TNF\alpha$  y TGFβ1 por 7 días, otro con células obtenidas de piel de ratón como el control positivo y un cultivo de médula ósea pero sin adicionarle TGFβ1 como control negativo, posteriormente estas células se tiñeron para citometría de flujo contra CD207. Es claro que las células sin TGFβ1 no desarrollan CD207, mientras que en los cultivos con las citocinas se desarrollan un número

considerable de células, además de que son altamente positivas, lo cual no se observó con las CL extraídas de la piel de ratón por una ligera activación debida a la manipulación al ser extraídas así como, el aumento de las células en la región negativa por la presencia principalmente de queratinocitos y muy pocas CL.

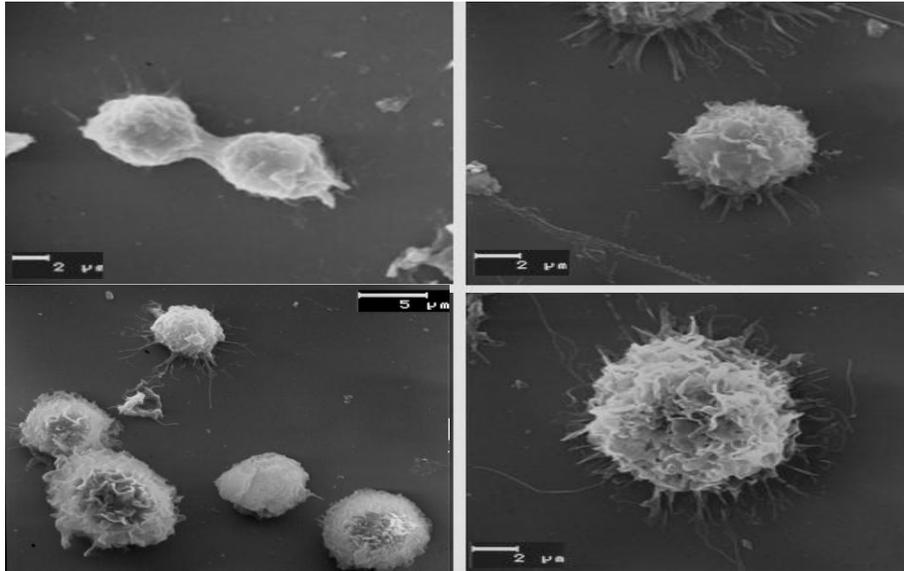


**Figura 9.** Histogramas para evaluar la presencia de los marcadores: CD207, MHCII, E-cadherina, CD11c, CD205, CD86 y CD40. A) Las células diferenciadas de médula ósea son células positivas para 4 marcadores CD207, MHCII y CD11c, E-cadherina, y CD205 y B) negativas para CD40 y CD86 que son moléculas que indican activación. 5000 eventos. En rojo región negativa. n=4.

## 6.2 Fenotipo de CL diferenciadas en cultivo

En la Figura 9 se muestra un fenotipo amplio de las células CD207+ que se obtienen de la diferenciación de médula ósea en cultivo con TGF $\beta$ 1, en estos histogramas se observa que las células son positivas para CD207, MHCII, CD11c, E-cadherina y CD205 (Figura 9A). Se observaron además bajos niveles de las moléculas co-estimuladores CD40 y CD86 (Figura 9B), lo cual indica que no activadas. De manera ilustrativa se obtuvieron

células de cultivos separadas por MACS con CD11c para tener solo CD libres de macrófagos, eosinófilos y demás células en los cultivos originales, las cuales fueron procesadas para microscopía electrónica de barrido, las electronmicrografías se muestran en la Figura 10, las CD son células grandes con proyecciones citoplasmáticas amplias que asemejan pseudópodos (Stoitzner *et al.*, 2002).

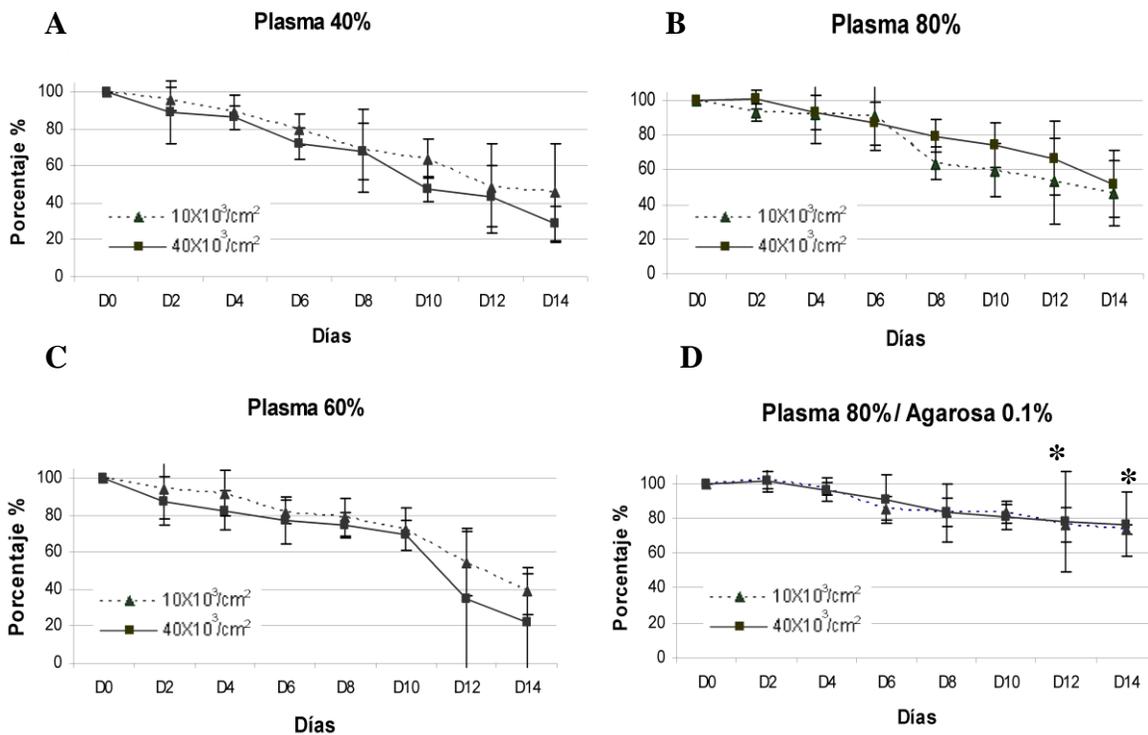


**Figura 10.** Microscopia electrónica de barrido de CD en cultivo, separadas por MACS con perlas magnéticas acopladas a CD11c. Las CD son células grandes, con proyecciones citoplasmáticas. Las células en cultivo de 7 días, se reproducen activamente arriba-izquierda. Electronmicrografías tomadas en MEB, Zeiss. Las barras indican 2 y 5  $\mu\text{m}$ .

### 6.3 Degradación de fibrina en cultivo.

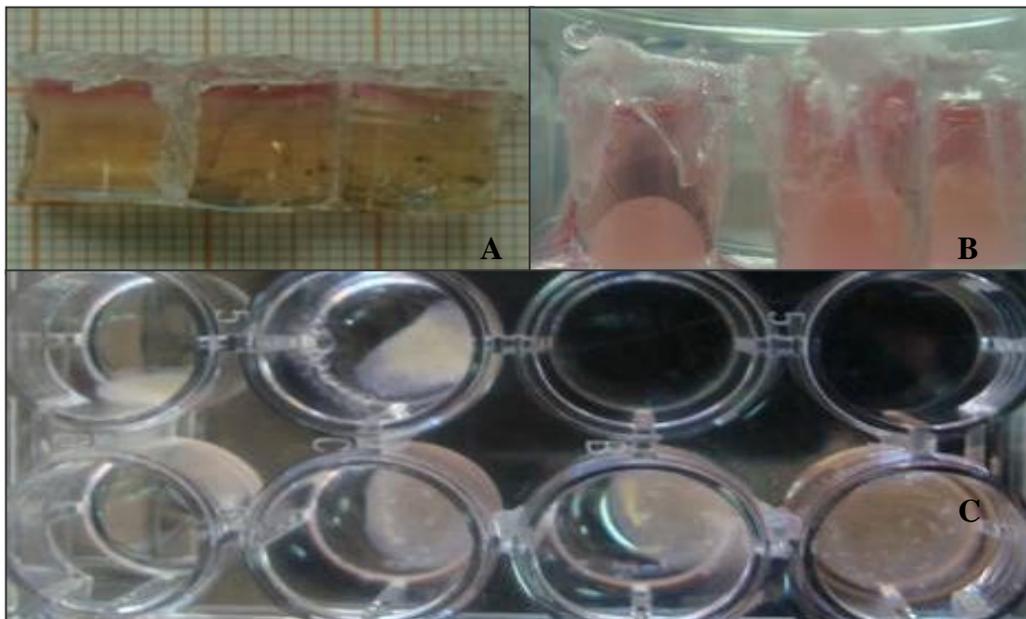
Las pruebas realizadas para medir el porcentaje de degradación de la fibrina a diferentes concentraciones y con diferente densidad celular se muestran en las gráficas de la Figura 11. La mezcla compuesta de Plasma 40% (Figura 11A) ha tenido excelentes resultados en la elaboración de constructos (Llames *et al.*, 2006), sin embargo, durante la realización de este trabajo, al insertar en los constructos a las CD,  $40 \times 10^3$  fibroblastos/ $\text{cm}^2$  y  $400 \times 10^3$  queratinocitos/ $\text{cm}^2$  con o sin  $100 \times 10^3$  CD o CL/ $\text{cm}^2$  después de 14 días de proliferación se obtenían geles con áreas reducidas (Figura 11 y 12) o incluso llegaban a disgregarse por completo (datos no mostrados), también se impedía la manipulación y el

procesamiento por técnica histológica debido al poco volumen y a la consistencia extremadamente laxa de la fibrina. Por lo anterior, además de lo recomendado por Llamas y colaboradores (2006), se realizaron pruebas con varias concentraciones de plasma, sugeridas por la literatura (Alaminos *et al.*, 2006; Serrato, 2010) y por pruebas en nuestro laboratorio (Miguel Herrera, comunicación personal), y los resultados se muestran en la gráficas de la Figura 11 B a C. Como podemos observar el plasma utilizado sólo no soporta el rango de proliferación de fibroblastos, aun sembrando  $10 \times 10^3/\text{cm}^2$  o  $40 \times 10^3/\text{cm}^2$  fibroblastos/ $\text{cm}^2$ , la fibrina tiende a reducir su volumen.



**Figura 11.** Porcentaje de degradación de geles de fibrina a diferentes proporciones de plasma. Las concentraciones con solo plasma no mejoran la duración de los geles, los mejores resultados se obtuvieron con una mezcla de plasma 80% y agarosa 0.1%, las diferencias son significativas a partir del D12.  $10 \times 10^3/\text{cm}^2$  y  $40 \times 10^3/\text{cm}^2$  de fibroblastos de ratón en el primer día. Se realizó un ANOVA de dos vías ( $P < 0.0001$ ) y una prueba post hoc Bonferroni ( $P < 0.05$ ).

Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías para analizar el comportamiento en relación al tiempo contra la concentración de plasma y el número celular. Este análisis ( $P < 0.0001$ ) resultó significativo con respecto a concentración y con respecto a número celular. Lo anterior indicó que el tiempo, la concentración de plasma y la densidad celular son factores que afectan considerablemente el volumen de los geles recuperados al final de los cultivos. La postprueba de comparación múltiple de Bonferroni indicó que existen diferencias entre Plasma 80%/Agarosa 0.1% y las demás concentraciones a partir del Día 12 ( $P < 0.05$ ) y Día 14 ( $P < 0.01$ ) (Figura 11D), así como entre las concentraciones celulares utilizadas  $10 \times 10^3$  fibroblastos y  $40 \times 10^3$  fibroblastos  $P = 0.0414$ . Por lo que utilizar una mezcla de Plasma 80%/Agarosa 0.1% nos permite mantener mayor número de células por más tiempo de cultivo.

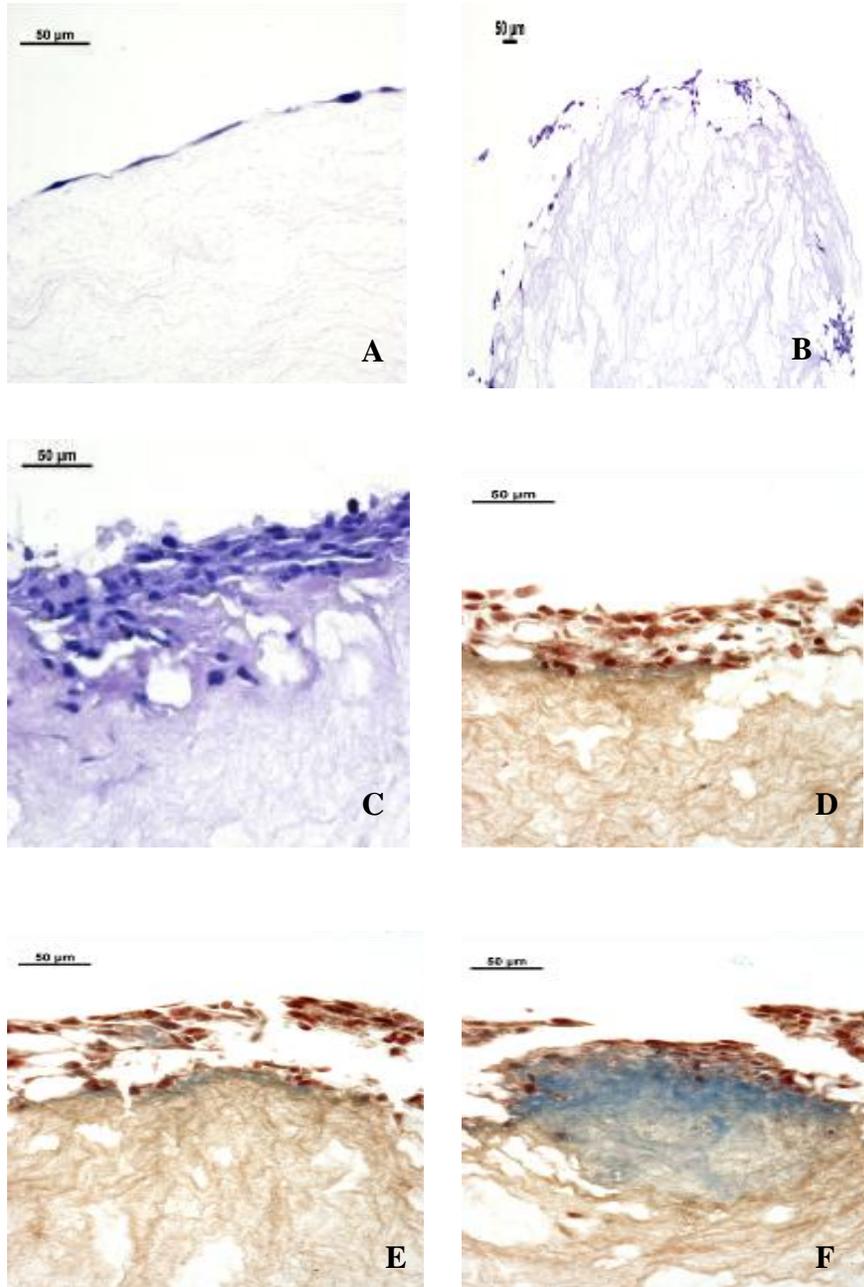


**Figura 12.** Los geles de fibrina reducen mucho su tamaño en cultivo celular. A) Fibrina recién hecha en un pozo de una placa de 96 pocillos B) Mismo pocillo después de 7 días de cultivo, C) Geles en placa de 24 pocillos después de 7 días de cultivo. Representativo de varios experimentos.

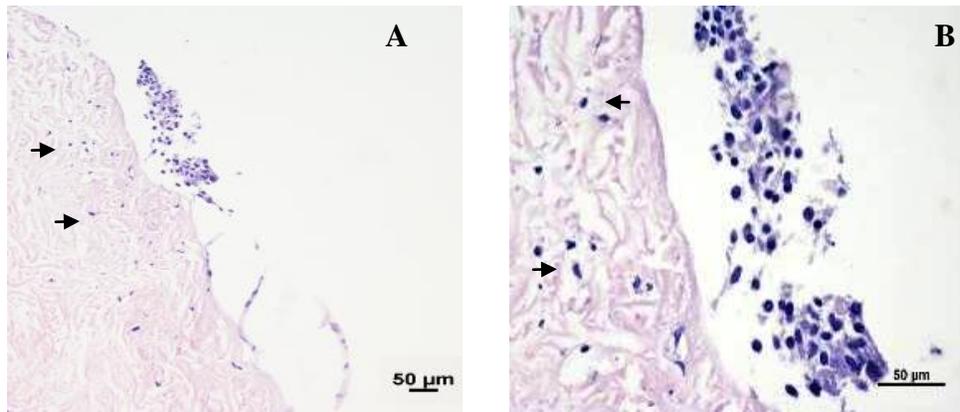
#### **6.4 Equivalentes cutáneos de fibrina con fibroblastos y queratinocitos**

Los andamios de Plasma 80%/Agarosa 0.1% con  $40 \times 10^3 / \text{cm}^2$  fibroblastos,  $400 \times 10^3 / \text{cm}^2$  queratinocitos y con o sin CD/CL  $100 \times 10^3 / \text{cm}^2$ , rebasaron la densidad celular utilizada en las pruebas anteriores, por lo que los geles con los tres tipos celulares no se mantenían por 15 días de cultivo, ni se pudo obtener una estratificación epitelial según lo reportado (Regnier *et al.*, 1998; Facy *et al.*, 2004; Llamas *et al.*, 2006). La mayor cantidad de geles recuperados y de mejor calidad fueron aquellos en los que no se sembraron CD/CL los cuales fueron fijados en cuanto presentaron signos de reducción de tamaño en promedio los días 5-7 de cultivo (Figura 13).

A los constructos de fibrina se les agregó primero una capa de fibroblastos (Figura 13A), ya que sin ella no se notaba la presencia de queratinocitos (datos no mostrados). Sobre los fibroblastos (Figura 13B) se sembraron los queratinocitos a una proporción de  $400 \times 10^3 / \text{cm}^2$ , hay que señalar que, aquellos constructos con CD o CL en general no terminaron el periodo de cultivo. En las Figuras 13B y Figura 13C se observa un gel teñido con H-E, en esta tinción se pueden observar las células epiteliales en coloración azul, en la Figura 13B se observó un epitelio amplio rodeando la superficie del gel, pero escaso en unas zonas y bastante desprendido de la base por lo que parece que se pierde en algún momento de la manipulación, en la Figura siguiente 13C se observó a mayor aumento una región de este mismo gel. Las fotomicrografías de Masson, muestran que los fibroblastos son capaces de producir matriz de colágena la cual se tiñe de azul (Figura 13D-F). El desprendimiento del epitelio se observa incluso en un experimento realizado sobre una matriz de colágena desnaturalizada por ciclos de congelación-descongelación en ella podemos observar la misma tendencia de desprendimiento a lo largo del constructo (Figura 14A y B), pero es evidente que existe una migración de los fibroblastos dentro de la colágena, migración que en ningún caso se observa en los constructos de fibrina.



**Figura 13.** Fotomicrográficas de constructos con base dérmica fibrina con fibroblastos y queratinocitos. A) Geles de fibrina con monocapa de fibroblastos; B) Panorámica en H-E de un gel en donde se sembraron fibroblastos y queratinocitos por 7 días. C) Epitelio formado en un gel de fibrina teñido con H-E. D al F) Tinción de Masson para los geles de fibrina con queratinocitos y fibroblastos en donde la fibrina es particularmente rosada y la colágena producida es teñida en azul. Las barras indican 50 µm. n=3.

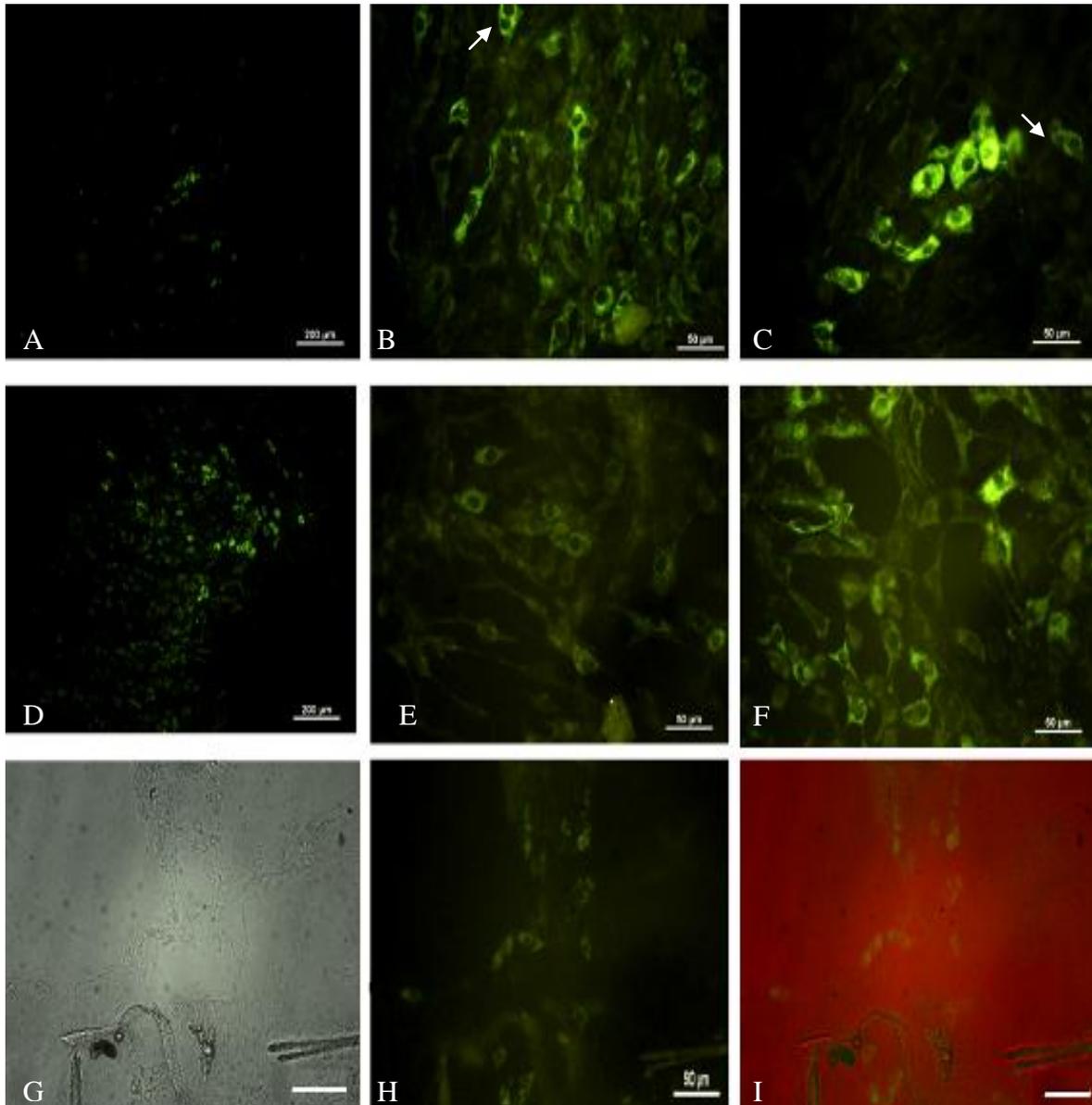


**Figura 14.** Fotomicrografías de constructos con andamio de colágena desvitalizada. Note la mejora en la migración de los fibroblastos dentro del andamio (Flechas). Tinción HE, barras de 50µm(n=3).

### 6.5 Presencia de CL en co-cultivos con queratinocitos y fibroblastos

Se efectuó un cultivo de los tres tipos celulares sin andamio (fibroblastos, queratinocitos y células dendríticas (diferenciadas para CL o CD convencionales), los cuales fueron alimentados con medio para el crecimiento de queratinocitos que no se encuentra suplementado con  $TNF\alpha$  o  $TGF\beta1$ . Las muestras se procesaron para inmunofluorescencia contra CD207 y los resultados se muestran en la Figura 15. En la Figura 15A-C, se muestra la inmunofluorescencia contra CD207 en los cocultivos adicionado con CL diferenciadas de médula ósea con  $TGF\beta1$ ; en Figura 15D-F cocultivo donde se sembraron CD convencionales diferenciadas de médula ósea sin  $TGF\beta1$ , la marca del anticuerpo es verde, nótese que en ambos casos existe una fuerte presencia de marca, aún en las que no se diferenciaron previamente hacia CL (Figura 8). En la Figura 15G-I, se observa la mezcla de los canales fluorescentes y de campo claro, en este se puede apreciar el cúmulo de queratinocitos adherido a la placa y posteriormente (Figura 15H) la misma zona pero en el canal de fluorescencia donde se observan las células que presentan marca; la marca en todos los casos es muy fuerte así como la presencia de las células marcadas sólo en aquellas zonas dentro de los cúmulos de queratinocitos, lo que indica

que las CL son capaces de adherirse, así como el hecho de que existan células fuertemente marcadas en los cultivo de CD convencionales (Figura 15D-F) indica que éstas son capaces de diferenciarse en presencia de queratinocitos.



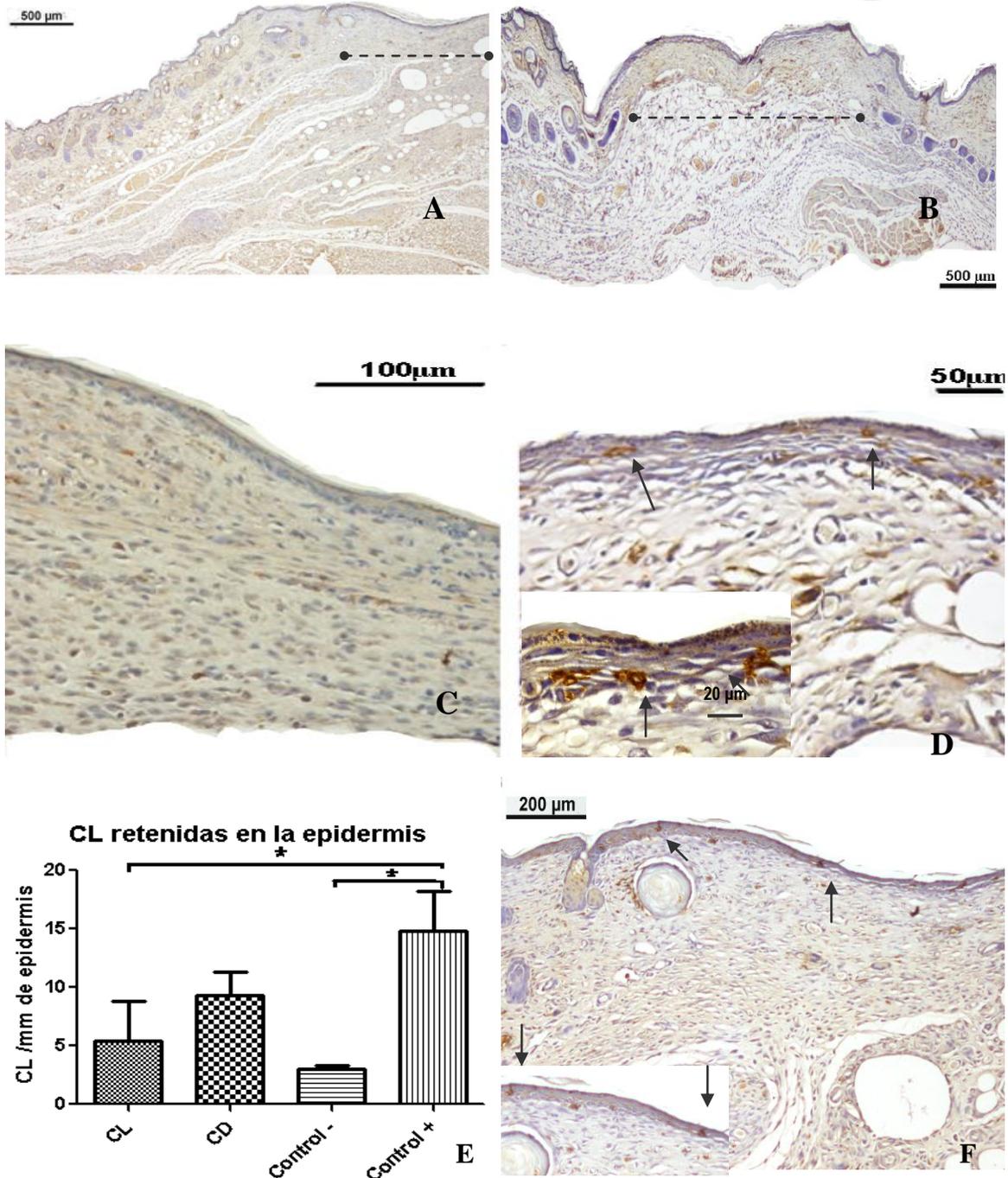
**Figura 15.** Fotomicrografías de inmunofluorescencia contra CD207, en un co-cultivo en placa de fibroblastos, queratinocitos y/o células diferenciadas a CD o CL, los cultivos no fueron adicionados con  $TNF\alpha$  o  $TGF\beta$ . A-B) Co-cultivos con células diferenciadas a CL. Flechas indican células en división. D-F) co-cultivo de células diferenciadas a CL. Cultivo de 7 días, marcadas con Streptavidina FITC (BDBiosciencies).

## 6.6 Determinación de la permanencia de CL implantadas *in vivo*

Como los geles de fibrina no soportaron la proliferación de los tres tipos celulares, se decidió realizar el constructo, e implantarlo en ratones para permitir que las células proliferaran a su vez que la fibrina se reabsorbiera por el animal, de esta manera en el caso de sobrevivir las células, éstas se encontrarían insertadas en la epidermis del sitio de la lesión. Al final de 15 días las células que se encontrarían sólo serían las que se pusieron en el constructo, ya que la migración y proliferación de las CL del animal no empieza hasta 3 a 4 semanas después de ocurrida una lesión (Dámarchez *et al.*, 1992). Los ratones fueron sacrificados y las cicatrices donde se implantó el parche se retiraron y procesaron por técnica histológica convencional, posterior a lo cual se les realizó una inmunohistoquímica contra MHCII para evaluar la presencia de CL en la epidermis. Existen diferentes células que expresan esta molécula como macrófagos o CD dérmicas por lo que sólo se tomaron en consideración las CD positivas que se encontraron en la epidermis de la muestra.

En la Figura 16 se muestran las microfotografías de las muestras, en las cuales se realizó el análisis contando únicamente las células positivas que residen en la epidermis en el área de la cicatriz producida por la cirugía y donde se colocó el constructo cutáneo, esta área fue identificada histológicamente por el cambio en la morfología normal de la piel con una ausencia de folículos pilosos y glándulas asociadas así como el cambio en el arreglo de las fibras de colágena y la falta del tejido muscular subcutáneo (Figura 16 A y B), es clara la presencia en la epidermis de células con marca a MHCII lo que indica la presencia de CL en las zonas de implante del constructo. En la gráfica de la Figura 16E se presenta el número total de CL encontradas en cada grupo expresado en CL por mm lineal de epidermis, el análisis estadístico de este experimento fue un ANOVA de una vía que indicó diferencias con respecto al número de CL/mm lineal de epidermis entre los grupos con una  $P=0.0121$  ( $P<0.05\%$ ), la prueba de comparación múltiple de Tukey ( $P<0.05$ )

comprobó que existen diferencias entre el control positivo y el control negativo así como entre el grupo control positivo y el grupo CL lo que indica que los ratones injertados con constructos sin CL/CD y los injertados con CL presentan menor cantidad de células positivas a MHCII en la epidermis que los ratones con piel normal sin cirugía. El estadístico no indicó diferencias entre los grupos experimentales y el control negativo. Sin embargo, la tendencia de las media del grupo CD se encuentra arriba de la media del control negativo ( $8.696 \pm 1.757$ DS contra  $3.552 \pm 0.3161$ DS) lo que es claro en la gráfica de la Figura 16E. El análisis morfológico demuestra la ubicación central de CL en la epidermis en las muestras del grupo CD (n=3), en comparación con la ubicación periférica de las CL de los demás grupos QN y CL (n=3) (Figura 16 C, D y F).



**Figura 16.** Fotomicrografía de Inmunohistoquímicas contra MHCII de sitios de la lesión donde se injertaron constructos de fibrina. A) y B) Microfotografía de la cicatriz nótese la ausencia de folículos pilosos y las glándulas sebáceas así como el desarreglo de la colágena (líneas punteadas), C) Control (-) no presenta CL en el centro de la cicatriz en comparación a las muestras de grupo CD, D) Grupo CD: existe la presencia de CL a lo largo de la epidermis en el sitio de lesión F) Grupo CD y el detalle de las CL en la epidermis. E) Gráfica de cada grupo y el No de CL/mm lineal de epidermis. Prueba ANOVA de una vía, postprueba de Tukey Kramer ( $P < 0.05$ ).  $n=3$ .

## 7. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue construir equivalentes cutáneos *in vitro*, empleando geles contruidos con fibrina obtenida de plasma humano, en los cuales se colocaron fibroblastos, queratinocitos y células dendríticas en la epidermis conocida como células de Langerhans, obtenidos de ratones de la cepa Balb/c.

La literatura reporta entre las cualidades de la fibrina su potencial como agente terapéutico ó como adhesivo para heridas (Currie *et al.*, 2001) y recientemente su uso en la fabricación de piel artificial para el implante en pacientes quemados (Gómez *et al.*, 2011), con úlceras (Llames *et al.*, 2006) o con daño de la mucosa oral (Peña *et al.*, 2010). Estos estudios mostraron que la fibrina posee buenas propiedades para ser injertada y usada en pacientes, sin embargo, en todos los casos las densidades celulares que se emplearon estuvieron muy por debajo de las necesidades detectadas en este estudio. Meana y colaboradores (1996) trabajaron con volúmenes de 16 ml de solución de plasma con  $500 \times 10^3$  fibroblastos en el gel, lo que corresponde a aproximadamente  $33 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^3$  con alrededor de  $9 \times 10^3$ /  $14 \times 10^3$  queratinocitos/ $\text{cm}^2$  de superficie de gel como máximo otras concentraciones celulares fueron  $3 \times 10^3$ - $5 \times 10^3$ / $\text{cm}^2$  o incluso  $1.8 \times 10^3$ - $2.8 \times 10^3$ / $\text{cm}^2$  de queratinocitos en las que se observó una adecuada confluencia y estratificación al día 15 de cultivo. El mismo autor advierte que a mayor densidad de células los geles llegan a desintegrarse, mientras que otros trabajos reportan  $4 \times 10^3$  fibroblastos/ $\text{cm}^2$  de solución de plasma más  $30 \times 10^3$  queratinocitos/ $\text{cm}^2$  (Peña *et al.*, 2010) y hasta  $500 \times 10^3$  células/ $\text{cm}^3$  (Syedain *et al.*, 2008).

En todos los casos anteriormente señalados las concentraciones de células por volumen de fibrina se encuentran por debajo de las que fueron utilizadas en este trabajo y las reportadas en otros trabajos que han logrado incorporar CL con queratinocitos sobre un soporte de colagéna y/o con melanocitos humanos (Regnier *et al.*, 1998; Facy *et al.*, 2004; Facy *et al.*, 2005). La densidad celular utilizada en estos trabajos fue de  $50 \times 10^3$  CL

(marcador CD1a+) y 400,000 queratinocitos/cm<sup>2</sup> y 500X10<sup>3</sup> células CD34+ cultivadas 6 días con GM-CSF y TNF $\alpha$  (Facy *et al.*, 2004, Facy *et al.*, 2005) así como 50X10<sup>3</sup> melanocitos/cm<sup>2</sup> (Regnier *et al.*, 1998), es importante hacer notar que en ninguno de estos trabajos se utilizaron fibroblastos. Estos estudios reportaron una morfología idéntica a la encontrada en la epidermis normal humana con una buena estratificación del epitelio además de la presencia de CL entre los queratinocitos con una densidad aproximada a la normal *in vivo* (30X10<sup>3</sup>CL/mm epidermis), así como la duración y permanencia de las CL dentro del andamio hasta 4 semanas después de construido el andamio.

Las cualidades más aclamadas de la fibrina en su uso como andamio son: la homeostasis, adherencia, su capacidad para permitir la migración, así como el hecho de que es un material 100% absorbible, todas ellas propiedades insuperables en clínica (Currie *et al.*, 2001). Nuestros resultados muestran que invariablemente los geles contruidos de fibrina reducen su volumen conforme pasa el tiempo (ANOVA de dos vías, para la variable días P< 0.0001 ) y el número celular se incrementa (ANOVA de dos vías para comparar el número celular P<0.02 Figuras 11 y 12); sólo se logro disminuir la desintegración de fibrina cuando se le adicionó una sustancia endurecedora como la agarosa reportada anteriormente por Serrato (2010) a una concentración de 0.1%, donde se pudo obtener aproximadamente 75% de fibrina conservada a los días 12 y 14 de cultivo (Figura 11, P<0.5%), mejorando en comparación con los geles sin agarosa en aproximadamente 35% más de volumen de gel recuperado. Sin embargo, nuestros cultivos necesitaban contener tres tipos celulares, por lo que la densidad celular se mantuvo muy por encima de lo reportado por los investigadores que habían utilizado previamente a la fibrina como andamio.

Con la utilización de geles con agarosa 0.1% así como plasma 80% y la disminución del periodo de cultivo, se lograron obtener muestras con el suficiente tamaño como para ser procesadas con técnica histológica convencional (Figura 13, n=3), las cuales fueron

teñidas con H-E y Masson para evaluar la estructura del andamio y el epitelio. En la mayoría de los andamios construidos de fibrina reportados en la literatura, no se consiguió una estratificación de más de 3-5 capas celulares si no es hasta que se injertó el andamio a un ratón y/o paciente (Meana *et al.*, 1998; Llames *et al.*, 2006) en los andamios construidos en colágena la estratificación es más significativa con sólo el periodo en cultivo de 15 días (Regnier *et al.*, 1998; Facy *et al.*, 2005). En los geles obtenidos en este trabajo y reportados en la Figura 13 se observan regiones donde se puede observar un epitelio con 3 o 4 capas de células, así como la evidencia de producción de colágena por los fibroblastos (teñida en azul en el Tricrómico de Masson), lo que evidencia que las células se encuentran vivas y activas metabólicamente, en especial los fibroblastos de los que depende estrechamente la supervivencia de los queratinocitos en cultivo (Rheinwald y Green, 1975) e *in vivo* al producir varios factores de crecimiento de los que dependen los queratinocitos como el EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), KGF (Factor de Crecimiento de Queratinocitos) e IGF (Factores de Crecimiento Parecidos a la Insulina) (El Ghalbzouri *et al.*, 2002). El resto de la superficie del epitelio presenta un marcado desprendimiento de la capa celular, el cual es probable que se pierda en la manipulación de los geles o en el momento de procesar las muestras.

En la Figura 14 se observa un andamio de colágena desvitalizada de ratón con el mismo desprendimiento de la capa epitelial, pero es claro que aumenta considerablemente la capacidad de los fibroblastos de migrar dentro del soporte. Ésta clase de migración no se observó en ningún caso con el uso de la fibrina humana (Figura 13). Lo anterior sugiere que el andamio de fibrina/agarosa no posee las características adecuadas para permitir la migración de los fibroblastos dentro de este, en condiciones normales en una herida la fibrina permite el paso de los fibroblastos que se han modificado para contraer y cerrar la lesión y a los cuales se les denomina miofibroblastos (Geneser, 2000). En los estudios con andamios de fibrina injertados se observó que los fibroblastos migran dentro del

andamio de fibrina sin problemas obedeciendo a factores tales como TGF $\beta$ 1, FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos), VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular) (Greiling y Clark, 1997). En la mayoría de estos trabajos no se reporta el tamaño del poro creado en el gel o las concentraciones exactas de fibrinógeno utilizadas por provenir de una mezcla de plasma de pacientes las que se encuentran entre 4-9 mg/ml de fibrinógeno (Meana *et al.*, 1998) y algunos otros reportan entre 12 y 17 mg/ml (Lames *et al.*, 2004) en cuyo caso la concentración es muy variable entre cada experimento del estudio; según Pandit y colaboradores (1998), el tamaño del poro creado y la cantidad de fibrinógeno utilizado fue importante para mejorar la migración en su andamio, y por lo cual recomienda un tamaño de poro entre 20 y 125  $\mu$ m así como la utilización de una concentración de fibrinógeno de alrededor de 60 mg/ml.

Lo anterior nos indica que no obstante las ventajas prácticas que representa el uso de la fibrina, pues es un material barato y fácil de conseguir, es sumamente importante, conocer las características propias del gel, ya que en cada caso utilizando una mezcla de plasma humano se desconoce la cantidad de fibrinógeno y el tamaño de poro creado en cada concentración, lo que puede intervenir en la reproducibilidad de los experimentos, lo mismo ocurre cuando se utilizan andamios mixtos como es el caso del Plasma/agarosa. En este trabajo se utilizaron varias concentraciones de plasma (Figura 11) pero esto no garantizaba la concentración real de fibrinógeno en las mezclas, así mismo estas variaciones en concentración entre las muestras de plasma podrían explicar porque en el presente trabajo sólo algunos geles se conservaron de varios experimentos, realizados con las mismas condiciones experimentales y diferente lote de plasma, sumado a la concentración celular y el tiempo transcurrido como ya se explicó anteriormente.

Recientemente se han usado biomateriales mixtos para poder crear andamios en donde se complementen las propiedades de cada biomaterial y/o controlar los problemas asociados a cada uno de ellos (Serrato, 2010). Así, la agarosa permitió que los

constructos duraran más tiempo en cultivo controlando el rango de desintegración de la fibrina en comparación a la utilización de plasma sin agarosa (Figura 6). En la literatura se reporta que se han empleado sustitutos artificiales hechos con plasma/agarosa para crear por ingeniería tisular sustitutos de córneas, piel y mucosa oral (González-Andrade *et al.*, 2009; Alaminos *et al.*, 2006; Alaminos *et al.*, 2007; Serrato 2010), pero no reportan datos de la caracterización de este material en cuanto a dureza o tamaño del poro obtenido. Es importante destacar que en los trabajos citados anteriormente el objetivo de la creación del constructo cutáneo es el trasplante que se realiza tanto a nivel experimental en ratón como en clínica en pacientes humanos, por lo que sus constructos tienen un gran volumen de plasma y de superficie. En algunos trabajos llegan a crear parches de piel artificial de entre 60 a 75 cm<sup>2</sup> con volúmenes totales de plasma por parche de entre 12 a 27 ml (Meana *et al.*, 1998; Llames *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2010), y para efectos de trasplante se deben de realizar tantos parches como lo necesite la gravedad y tamaño de la lesión (Llames *et al.*, 2006).

La creación de los pocos constructos cutáneos con CL se han realizado para obtener una herramienta de evaluación *in vitro* del comportamiento de las CL en los primeros estadios de la respuesta inmunológica (Regnier *et al.*, 1998; Facy *et al.*, 2004; Facy *et al.*, 2005), para lo cual no son necesarios volúmenes grandes ya que en estos casos se han utilizado superficies de colágena de 1.1 cm<sup>2</sup> (Regnier *et al.*, 1998; Facy *et al.*, 2004). En resumen, el uso de la fibrina tiene muchas ventajas como andamio en la ingeniería de piel, sin embargo, para los fines particulares de este trabajo es necesaria la estandarización de estas propiedades y condiciones para mejorar su rendimiento en cultivos largos y con una elevada densidad celular: El uso de una mezcla de fibrina/agarosa mejoró (Figura 11 y 13) los resultados que se obtenían con constructos hechos sólo con plasma (datos no mostrados) lo que nos indica que es importante trabajar en la utilización de andamios compuesto de biomateriales mixtos que permitan mejorar sustancialmente el desempeño

del equivalente cutáneo en cultivo y de esta manera poder obtener un andamio con las características adecuadas para realizar ensayos *in vitro* con las CL.

Por otro lado, el objetivo de este trabajo era obtener CL en cultivo así como determinar si era posible mantenerlas en cocultivo con queratinocitos y fibroblastos. La obtención de CL a partir de su diferenciación *in vitro* con citocinas como GM-CSF, TNF $\alpha$  y TGF $\beta$ 1, mejora el rendimiento que se obtiene si es que estas células fueran extraídas desde piel ( $6.77\% \pm 2.03$  &  $33.15\% \pm 6.5$  Figura 7 B y C), con un fenotipo inmaduro ya que no expresan niveles altos de CD40 y CD86 y con marcadores de CL como E-cadherina, CD207 y MHCII después de concluida la diferenciación a los 7 días de cultivo (Figura 9) así como una marcada forma dendrítica (Figura 9 y 10), nuestros resultados son compatibles con los trabajos publicados (Strobl *et al.*, 1996; Caux *et al.*, 1999; Jaksist *et al.*, 1999; Lutz *et al.*, 1999).

Para averiguar si el cocultivo con queratinocitos permitía la permanencia de las CL se realizó un experimento donde sólo se sembraron queratinocitos, fibroblastos y CD o CL en una placa de cultivo y las cuales fueron alimentadas con medio Qc y en donde se evaluó la presencia de marca para CD207 por inmunofluorescencia, las CL que se observan en la Figura 15 presentan una fuerte marca para CD207, y afinidad por los queratinocitos debido a que se anclan a los queratinocitos por medio de uniones para E-cadherina. Esta molécula de unión intercelular es característica de células de los epitelios, la cual no es expresada por ningún otro tipo celular en médula ósea, y es sólo hasta su diferenciación a CL que se expresa en cultivo, por lo que se considera que sólo es expresada por las CL y un pequeño grupo de CD en ganglios linfáticos provenientes de la piel las cuales se consideran derivadas de CL (Borkowski *et al.*, 1994; Villablanca y Mora 2008). Así mismo como se observa en la gráfica de puntos de la citometría para medir E-cadherina (Figura 9C) la amplia región de CD presentes en cultivo pueden ser E-cadherina positiva (cuadrante superior derecho) o negativas (cuadrante inferior derecho) pero sólo las CL

son CD207+ E cadherina+; esta molécula les permite estar adheridas a los queratinocitos en la epidermis y en el caso del experimento de la Figura 15, permite a las CL adherirse y permanecer en cocultivo con queratinocitos y es regulada a la baja cuando las CL se activan y migran (Jakob y Udey, 1998). Como es sabido, las CL son células presentadoras de antígenos de la epidermis adaptadas para convivir y responder al microambiente de este tejido. Las CL responden a lo largo de su ciclo de vida a varios de los estímulos paracrinos directos producidos por los queratinocitos, como la secreción de TNF $\alpha$  la cual es responsable de que las CL migren (Cumberbach *et al.*, 2003), así como a la inducción de la proliferación masiva de CL debido a señales que emiten durante la inflamación ocurrida en la piel (Chorro *et al.*, 2009) o por el reclutamiento de precursores de CL desde la sangre periférica en respuesta las citocinas producidas (TGF $\beta$ 1) por los queratinocitos (Merad *et al.*, 2008) por lo que es claro que la tendencia de estas células es convivir y diferenciarse a partir de precursores CD en presencia de las células epidérmicas lo cual como hemos visto es posible conseguir en cultivos *in vitro*.

La diferenciación de CL en cocultivo con queratinocitos había sido reportada anteriormente sólo a partir de precursores CD34+, ya que éstas son células multipotentes que originan el linaje mieloide (Regnier *et al.*, 1998). Por lo observado en el histograma de la Figura 8 las CD diferenciadas 7 días con snGMCSF, no fueron positivas a CD207, sin embargo, en la Figura 15D y F se observaron CL a partir de las CD sembradas en cocultivo con los queratinocitos. Tanto las CD como las CL fueron separadas con anticuerpos CD11c que es una molécula presente en todas las CD. Aparece en etapas tempranas de diferenciación en cultivo así como células CD11c+/MHCII- (Koch *et al.*, 2006), además en sangre periférica se han aislado precursores CD1a+ /Cd11c+ como precursores directos de CL (Ito *et al.*, 1999).

Los precursores tempranos de CD tienen la capacidad de diferenciarse a CL en forma dependiente de TGF $\beta$ 1 *in vitro* (Jaksits *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1999; Kaplan *et al.*, 2007)

como *in vivo* (Ginhoux *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 2007). Los queratinocitos producen constitutivamente TGF $\beta$ 1, citocina que es indispensable para la migración de precursores de CL hacia la epidermis, además de producir otras quimiocinas como CCL2/MCP-2 responsables de la adhesión e incursión de precursores de CL dentro de la piel; las cuales además son reguladas en condiciones de estrés (Chodakewitz *et al.*, 1990; Sozzani *et al.*, 2000). Por otro lado, estudios recientes demostraron la enorme capacidad proliferativa de las CL maduras, la cual puede ser dirigida por señales provenientes de los queratinocitos (Chorro *et al.*, 2009), lo cual observamos en nuestros cultivos (Figuras 15B y C, flechas). Por lo anterior, es claro que las CL pudieron diferenciarse en nuestros cocultivos queratinocitos a partir de precursores presentes en los cultivos antes de ser sembrados así como se presenta la proliferación de las CL existentes en un microambiente adecuado creado por lo queratinocitos.

Puesto que no pudimos analizar la presencia de CL en andamios de fibrina decidimos realizar un experimento paralelo para evaluar si las CL estaban en los constructos antes de que se desintegrara la fibrina. Para ésto consideramos que era posible detectar CL/CD injertadas sobre un andamio en una lesión realizada sobre un ratón Balb-c. Como ya se menciona la fibrina es un material que se absorbe rápidamente en una herida, desde 4 días y es completamente indetectable a los 10 (Metcalf y Ferguson, 2007), además, cuando existe una pérdida de piel, el sitio de la lesión cicatriza y no comienza a ser repoblado por CL hasta después de un mes de ocurrida la lesión (Dámarchez *et al.*, 1992). Así conseguimos evaluar la presencia de CL en las cicatrices de los ratones después de injertarles un andamio con CL (Figura 16).

La evaluación de la presencia de las células MHCII positivas en la epidermis, comprobó que existen diferencias entre el control positivo y el control negativo así como entre el grupo control positivo y el grupo CL lo que indica que los ratones injertados con constructos sin CL/CD y los injertados con CL presentan menor cantidad de células

positivas a MHCII en la epidermis que los ratones con piel normal sin cirugía (la prueba de comparación múltiple de Tukey  $P < 0.05\%$ ). Sin embargo, y aunque no fue significativo, la tendencia de las medias del grupo CD se encuentra arriba de la media del control negativo ( $8.696 \pm 1.757$ DS contra  $3.552 \pm 0.3161$ DS Figura 16E), así mismo el análisis morfológico demuestra la ubicación central de CL en la epidermis en las muestras del grupo CD ( $n=3$ ) en comparación con la ubicación periférica de las CL de los demás grupo QN ( $n=3$ ) (Figura 16 C, D y F). Si bien es necesario aumentar el número de la población del estudio, es importante resaltar esta observación. Los equivalentes cutáneos que se han puesto en lesiones de ratones han demostrado que la repoblación de estas áreas por las CL se realiza más rápidamente en la periferia que en el centro de ésta (Rowden *et al.*, 1992). Debido a que las CL de la piel normal del ratón que quedaron a la orilla de la lesión son capaces de responder y repoblar poco a poco el área dañada, la migración dentro de la lesión por precursores se realiza más lentamente y sólo ante una importante pérdida de CL (Dámarchez *et al.*, 1992; Chorro *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que es posible que las CL encontradas en esta área del tejido dañado son aquellas CL que se encontraban en el constructo injertado de fibrina y que se mantuvieron y acoplaron a la epidermis de los ratones.

## **8. CONCLUSIONES**

Fue posible obtener CL diferenciadas de médula ósea en cultivo, pero además se demostró que las CL son capaces de permanecer, reproducirse y diferenciarse en cultivo en el microambiente creado por los queratinocitos y fibroblastos. La creación de andamios con estas células es un procedimiento fácilmente realizable y repetible. Por otro lado es innecesaria la diferenciación de las CL en cultivos antes de la siembra con queratinocitos, ya que estas tienen la capacidad de diferenciarse desde precursores CD con lo que se reducirían los gastos de producción. Para los objetivos planteados en este trabajo, el utilizar un andamio de fibrina no resulta ser recomendable debido a que no soporta períodos largos de cultivo y una elevada densidad celular, sin embargo, es posible atenuar este factor combinando a la fibrina con otro material como la agarosa y así aumentar la vida en cultivo de los andamios. Aun así es necesario caracterizar esta mezcla, variar las concentraciones de agarosa o probar otros materiales más eficaces para la mejorar las propiedades del andamio de fibrina.

## 9. PERSPECTIVAS:

- Evaluar a la agarosa como endurecedor de fibrina a diferentes concentraciones.
- Evaluar diferentes tipos de endurecedores de fibrina para mejorar su rendimiento en cultivos con mayor número celular y por periodos prolongados.
- Determinar la capacidad de las CD de generar CL en cocultivo con queratinocitos.
- Evaluar los precursores de CD que son capaces de diferenciarse a CL *in vitro*.
- Determinar la permanencia de CD sobre andamios por periodos prolongados.
- Evaluar la producción de membrana basal sobre un andamio *in vitro*.
- Evaluar las proteínas de unión a membrana basal de los queratinocitos.
- Evaluar el tiempo de supervivencia de las CD en los constructos con queratinocitos y fibroblastos.
- Evaluar marcadores de CL en los constructos con fibroblastos y queratinocitos.
- Evaluar el potencial migratorio de las CD en constructos en presencia de algún sensibilizador de contacto.
- Determinar la presencia de Gránulos de Birbeck en las CD presentes dentro del constructo.

## 10. REFERENCIAS

- Alaminos M., Garzón I., Sánchez-Quevedo MC., Moreu G., Gonzáles-Andrade M., Fernández-Montoya. y Campos A. 2007. Time course study of histological and genetic patters of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med.* 1:350-359.
- Alaminos M., Sánchez-Quevedo MC., Muños-Ávila JI., Serrano D., Medaldea S., Carreras I. y Campos A. 2006. Construction of a complete rabbit cornea substitute using fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophtalmol Vis.* 47:3311-3317.
- Arvelo F. 2007. Ingeniería de tejidos y producción de piel humana *in vitro*. *Invest Clin.* 48(3): 367 – 375.
- Banchereau J. y Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392(6673): 245-252.
- Billingham RE. y Silvers WK. 1991. Some unsolved problems in the biology of skin, en: Lyne, A.G. y Short B.F.; Eds. Angus & Robertson, *Biology of the Skin and hair Growth*, Sydney, 1965. en: Shuler G, *Epidermal Langerhans Cells*, CRC Press, USA.
- Birbeck MS., Breathnach AS. y Everall JD. 1961. An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 37:51-64.
- Borkowski TA., Letterio JJ., Farr AG. y Udey M. C. 1996. A role for endogenous transforming growth factor  $\beta$ 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor b1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.*184:2417.
- Borkowski TA., van Dyke BJ., Schwarzenberger K., McFarland VW., Farr AG., y Udey MC. 1994. Expression of E-cadherin by murine dendritic cells: E-cadherin as a dendritic cell marker characteristic of epidermal Langerhans cells and related cells. *Eur J Immunol.* 24:2767.
- Boulais N. y Misery L. 2008. The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol.* 18 (2):119-27.
- Braverman IM., Sibley J. y Keh-Yen A. 1986. A study of the veil cells around normal, diabetic, and aged cutaneous microvessels. *J Invest Dermatol.* 86:57.
- Caux C., Massacrier C., Dubois B., Valladeau J., Dezutter-Dambuyant C., Durand I., Schmitt D. y Saeland S. 1999. Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in

the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors. *J Leukoc Biol.* 66(5):781-9.

- Caux C., Vanbervliet B., Massacrier C., Dezutter-Dambuyant C., Blandine de Saint-Vis., Jacquet C., Yoneda K., Imamura S., Schmitt D. y Banchereau J. 1996. CD34 + Hematopoietic Progenitors from Human Cord Blood Differentiate Along Two Independent Dendritic Cell Pathways in Response to GM-CSF+TNF $\alpha$ . *J Exp Med.* 184: 695-706.
- Chodakewitz JA., Lacy J., Edwards SE., Birchall N., y Coleman DL. 1990. Macrophage colony-stimulating factor production by murine and human keratinocytes. Enhancement by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 144:2190–2196.
- Chorro L., Aurélien S., Li Mei., Woollard KJ., Chambon P., Malissen B., Kissenpfennig A., Barbaroux J., Groves R., y Geissmann F. 2009. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med.* 206(13): 3089-3100.
- Cooper KD., Fox P., Neises G. y Katz SI. 1985. Effects of ultraviolet radiation on human epidermal cell alloantigen presentation: initial depression of Langerhans cell-dependent function is followed by the appearance of T6- Dr+ cells that enhance epidermal alloantigen presentation. *J Immunol.* 134 (1):129-37.
- Cuéllar-Ávila A., Cifuentes-Rojas C., Gómez-Gutiérrez A. y González-Escobar J. 2004. *Biología De Las Células Dendríticas Humanas.* Universitas Scientiarum. *Rev Fac Ciencias.* 9(1): 5-12.
- Cumberbatch M., Dearman R., Griffiths C. y Kimber I. 2003. Epidermal Langerhans cell migration and sensitisation to chemical allergens. *APMIS.* 111(7-8): 797–804.
- Cumberbatch M., Dearman RJ. y Kimber I. 2001. In vivo assays of Langerhans cell migration. En: *Methods in molecular medicine vol. 64: Dendritic Cell Protocols.* Robinson S.P y Stagg A.J (ed) Humana Press Inc. Totowa NJ. 331-346.
- Currie LA., Sharpe J. y Martin R. 2001. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered Skin Replacements: A review. *Plastic Recons Surg.* 108 (6):1713-1726.
- Démarchez M., Asselineau D., Regnier M. y Czernielewski. 1992. Migration of Langerhans Cells into the epidermis of human skin Grafted onto nude Mice. *S Inves Dermat.* 99 (5): 54S- 55S.

- El Ghalbzouri A., Lamme E. y Ponec M. 2002. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res.*310:189–199.
- Facy V., Flouret M., Régnier R. y Schmidt R. 2005. Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation. *Toxicol in vitro.* 19(2005) 787-795.
- Facy V., Flouret V., Régnier M. y Schmidt R. 2004. Langerhans Cells Integrated into Human Reconstructed Epidermis Respond to Known Sensitizers and Ultraviolet Exposure. *J Invest Dermatol.* 122(2): 552-553.
- Falke G. y Atala G. 2000 Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr.* 98(2):103.
- Geissmann F., Prost C., Monnet J., Dy M., Brousse N. y Hermine O. 1998. Transforming Growth Factor b1, in the Presence of Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor and Interleukin 4, Induces Differentiation of Human Peripheral Blood Monocytes into Dendritic Langerhans Cells. *J Exp Med.* 187 (6) 961–966.
- Geneser F. 2000. Histología. Editorial Médica Panamericana. 3° Ed. 2000. Cap 17. pp 445-456.
- Ginhoux F., Tacke F., Angeli V., Bogunovic M., Loubreau M., Dai X.M., Stanley E.R., Randolph G.J. y Merad M. 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature Immunol.* 7:265–273.
- Gómez C., Galán J.M., Torrero V., Ferreiro I., Pérez D., Palao R., Martínez E., Llamas S., Meana A. y Holguín P. 2011. Use of an autologous bioengineered composite skin in extensive burns: Clinical and functional outcomes. A multicentric study. *Burns.* 37: 580– 589.
- Gonzáles-Andrade M., Garzon I., Gascon M., Muñoz-Ávila J., Sánchez-Quevedo MC., Campos A. y Alaminos M. 2009. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med.* 3(6):442-449.
- Grand I., Featherstone J., Warwick C., Marshall J., Green C. y Matyin R. 1998. Reconstitution of an epidermis by dispersed sub-confluent cultured autologous keratinocytes delivered within a spray of autologous fibrin sealant (Vivostat). *Tissue Eng.* 11: 486.

- Greiling D. y Clark R. 1997. Fibronectin provides a conduit for fibroblast y transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Cli.* 110:861-869.
- Hotch RE., Bannasch H., Kopp J., Andree C. y Stark GB. 1998. Single-cell suspensions of cultured human Keratinocytes en fibrin glue reconstitute the epidermis. *Cell Transplant.* 7:309.
- Hundayi J., Farkas B., Bertenyi C., Ohal J. y Dobozy A. 1988. Keratinocyte grafting: A new means on transplantation for full-thickness wound. *J Dermatol Surg Oncol.* 14:75.
- Ikada Y. 2006. Challenges in tissue engineering. *J R Soc. Interface* 3: 589–601.
- Inaba K., Inaba M., Romani N., Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S. y Steinman R. 1992. Generation of Large Numbers of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow Cultures Supplemented with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor. *By Exp Med.* 176 :1693-1702.
- Iruretagoyena MI., Iacobelli HG. y Kalergis AM. 2005. Células Dendríticas como Determinantes del Equilibrio entre Inmunidad y Autoinmunidad. *Reumatol.* 21(2):58-64.
- Ito T., Inaba M., Inaba K., Toki J., Sogo S., Iguchi T., Adachi Y., Yamaguchi K., Amakawa R., Valladeau J., Saeland S., Fukuhara S. y Ikehara S. 1999, A CD1a1/CD11c1 Subset of Human Blood Dendritic Cells Is a Direct Precursor of Langerhans Cells. *J Immunol.* 163:1409-1419.
- Jakob T. y Udey MC.1998. Regulation of E-Cadherin-Mediated Adhesion in Langerhans Cell-Like Dendritic Cells by Inflammatory Mediators That Mobilize Langerhans Cells In Vivo. *J Immunol.* 160: 4067–4073.
- Jaksits S., Kriehuber E., Charbonnier AS., Rappersberger K., Stingl G. y Maurer D.1999. CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner. *J Immunol.* 163(9):4869-77.
- Kaplan DH., Li MO., Jenison MC., Shlomchik WD., Flavell RA. y Shlomchik MJ. 2007. Autocrine/paracrine TGFβ1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 204:2545– 2552.
- Kenet A. 1996. Cutaneous medicine and surgery: an integrated program in dermatology. Vol 2. Philadelphia. WB Saunders Co.
- Klareskog L., Malmnas-Tjertlund UM., Forsum U. y Peterson P. 1977. Epidermal Langerhans cells express la antigens. *Nature.* 268(5617):248-250.

- Koch S., Khol K., Klein E., Dagmar Von Bubnoff. y Bieber T. 2006. Skin homing of langerhans cell precursors: Adhesion, chemotaxis and migration. *J Allergy Clin Immunol.* 117(1): 163-168.
- Liu HN., Chang YT. y Wong CK. 1994. Enrichment of unlabelled human Langerhans cells by modified discontinuous Ficoll-metrizoate density medium and following Langerhans cell culture. *Clin Exp Dermatol.* 19 (2): 113-117.
- Llamas S., García E., García V., del Río M., Larcher F., Jorcano JL., Lopez E., Holguín P., Miralles F., Otero J. y Meana A. 2006. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank.* 7:47–53.
- Llamas SG., Del Rio M., Larcher F. 2004. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation.* 77:350–355.
- Lutz MB., Kukutsch N., Ogilvie AL., Rössner S., Koch F., Romani N. y Schuler G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 223(1):77-92.
- Macri L. y Clark RA. 2009. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds: Selecting the Proper Time and Space for Growth Factors, Cells and the Extracellular Matrix. *Skin Pharmacol Physiol.* 22(2):83-93.
- Martinhão LR., Jussara Rehder S., Vassallo J., Cintra ML., Stangler Kraemer MH. y Puzzi MB. 2006. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *Sao Paulo Med J.* 124(2):71-76.
- Meana A., Iglesias J., Del Rio M., Larcher F., Madrigal B., Fresno M.F., Martin C., San Romana F. y Tevar F. 1996. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns.* 24: 621-630.
- Merad M., Ginhoux F, y Collin M. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 8(12): 935-947.
- Merad M., Romani N. y Randolph G. 2008b. Langerhans Cells at the Interface of Medicine, Science and Industry. *J Invest Dermatol.* 128(2): 251-255.
- Metcalfe AD. y Ferguson MW. 2007., Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface.* 4: 413–437.

- Mollah Zi., Aiba S., Nakagawa S., Hara M., Manome H., Mizuashi M., Ohtani T., Yoshino Y. y Tagami H. 2003. Macrophage Colony-stimulating Factor in Cooperation with Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces the Differentiation of CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Progenitor Cells Into Langerhans Cells Under Serum-free Conditions Without Granulocyte-macrophage Colony-stimulating. Factor. *J Invest Dermatol.* 120:256 -265.
- Morris J., Alaibac M., Jia MH. y Chu T. 1992. Purification of functional active epidermal Langerhans cells: a simple and efficient new technique. *J Invest Dermatol.* 99: 237.
- Musso T., Scutera S., Vermi W., Daniele R., Fornaro M., Castagnoli C., Alotto D., Ravanini M., Cambieri I., Salogni L., Elia AR, Giovarelli M, Facchetti F, Girolomoni G. y Sozzani S. 2008. Activin A Induces Langerhans Cell Differentiation In Vitro and in Human Skin Explants. *PLoS ONE.* 3 (9): e32711-10.
- Pandit A., Feldman D. y Caulfiel J. 1998. In vivo wound healing response to a modified degradable fibrin scaffold. *J Biomater Appl.* 12:222-230.
- Peguet-Navarro J., Moulon C., Caux C., Dalbiez-Gauthier C., Banchereau J. y Schmitt D. 1994. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur J Immunol.* 24(4): 884-891.
- Peña I., Junquera LM., Meana A., García E., García V. y De Vicente JC. 2010. *In vitro* engineering of complete autologous oral mucosa equivalents: characterization of a novel scaffold. *J Periodont Res.* 45: 375–380.
- Proksch E., Brandner JM. y Jensen JM. 2008 .The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 17(12):1063-1072.
- Ramírez-González MD., Herrera-Enríquez M., Villanueva-Rodríguez LG. y Castell-Rodríguez AE. 2009. Role of Epidermal Dendritic Cells in Drug-Induced Cutaneous Adverse Reactions. *Handb Exp Pharmacol.* 188:137-162.
- Regnier M., Patwardhan A., Scheynius A. y Schmidt R. 1998. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med Biol Eng Comput.* 36(6): 821-824.
- Rheinwald JG. y Green H. 1975 Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6:331–344.
- Rondfard V., Broly H. y Mitchell V. 1991. Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds. *Burns.* 17:181.

- Ross M. y Pawlina W. 2007. Histología, Texto y Atlas a Color con Biología Celular y Molecular. 5ª edición. Ed. Médica Panamericana.
- Rowden G., Colp S., Dean S., Auger F. y Lopez Valle C. 1992. Comparative epidermal Langerhans Cell migration Studies in epidermal and epidermal/Dermal equivalents grafts. *J Invest Dermatol.* 99:59S-61S.
- Rowden G., Lewis MG. y Sullivan AK. 1977. la antigen expression on human epidermal Langerhans cells. *Nature.* 268(5617):247-248.
- Serrato D. 2010. Tesis Doctoral, Evaluación de glucosa, malosa y thealosa como agentes criófixadores de tejidos artificiales obtenidos por ingeniería tisular. Universidad de Granada. Facultad de Medicina. España.
- Sozzani S., Allavena P., Vecchi A. y Mantovani A. 2000. Chemokinas: and dendritic cell traficc. *J Clin Immunol.* 20:151-60.
- Spangler HP. 1975. Tissue adhesion and local homeostasis using fibrinogen, trombin and clotting factor XIII. *Wien Klin Wochenschr.* 49:3-18.
- Stingl G., Katz SI., Clement L., Green I. y Shevach EM. 1978. Immunologic functions of Ia- bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol.* 121(5):2005-13.
- Stingl G., Wolff- Screiner Ch., Pichler WJ., Gschnait F., Knapp W. y Wolff, K. 1977. Epidermal Langerhans cell bear Fc and d3 receptors. *Nature.* 268(5617):245-256.
- Stoitzner P., Pfaller K., Stossel H. y Romani N. 2002. A Close-Up View of Migrating Langerhans Cells in the Skin. *J Invest Dermatol.* 118:117-125.
- Stoitzner P., Tripp H C., Douillard P., Saeland S. y Romani N. 2005. Migratory Langerhans Cells in Mouse Lymph Nodes in Steady State and Inflammation. *J Invest Dermatol.* 125(1):116 –125.
- Strobl H., Riedl E., Scheinecker C., Bello-Fernandez C., Pickl WF., Rappersberger K., Majdic O. y Knapp W. 1996. TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol.* 157(4):1499-1507.
- Swiggard WJ., Mirza A., Nussenzweig MC. y Steinman RM. 1995. DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol.* 165(2):302-311.

- Syedain ZH., Weinberg JS. y Tranquillo RT. 2008. Cyclic distension of fibrin-based tissue constructs: Evidence of adaptation during growth of engineered connective tissue. PNAS. 105(18) :6537–6542.
- Tang A., Amagai LG., Granger JR., Stanley M. y Udey C. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to Keratinocytes mediated by E-cadherin. Nature 361:82-88.
- Tchou I., Sabido O., Lambert C., Misery L., Garraud O. y Genin C. 2003. Technique for obtaining highly enriched, quiescent immature Langerhans cells suitable for ex vivo assays. Immunol Let. 86: 7-14.
- Teunissen MB. 1992. Dynamic nature and function of epidermal Langerhans cells *in vivo* and *in vitro*: a review, with emphasis on human Langerhans cells. Histochem J. 24(10): 697-716.
- Teunissen MB. 2005. Langerhans cells and other skin dendritic cells. En: Skin immune system: cutaneous immunology and clinical immunodermatology 3th ed. Bos J.D. (ed) CRC Press, Boca Raton, 123-182.
- Teunissen MB., Roenger H. y Bos JD. 1994. Function of adhesion molecular lymphocyte fu non-associated antigen 3 and intercellular adhesion molecule.1 on human epidermal Langerhans cells in antigen specific T activation. J Immunol. 152 3400-3406.
- Teunissen MB., Wormmeester J., Kapsenberg M.L. y Bos JD. 1988. Enrichment of unlabeled human Langerhans cells from epidermal cell suspensions by discontinuous density gradient centrifugation. J Invest Dermatol. 91:358-362.
- Thépaut M., Valladeau J., Nurisso A., Kahn R., Arnou B., Vives C., Saeland S., Ebel C., Monnier C., Dezutter-Dambuyant C., Imberty A. y Fieschi F. 2009. Structural Studies of Langerin and Birbeck Granule: A Macromolecular Organization Model. Biochemistry. 48: 2684–2698.
- Tridick RT. y Warner ED. 1944. Fibrin fixation of skin transplants. Surgery. 15: 90
- Valladeau J., Ravel O., Dezutter-Dambuyant C., Moore K., Kleijmeer M., Liu Y., Duvert Frances V., Vincent C., Schmitt D., Davoust J., Caux C., Lebecque S. y Saeland S. 2000. Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules. Immunity. 12:71–81.
- Villablanca EJ. y Mora JR. 2008. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. Eur J Immunol. 38: 2975–2980.

- Williams L.A., Egner W. y Hart DJ. 1994. Isolation and function of human dendritic cells. *Int Rev Cytol.* 153:41-50.
- Wong T., McGrath A. y Navsaria H. 2007. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British J Dermatol.* 156:1149–1155.
- Zhou L. y Tedder TL. 1996. CD141 blood monocytes can differentiate into functionally mature CD831 dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:2588-2590.