

TC  
Marta  
OK

# SUBSTITUTO CUTÂNEO RESULTANTE DO CULTIVO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS SOBRE DERME ALOGENA CONSERVADA EM GLICEROL

PREMIO NELSON PICCOLO

Herson MR, Mathor MB, Altran S, Capelozzi VL, Marchi Z, Ferreira MC

Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras – Laboratório de Investigação Médica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - São Paulo - SP

A melhora observada nas últimas décadas nos índices de sobrevivência de vítimas de acidentes com perdas cutâneas extensas, principalmente queimaduras, relaciona-se não apenas à melhora dos cuidados clínicos, mas também é resultado do consenso da importância da remoção precoce do tecido desvitalizado resultante do trauma e da cobertura das áreas desnudas com um substituto cutâneo. No entanto, a realização destes procedimentos é limitada pela disponibilidade de substitutos cutâneos eficientes, sejam estes temporários ou permanentes.

Considerando que a derme humana possui as características naturais ideais para a proliferação de queratinócitos em sua superfície, os autores propõem o uso de derme humana conservada em glicerol e de-celularizada para a o cultivo diretamente em sua superfície de queratinócitos semeados em alta densidade e sem o uso de “camada alimentadora”. Assim, a relativa simplicidade técnica do método de conservação de enxertos de pele em Bancos combinar-se-ia a culturas de queratinócitos sem a presença de fibroblastos murinos (3T3).

O equivalente dermo-epidérmico obtido é composto de derme recoberta por epitélio multi-estratificado, com características morfológicas semelhantes à epitélios de queratinócitos, com reorganização parcial da junção dermo-epidérmica, examinada sob microscopia ótica e eletrônica. A avaliação da expressão da Citoqueratina 14 e Involucrina através de ensaios de imunohistoquímica, estabeleceu um padrão normal de diferenciação celular. Tanto o sistema de cultivo imerso como na interface ar-líquido foram testados, sendo que os resultados finais favoreceram a situação organotípica.

O transplante destes compostos dermo-epidérmicos a ratos atímicos, evoluiu com a integração dos enxertos, excelente revascularização e re-povoamento da derme humana por fibroblastos murinos autóctone

Conclui-se que derme acelular conservada em glicerol pode ser utilizada como base para o cultivo de queratinócitos em sua superfície sem a presença de fibroblastos xenógenos, permitindo a construção *in vitro* de um equivalente cutâneo. Suas características morfológicas, resistência mecânica e baixa antigenicidade permitem vislumbrar seu uso como um substituto cutâneo permanente.

PRODUÇÃO TECNICO CIENTIFICA  
DO IPEN  
DEVOLVER NO BALCÃO DE  
EMPRÉSTIMO

2916

# SUBSTITUTO CUTÂNEO RESULTANTE DO CULTIVO DE QUERATINÓCITOS HUMANOS SOBRE DERME ALOGENA CONSERVADA EM GLICEROL

PREMIO NELSON PICCOLO

## INTRODUÇÃO

Este trabalho descreve a construção *in vitro* de um novo substituto cutâneo, potencialmente definitivo através do cultivo de queratinócitos humanos diretamente sobre aloderme acelular previamente conservada em glicerol. Observou-se a morfologia e função celulares e verificaram-se as conseqüências da exposição dos queratinócitos durante seu cultivo ao meio ambiente, utilizando para tanto, um sistema de cultivo na interface ar-líquido (1).

Apesar dos avanços no tratamento das vítimas de queimaduras graças ao melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no choque hipovolêmico que se segue ao trauma e à reposição hídrica adequada, ao estabelecimento de Unidades de Queimados permitindo atendimento especializado, ao uso de antimicrobianos tópicos e ao consenso quanto aos benefícios das ressecções precoces de escaras, a restauração da integridade cutânea ainda permanece um desafio. Enxertos autólogos continuam sendo a melhor opção em termos de revestimento definitivo, mas em pacientes extensamente queimados, as áreas doadoras são escassas. Mesmo existindo várias alternativas temporárias disponíveis comercialmente, ainda persiste a busca pelo substituto cutâneo permanente, biocompatível, facilmente disponível e de baixo custo.

As culturas de queratinócitos foram descritas já em 1952 (2). Rheinwald e Green, na década de 70, estabeleceram método aonde, a partir de uma pequena biopsia de pele, queratinócitos são isolados e cultivados *in vitro*, vindo a formar epitélios contínuos e multi-estratificados que podem ser transplantados (3). A sobrevivência dramática de duas crianças severamente queimadas utilizando epitélios autólogos cultivados trouxe grandes esperanças para os terapeutas (4). No entanto, experiência adicional demonstrou que a fragilidade destes epitélios cultivados não apenas exige grande habilidade técnica para seu cultivo e manuseio, como também qualidades do leito receptor normalmente difíceis de serem encontradas em termos de boa vascularização e baixa contaminação bacteriana. O conjunto de dificuldades técnicas, tais como o tempo necessário para a obtenção das quantidades desejadas de enxertos, os custos elevados, o nível de integração dos enxertos considerado insatisfatório por vários autores e a instabilidade prolongada dos enxertos, tem direcionado pesquisadores a buscar substitutos cutâneos mais resistentes, na maioria dos casos, através da adição de um componente dérmico.

Várias alternativas foram propostas, tais como géis de colágeno pré-fabricados (5)(6), matriz extracelular sintetizada por fibroblastos (7) e derme animal (8). Aloderme humana foi utilizada em situações clínicas como suporte para epitélios de queratinócitos cultivados, resultando em uma cobertura permanente(9)(10).

Derme alógena de baixa antigenicidade pode ser obtida através da de-celularização de enxertos alógenos de pele fornecidos por Bancos de Tecidos e pode ser conservada em glicerol (11)(12). Este provou ser um método menos exigente em termos técnicos, aonde o tecido, apesar de desvitalizado, conserva sua estrutura morfológica e pode ser utilizado tanto como um substituto de pele temporário (13), como enxertado na forma de uma matriz dérmica (14).

A escolha pela aloderme conservada em glicerol como suporte para as culturas de queratinócitos baseou-se no conceito de que a mesma seria naturalmente possuidora de características ideais para o crescimento das células com as vantagens descritas como consequentes ao método de conservação, ou seja, diminuição da antigenicidade e esterilidade (15)(16)(17).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Cultura de Queratinócitos*

Suspensões de células foram obtidas a partir de fragmentos de pele livres de tecido subcutâneo através de separação enzimática (solução de 0,05% tripsina / 0,02% ácido etilenodiaminotetra-acético - EDTA (Gibco). As células foram semeadas em alta densidade ( $5 \times 10^6$  células/  $25 \text{cm}^2$ ), sem a presença de camada alimentadora ("feeder-layer"). As culturas foram nutridas inicialmente com uma mistura de meio DMEM (60%) (Gibco), Ham F12 (30%) (Gibco), e 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), suplementados com 4 mM-glutamina (Gibco), 0,18 mM de adenina (Sigma), 0,5 g/ml insulina (Sigma), 0,4 g/ml hidrocortisona (Sigma), 0,1 nM de toxina da cólera (Sigma), 2 nM tri-iodotironina (Sigma) e solução antibiótica de 100 UI/ml penicilina e 100  $\mu\text{g/ml}$  estreptomicina (Gibco) e, a partir da primeira troca de meio, com 10 ng/ml de Fator de Crescimento Epidérmico (Sigma). As garrafas de cultura foram mantidas em incubadora de 5%  $\text{CO}_2$ , a 37° C. A sub-confluência celular das culturas primárias foi obtida normalmente em 5 dias, quando então foram realizadas culturas secundárias (60.000 cels/  $\text{cm}^2$ ) sobre fragmentos de aloderme previamente preparados.

### *Preparo da aloderme*

Enxertos de pele de espessura parcial fornecidos pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP – São Paulo foram conservados em glicerol a 98% (11). Inicialmente, o conservante foi removido e a re-hidratação dos tecidos obtida através de banho em solução salina 0.9% (Baxter) durante 20 minutos. As células epidérmicas foram removidas colocando-se os enxertos pré cortados em solução de dispase 2,5% (Boehringer-Manheim Corp.) a 37° C, durante 45 minutos, seguido de um segundo banho de 15 minutos em solução de 0,05% Tripsina / 0,02% EDTA (Gibco), também a 37°C. Os fragmentos de-epidermizados foram aderidos aos poços de cultura com sua superfície papilar voltada para cima por desidratação, e então, mantidos úmidos pela adição de meio DMEM (Gibco).

### *Sistemas de cultivo imerso e na interface ar-líquido*

Além do cultivo imerso tradicional, foi proposto o cultivo na interface-ar-líquido. Para tanto, após o cultivo na situação imersa durante 7 dias, os fragmentos dérmicos com os queratinócitos proliferando em sua superfície foram elevados sobre grade metálica. Pode-se desta forma, manter a base dérmica em contato com o meio de cultura e os queratinócitos proliferando em sua superfície, em contato com o ar. Nenhuma outra alteração foi introduzida na sistemática de cultivo.

#### *Microscopia ótica*

Fragmentos de derme/queratinócitos (n=40) foram retirados de ambos os sistemas de cultivo, i.e. imerso e na interface ar-líquido, no 4º, 7º, 10º, 14º e 21º dia após o início dos experimentos e fixados em solução de formol a 10, emblocados em parafina e cortes corados por hematoxilina-eosina. O número de queratinócitos na superfície da derme foi estabelecido através da contagem de núcleos celulares em 10 campos (x1000) dos epitélios cultivados (Microscopio Labophot - Nikon). Valores médios e medianos foram calculados e o teste t-Student aplicado para a avaliação das diferenças estatisticamente significantes em termos de proliferação celular.

#### *Microscopia eletrônica de transmissão*

Amostras para estudo em microscopia eletrônica foram obtidas de ambos os sistemas de cultivo no 21º dia após semeadura das células sobre as dermes. Após fixação em e coloração tradicionais, o tecido foi observado em microscopio eletrônico de transmissão JEOL e os registros fotográficos realizados em filme KODAK 4489 (Eastman Kodak Co.)

#### *Imunohistoquímica*

Estudos de imunohistoquímica foram realizados buscando avaliar-se a síntese dos produtos normais da diferenciação celular. Para tanto foram avaliadas expressão de citoqueratina 14 e involucrina em cortes de material emblocado em parafina. O antígeno de citoqueratina 14 foi exposto por calor sob pressão e marcado por anticorpo monoclonal anti-citoqueratina 14 1:40 (Novocastra). Os antígenos de involucrina foram expostos pela digestão enzimática com solução de tripsina porcina (Sigma) e marcados com anticorpo monoclonal para involucrina (Novocastra) na diluição de 1: 200. O tratamento com anticorpo biotilado (Complexo Strep - ABC)(Dako) e 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma) dos preparados resultou na presença de um precipitado marrom dourado intracelular denotando a presença dos antígenos em estudo. Maior contraste foi obtido com contra-coloração com hematoxilina de Harris (20segundos). Controle positivos foram realizados em cortes de pele humana de espessura parcial.

## **RESULTADOS**

A exposição dos fragmentos de pele de espessura parcial aos banhos enzimáticos, resultou na remoção completa das células epidérmicas bem como de todos os componentes

da membrana basal. Possivelmente graças as trocas do meio de cultura, as células dérmicas desvitalizadas foram removidas mecanicamente e não puderam ser observadas em preparados histológicos a partir do 7º dia de cultura.

Os queratinócitos aderiram à derme e proliferaram vindo a constituir um epitélio confluyente em cerca de 4 dias, passando então a se estratificar e diferenciar. A exposição ao ar no sistema de cultivo ar-líquido representou um forte estímulo para a multiplicação e diferenciação celular como pode ser bem observado nos cortes corados por hematoxilina-eosina no 21º dia de cultivo. Na situação de cultivo imerso, notou-se um número menor de camadas, com queratinócitos menos diferenciados; uma camada córnea verdadeira não pode ser observada, apesar da presença de algumas lamelas córneas. Já na situação de exposição ao ar, o epitélio era composto de um número significativamente maior de camadas de células, com melhor organização e diferenciação além da formação de camada córnea verdadeira.

A contagens das células tanto na situação imersa como na interface ar-líquido demonstrou um número progressivamente maior de células ao longo do tempo de estudo. Diferenças estatisticamente significativas no número de células pode ser observado entre os dois sistemas a partir do 10º dia de cultivo, com o sistema ar-líquido apresentando constantemente maior número de células.

Os estudos de microscopia eletrônica permitiram a observação de boa organização celular nos epitélios cultivados, incluindo a presença de organelas intracelulares bem formadas, membranas celulares com desmossomos, e filamentos de queratina em células mais diferenciadas. Enquanto uma camada córnea verdadeira pode ser observada nos compostos cultivados na interface ar-líquido, a membrana dos queratinócitos em contato com o meio de cultura apresentaram inúmeras microvilosidades. Melanócitos funcionantes foram identificados pela presença de melanosomos intracelulares. Nas amostras obtidas de material do dia 21º de cultivo dos queratinócitos sobre as dermes, pode ser observada a presença de membrana basal neo-formada, que apesar de incompleta, pode ser identificada através da observação de hemidesmossomos bem formados, placas sub densas e depósitos eletrodensos subjacentes, sugestivos da re-organização da lamina densa.

Os estudos de imunohistoquímica revelaram a expressão da citoqueratina 14 nas camadas basal e suprabasal dos epitélios cultivados em localização semelhante àquela observada nos controles de pele normal. A expressão de involucrina ocorreu prematuramente em todas as camadas suprabasais dos epitélios cultivados, em contraste com os controles de pele normal aonde o antígeno pode ser detectado apenas nas camadas de células mais superficiais e diferenciadas.

## DISCUSSÃO

No método de trabalho proposto, a remoção completa da membrana basal no momento da de-epidermização poderia ter representado um fator deletério para a adesão celular e proliferação (18). No entanto, as células aderiram à base dérmica, contituiram epitélios multi-estratificados. Inclusive, pode ser observada a presença de uma membrana

basal neo-formada, que mesmo incompleta sugere a possível resistência mecânica maior e mais precoce destes substitutos cutâneos. Pelas suas características, esta proposta poderia ser utilizada como modelo experimental no estudo da formação da membrana basal *in vitro* aonde a presença de outros fatores celulares, tais como fibroblastos, e humorais possam ser controlados.

As culturas foram iniciadas sem a presença de fibroblastos murinos atuando como "camada alimentadora" (3), procurando-se obter um composto dermo-epidérmico o menos antigênico possível. Alguns autores atribuíram a perda gradual de enxertos cultivados à resposta inflamatória desencadeada pela presença de fibroblastos xenógenos (19).

Diferenças marcantes na proliferação e maturação celulares puderam ser apreciados com a exposição das células ao ar. Ainda fica por ser estabelecida se a formação da camada córnea ocorreu apenas pela necessidade de uma proteção celular mais eficiente contra a desidratação, ou se a derme também teve um papel de "filtro" para o meio de cultura, selecionando os componentes que ao final atingiam as células na superfície da derme.

Certa desorganização celular nos epitélios pode ser observada em ambos os sistemas de cultivo, sem no entanto a presença de displasia celular significativa. Epitélios hiperproliferativos e desorganizados tem sido descritos em condições de alta renovação celular, tais como na psoríase ou na cicatrização, possivelmente devido à persistência de estímulos proliferativos que persistem além da oclusão das feridas. As culturas de queratinócitos podem ser consideradas como uma situação em que a dispersão celular inicial e a perda de contato intercelular são um forte estímulo para a proliferação das células epidérmicas que no entanto possuem potenciais clonogênicos diferentes e estão dispersas randomicamente na superfície da placa de cultura (20). Estes potenciais diferentes de crescimento resultam em uma irregularidade tridimensional na confluência das células e que pode refletir-se como na "desorganização" celular nos cortes histológicos. Outro fator para a presença desta desorganização celular poderia ser atribuída à ausência de componentes de membrana basal, tais como colágeno IV e laminina, creditados como sinalizadores para a organização celular dos tecidos (21).

A função e morfologia normais dos queratinócitos pode ser documentada pela microscopia eletrônica de transmissão pela presença de estruturas juncionais bem formadas, tais como desmossomos, organelas intracelulares e grânulos de queratina nas camadas mais superficiais. Como descrito (22), melanócitos perduraram como células passageiras nas culturas e prova adicional de sua função normal foi a visualização de grânulos de pigmentos em melanossomos e no citoplasma de queratinócitos adjacentes.

Hemidesmossomos bem formados, placas sub-densas e depósitos eletrodensos subjacentes são o testemunho da neo-organização da junção dermo-epidérmica. O desenvolvimento completo desta estrutura bem como a normalização da proliferação e das características de diferenciação deverão ocorrer *in vivo* com a presença de outras células e fatores de crescimento. Apesar da evidente indução à proliferação celular e diferenciação em direção à formação de uma camada córnea, a exposição dos queratinócitos ao ar não implicou em uma membrana basal melhor formada.

Os estudos de imunohistoquímica foram considerados importantes para a avaliação das características funcionais dos epitélios cultivados. Normalmente, na medida em que as células confluem, os estímulos mudam da proliferação celular para a diferenciação celular, o que se traduz na expressão, por exemplo, da citoqueratina 14 na camada basal e da involucrina nas camadas mais superficiais. Desta forma, a presença de queratinas intracelulares pode ser um indicador de que o esperado caminho para a diferenciação foi tomado pelas células. No composto dermo-epidérmico proposto, a expressão de citoqueratina 14 e involucrina ocorreu nos níveis esperados. No entanto, a expressão de citoqueratina 14 persistiu nas camadas suprabasais e a expressão de involucrina por sua vez, ocorreu prematuramente. Estas diferenças já foram descritas em situações de hiperproliferação celular, tais como psoríase ou mesmo, de cultura (23).

O transplante destes compostos dermo-epidérmicos em ratos atímicos apresentaram resultados promissores, com excelente neo-vascularização da derme, repopulação da derme por fibroblastos murinos autóctones e a sobrevivência do epitélio cultivado.

Concluindo, o composto dermo-epidérmico proposto possui características morfológicas e funcionais que incentivam seu uso como substituto cutâneo permanente, apresentando vantagens em termos de resistência mecânica graças à presença do componente dérmico e da formação já *in vitro* de elementos da junção dermo-epidérmica. A derme humana preservada em glicerol e de-celularizada demonstrou ser um suporte adequado para o crescimento *in vitro* de queratinócitos semeados diretamente sobre sua superfície.

\* Este trabalho foi desenvolvido com o fomento da FAPESP e do CNPq.

## BIBLIOGRAFIA

1. FREEMAN, A.E.; IGEL, U.J.; HERRMAN, B.J.; KLEINFELD, K.L. Growth and characterization of human skin epithelial cultures. **In vitro** 1976;12:352-62.
2. BILLINGHAM, R.E.; REYNOLDS, J. Transplantation studies on sheet of pure epidermal epithelium and of epidermal cell suspensions. **Br J Plast Surg** 1952;23:23-5.
3. RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell** 1975;6:334-44.
4. GALLICO, G.G.; O'CONNOR, N.E.; COMPTON, C.C.; KEHINDE, O.; GREEN, H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. **New Engl J Med** 1984;311:448-51.
5. KARASEK, M.A.; CHARLTON, M.E. Growth of postembryonic skin epithelial cells on collagen gels. **J Invest Dermatol** 1971;56:205-10.
6. BELL, E.; ERLICH, H.P.; SHER, S. Development and use of a living skin equivalent. **Plast Reconstr Surg** 1981;67:386-92.
7. HANSBOROUGH, J.F.; MORGAN, J.L.; GREENLEAF, G.E.; BARTEL, R. Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh - cultured fibroblast dermal

- substitute, function as a bilayer skin replacement in full-thickness wounds on athymic mice. **J Burn Care Rehab** 1993;14:485-94.
8. PRUNIÉRAS, M.; RÉGNIER, M.; SCHLOTTERER, M. Nouveau procédé de culture des cellules épidermiques humaines sur derme homologue ou hétérologue: préparation de greffons recombines. **Ann Chir Plast** 1979;24:357-62.
  9. CUONO, C.; LANGDON, R.; MCGUIRE, J. Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. **Lancet** 1986;1123-4.
  10. MEDALIE, D.A.; TOMPKINS, R.G., MORGAN, J.R. Evaluation of acellular human dermis as a dermal analog in a composite skin graft. **ASAIO J** 1996;42:M455-62.
  11. PIGOSSI, N.; RAIA, A.; LEX, A.; HABR GAMA, A.; SIMONSEN, O.; HADDAD, J.; STOLF N.A.G.; ZERBINI E.J.; MINITI, A.; TENUTO, R.. Estudo experimental e clínico sobre o emprêgo, como implante, da dura-máter homogéna conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Rev Assoc Med Bras** 1971;17:263-78.
  12. MACKIE, D.P. The Euro Skin Bank: development and application of glycerol-preserved allografts. **J Burn Care Rehab** 1997;18:7-9 Supplement 1.
  13. KREIS, R.W.; VLOEMANS, A.F.P.M.; HOEKSTRA, M.J.; MACKIE, D.P., HERMANS, R.P. The use of non-viable glycerol preserved cadaver skin combined

with widely expanded autografts in the treatment of extensive third-degree burns. **J Trauma** 1989;29:51-4.

14. MCKAY, I.; WOODWARD, B.; WOOD, K.; NAVSARIA, H.Á.; HOEKSTRA, H.; GREEN, C.. Reconstruction of human skin from glycerol-preserved allodermis and cultured keratinocyte sheets. **Burns** 1994;20:19-22 Supplement 1.
15. RICHTERS, C.D.; HOEKSTRA, M.J.; VAN BAARE, J.; DUPONT, J.S.; KAMPERDIJK, E.W.. Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin. **Burns** 1996;22:113-6.
16. VAN BAARE, J.; LIGTVOET, E.E.J.; MIDDELKOOP, E. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. **Transplantation** 1998;65:966-70.
17. RICHTERS, C.D.; HOEKSTRA, M.J.; VAN BAARE, J.; DUPONT, J.S.; KAMPERDIJK, E.W. Immunogenicity of glycerol-preserved human cadaver skin in vitro. **J Burn Care Rehab** 1997;18:228-33.
18. DAWSON, R.A.; GOBERDHAN, N.J.; FREEDLANDER, E.; MACNEIL, S. Influence of extracellular matrix proteins on human keratinocyte attachment, proliferation and transfer to a dermal wound model. **Burns** 1996;22:99-100.

19. CAIRNS, B.A.; DESERRES, S.; BRADY, L.A.; HULTMAN, C.S.; MEYER, A.A.  
Xenogeneic mouse fibroblasts persist in human cultured epidermal grafts: a possible mechanism of graft loss. **J Trauma** 1995;39:75-9.
20. STAIANO-COICO, L.; HIGGINS, P.J.; DARZYNKIEWICZ, Z.; KIMMEL, M.;  
GOTTLIEB, A.B.; PAGAN-CHARRY, I.; MADDEN, M.R.; FINKELSTEIN, J.L.;  
HEFTON, J.M. Human keratinocyte culture – identification and staging of epidermal cell subpopulations. **J Clin Invest** 1986;77:396-404.
21. WOODLEY, D.T. Importance of the dermal-epidermal junction and recent advances. **Dermatologica** 1987;174:1-10.
22. DE LUCA, M.; FRANZI, A.T.; D'ANNA, F.; ZILLA, A.; ALBANESE, E.;  
BONDANZA, S.; CANCEDDA, R. Co-culture of human keratinocytes and melanocytes: differentiated melanocytes are physiologically organized in the basal layer of the cultured epithelium. **Eur J Cell Biol** 1988;46:176-80.
23. BANKS-SCHLEGEL, S.; GREEN, H. Ivolucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. **J Cell Biol**, 1981;90:732-7.