



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO  
CARRERA DE BIOMEDICINA**

**TEMA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO CELULAR DE  
QUERATINOCITOS IN VITRO PARA LOS LABORATORIOS DE CIENCIAS DE  
LA VIDA DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIERA EN BIOMEDICINA**

**AUTOR: ARIANA MERCEDES CEDEÑO LASSO**

**TUTOR: NORMA SUSANA TORRES MIRANDA**

**Quito-Ecuador**

**2024**

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Yo, Ariana Mercedes Cedeño Lasso con documento de identificación N° 0803186618 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 6 de agosto del año 2024

Atentamente,



---

Arriana Mercedes Cedeño Lasso

0803186618

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Ariana Mercedes Cedeño Lasso con documento de identificación No. 0803186618, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Desarrollo de un protocolo de cultivo celular de queratinocitos in vitro para los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biomedicina, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 6 de agosto del año 2024.

Atentamente,

A photograph of a handwritten signature in blue ink on a light-colored surface. The signature is stylized and appears to read 'Ariana Mercedes Cedeño Lasso'.

-----  
Ariana Mercedes Cedeño Lasso

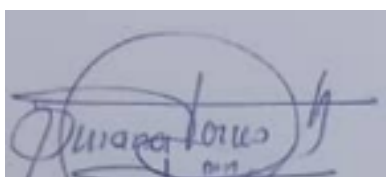
0803186618

## **CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Norma Susana Torres Miranda con documento de identificación N°. 1720075769, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO CELULAR DE QUERATINOCITOS IN VITRO PARA LOS LABORATORIOS DE CIENCIAS DE LA VIDA DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**, realizado por Ariana Mercedes Cedeño Lasso con documento de identificación N°. 0803186618, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 6 de agosto del año 2024

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Norma Susana Torres Miranda', enclosed within a circular stamp or seal.

---

Norma Susana Torres Miranda

1720075769

# Lema

Y la medicina, el derecho, los negocios, la ingeniería, son actividades nobles y necesarias para sustentar la vida. Pero la poesía, la belleza, el romance, el amor: esto es por lo que nos mantenemos vivos. Carpe Diem.

El club de los poetas muertos.

# Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis padres, Julie Milena Lasso Daza y José Luis Cedeño Delgado por todo el amor y apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, en especial con la carrera, ya que reconozco el esfuerzo que han hecho para mandarme a estudiar a otra ciudad y la confianza que han tenido en mí.

A mi abuelita, María Inés Delgado Reasco por formar parte de mi vida con su comida que alegraban incluso mis malos días, al igual que sus consejos. Y a mi abuelito, José Absalón Cedeño Mielles, que aunque haya fallecido hace nueve años aún lo llevo en mis recuerdos y mi corazón porque fue esa persona que me protegía y me mimaba, quien me puso mi apodo en la familia desde mi nacimiento y me cargó hasta sus últimos días, sin importar su edad o mi peso; se que esto jamás compensará esa despedida que nunca tuvimos, pero espero estés orgulloso de mi allá en el cielo.

---

# Resumen

A nivel internacional, existen guías estandarizadas para cultivos celulares, pero en Ecuador no se dispone de un protocolo adaptado a los recursos disponibles en el país. Reconociendo la importancia del cultivo celular en el desarrollo biomédico para el tratamiento de diversas patologías de la piel, los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Quito, han tomado la iniciativa de elaborar un protocolo de cultivo celular de queratinocitos *in vitro*. Este protocolo emplea la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT), evitando así infringir los códigos bioéticos, como el Código de Helsinki. Las líneas celulares HaCaT presentan una gran variedad de características fenotípicas, lo que las hace especialmente adecuadas para este tipo de cultivos. La implementación de este protocolo ha resultado en una alta proliferación de queratinocitos, demostrando su eficacia y obteniendo una resolución positiva.

**Palabras clave:** Cultivo *in vitro*, queratinocitos, línea celular HaCaT.

---

# Abstract

Internationally, there are standardized guidelines for cell culture, but in Ecuador there is no protocol adapted to the resources available in the country. Recognizing the importance of cell culture in biomedical development for the treatment of various skin pathologies, the life sciences laboratories of the Universidad Politécnica Salesiana, Quito, have taken the initiative to develop a protocol for in vitro keratinocyte cell culture. This protocol uses the immortalized human keratinocyte cell line (HaCaT), thus avoiding infringing bioethical codes, such as the Helsinki Code. HaCaT cell lines have a wide variety of phenotypic characteristics, making them particularly suitable for this type of culture. The implementation of this protocol has resulted in a high proliferation of keratinocytes, demonstrating its efficacy and obtaining a positive resolution.

**Keywords:** In vitro culture, keratinocytes, HaCaT cell line.



# Contenido

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Agradecimientos</b>  | <b>vii</b>  |
| <b>Resumen</b>  | <b>viii</b> |
| <b>1. Introducción</b>  | <b>2</b>    |
| 1.1. Antecedentes . . . . .   | 3           |
| 1.2. Descripción del problema . . . . .   | 3           |
| 1.3. Importancia y alcances . . . . .   | 4           |
| 1.4. Objetivos . . . . .  | 4           |
| 1.4.1. Objetivo General . . . . .   | 4           |
| 1.4.2. Objetivos Específicos . . . . .  | 4           |
| <b>2. Marco teórico</b>   | <b>6</b>    |
| 2.1. La piel y su estructura . . . . .  | 6           |
| 2.1.1. La epidermis: capas y células . . . . .  | 6           |
| 2.1.2. Dermis . . . . .   | 7           |
| 2.1.3. Hipodermis . . . . .   | 8           |
| 2.2. Queratinocitos . . . . .   | 8           |
| 2.2.1. Tipos de queratinocitos . . . . .  | 8           |
| 2.2.2. Importancia del estudio de los queratinocitos in vitro . . . . .               | 9           |
| 2.2.3. Aplicaciones de los cultivos de queratinocitos in vitro . . . . .              | 9           |
| 2.3. Métodos de aislamiento de queratinocitos . . . . .                               | 10          |
| 2.3.1. Biopsias de piel . . . . .   | 10          |
| 2.3.2. Obtención de células de la mucosa oral . . . . .                               | 11          |
| 2.3.3. Cultivo de células desprendidas . . . . .                                      | 12          |
| 2.4. Medios de cultivo para queratinocitos . . . . .                                  | 13          |
| 2.4.1. Composición básica de los medios de cultivo . . . . .                          | 13          |
| 2.4.2. Medios con factores de crecimiento y hormonas para queratinocitos . . . . .    | 14          |
| 2.4.3. Medios con suplementos adicionales para el cultivo de queratinocitos . . . . . | 14          |
| 2.5. Condiciones de cultivo para queratinocitos . . . . .                             | 15          |
| 2.5.1. Temperatura, pH y osmolaridad . . . . .  | 15          |
| 2.5.2. Humedad y concentración de dióxido de carbono . . . . .                        | 16          |
| 2.5.3. Adhesión celular y tipo de soporte . . . . .                                   | 16          |
| 2.6. Crecimiento y proliferación de queratinocitos in vitro . . . . .                 | 17          |
| 2.6.1. Cinética de crecimiento y ciclo celular . . . . .                              | 17          |
| 2.6.2. Métodos para evaluar la viabilidad celular . . . . .                           | 19          |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6.3. Factores que afectan el crecimiento de los queratinocitos . . . . .             | 19        |
| 2.7. Diferenciación de queratinocitos in vitro . . . . .                               | 20        |
| 2.7.1. Modelos de diferenciación en cultivo . . . . .                                  | 20        |
| 2.7.2. Factores de la diferenciación de queratinocitos . . . . .                       | 21        |
| 2.8. Aplicaciones de los cultivos de queratinocitos in vitro . . . . .                 | 22        |
| 2.8.1. Estudios de toxicidad y citotoxicidad . . . . .                                 | 23        |
| 2.8.2. Ensayos de irritación y sensibilidad dérmica . . . . .                          | 23        |
| 2.8.3. Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa . . . . .                         | 24        |
| 2.8.4. Modelos de enfermedades de la piel . . . . .                                    | 25        |
| <b>3. Marco metodológico</b>   | <b>27</b> |
| 3.1. Equipos e insumos . . . . .   | 27        |
| 3.1.1. Equipos . . . . .   | 27        |
| 3.1.2. Reactivos . . . . .   | 27        |
| 3.1.3. Materiales . . . . .  | 28        |
| 3.2. Metodología de la Investigación . . . . .   | 29        |
| 3.3. Metodología del proceso . . . . .   | 29        |
| <b>4. Desarrollo del protocolo de cultivo celular de queratinocitos in vitro</b>       | <b>30</b> |
| 4.1. Normas de bioseguridad . . . . .  | 30        |
| 4.1.1. Desinfección al área de trabajo . . . . .                                       | 31        |
| 4.1.2. Prevención de Contaminación . . . . .   | 31        |
| 4.2. Activación de células . . . . .   | 31        |
| 4.3. Tripsinización de queratinocitos in vitro . . . . .                               | 32        |
| 4.4. Mantenimiento del Cultivo . . . . .   | 33        |
| 4.5. Análisis de resultados . . . . .  | 34        |
| <b>5. Conclusiones y recomendaciones</b>   | <b>38</b> |
| 5.1. Conclusiones . . . . .  | 38        |
| 5.2. Recomendaciones . . . . .   | 38        |
| <b>A. Anexo: Guía de lavado de manos quirúrgico</b>                                    | <b>39</b> |
| <b>B. Anexo: Limpieza del interior de la cabina de flujo laminar</b>                   | <b>40</b> |
| <b>C. Anexo: Ingreso de los insumos a la cabina de flujo laminar</b>                   | <b>41</b> |
| <b>D. Anexo: Activar cámara de rayos UV</b>  | <b>42</b> |
| <b>E. Anexo: Preparar medio suplementado en un tubo Falcon de 50 ml</b>                | <b>43</b> |
| <b>F. Anexo: Pasar el medio suplementado con las células a un tubo Falcon de 15 ml</b> | <b>44</b> |
| <b>G. Anexo: Centrifugar la muestra del tubo Falcon de 15 ml</b>                       | <b>45</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>H. Anexo: Guardar el nuevo medio del matraz T25 en la incubadora</b> | <b>46</b> |
| <b>Bibliografía</b>   | <b>47</b> |

# 1. Introducción

Los primeros estudios de cultivo celular in vitro empezaron en 1975, por Rheinwald y Green, ellos desarrollaron el cultivo de células madre, las cuales dieron origen a una colonia de queratinocitos in vitro, esto abrió las puertas a nuevas investigaciones y desarrollos en el campo de Ingeniería de Tejidos (E. S. Khan et al., 2020; Larouche et al., 2009). En 1981, la medicina decide usar autoinjertos de piel cultivados para tratar a los pacientes que habían sufrido quemaduras graves (E. S. Khan et al., 2020).

En la actualidad se cuenta con tecnología avanzada, la cual permite mejorar y crear nuevas técnicas para producir cultivos celulares in vitro con resultados certeros y métodos más eficaces, además se han realizado investigaciones cuyo propósito es el desarrollo de modelos 2D y 3D del cultivo celular de tejido epitelial para investigar enfermedades inflamatorias, testear productos dermato-cosméticos y evitar el uso de pruebas en animales (Nuñez, 2014; Sánchez, 2008; Strüver et al., 2017). De forma internacional se realizan más estudios y revisiones a los procesos de cultivo celular in vitro, en ciertas situaciones no se alcanza a cumplir los requisitos para controlar el ambiente, lo que produce que el cultivo no pueda desarrollarse de forma adecuada y esto provoca el descarte del mismo (Poumay & Coquette, 2007).

La piel cumple la función de una barrera para proteger a los órganos internos, a su vez se encarga preservar el agua en el cuerpo (Phua et al., 2023). La piel está compuesta por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (Larouche et al., 2009), dentro de la epidermis se encuentran los queratinocitos, estos ayudan a formar queratina y preservar la homeostasis (Phua et al., 2023; Xu et al., 2022).

El estudio que se realizó fue experimental y se empleó la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) para proliferarlos in vitro. Siguiendo las normas bioéticas, no fue necesario solicitar una aprobación para el uso de estas células, ya que no se trabajó con animales o piel cadavérica, a pesar de que esta última si puede ser utilizada para desarrollar cultivos de piel. La organización del presente documento se divide en las siguientes secciones:

**Capítulo 2 - Marco teórico:** revisión de los aspectos más importantes de los cultivos de tejidos celulares in vitro.

**Capítulo 3 - Marco metodológico:** detalle de los equipos e insumos necesarios para la metodología empleada en el protocolo de cultivo de queratinocitos in vitro.

**Capítulo 4 - Desarrollo e implementación del protocolo:** acorde a lo revisado y

propuesto en los capítulos 2 y 3 se especifica el formato de protocolo usado, el desarrollo del mismo y los resultados obtenidos para evaluarlo.

**Capítulo 5 - Conclusiones y recomendaciones:** se analiza la realización del protocolo y su implementación, en base a lo presentado en capítulos anteriores.

### 1.1. Antecedentes

En la actualidad la Universidad Politécnica Salesiana cuenta con un amplio recorrido en el área de ingeniería y tecnología; mientras que, el área de ciencias de la salud es reciente, es importante implementar protocolos estandarizados para el cultivo celular de tejidos humanos para procedimientos en los laboratorios de ciencias de la vida y desarrollar investigaciones que contribuyan a la academia.

Existe la necesidad de un protocolo estandarizado, ya que sin este se restringe la reproducibilidad de estudios e investigaciones científicas en el campo de Ingeniería de Tejidos. Se estima que la creación de un protocolo estandarizado de cultivo celular de queratinocitos *in vitro* asegurará que se cumpla con las condiciones de un cultivo *in vitro* homogéneo, controlado y que disminuirá el riesgo de contaminación cruzada, con el fin de salvaguardar la estructura de los tejidos creados.

### 1.2. Descripción del problema

La Universidad Politécnica Salesiana cuenta con la carrera de Ingeniería Biomédica, la cual es una rama de la Ingeniería de Tejidos, esta última se enfoca en el desarrollo de células animales y humanas, ya que son fundamentales para diversos ensayos en la investigación biomédica y preclínica (Fabres, 2010). Además, el rápido crecimiento en áreas como la génica, la genómica y la proteómica ha dado lugar a un aumento notable en las actividades de cultivo celular.

Dentro de los tratamientos que oferta la Ingeniería de Tejidos se encuentra la repitelización de quemaduras y úlceras de piel, con esta propuesta investigación científica se espera implementar ayudas para los pacientes que presentes estas condiciones (Fabres, 2010).

El desarrollo de protocolos de cultivo celular es crucial para los avances en la investigación y aplicaciones de ingeniería biomédica. Sin embargo, el establecimiento de protocolos de cultivo celular estandarizados y reproducibles sigue siendo un desafío significativo debido a la compleja interacción de factores que influyen en la viabilidad, el crecimiento y la funcionalidad de las células. Estos factores incluyen el tipo de célula, la composición del medio de cultivo, las condiciones ambientales y las manipulaciones experimentales.

## **1.3. Importancia y alcances**

El proyecto propuesto en este documento se centra en elaborar un protocolo para cultivar queratinocitos in vitro en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Quito - Campus El Girón, siendo el inicio de nuevas expectativas de creación o duplicación celular. La elaboración de este trabajo de titulación se encuentra en la línea de investigación de tecnologías y dispositivos médicos, que está presente en la normativa institucional vigente.

La ingeniería de tejidos ofrece soluciones innovadoras para tratar lesiones y enfermedades que afecte a ciertos órganos, ya sea mediante la combinación de células para crear sustitutos funcionales que puedan integrarse de manera eficaz con el tejido biológico, generando nuevas posibilidades en tratamientos y minimizando riesgos.

Siendo relevante para que se inicie con el cultivo celular para posterior creación de tejidos como la piel para pacientes que lo requieran y sobre todo ayuden con la innovación de creación celular in vitro.

Para la creación de este protocolo se procedió a realizar una revisión bibliográfica, también se investigó los equipos, reactivos y materiales que se deben utilizar para llevar a cabo este proyecto, además se implementó este protocolo para su respectiva evaluación y validar su eficiencia. Se espera que esta normativa sirva como guía para futuras investigaciones.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo General**

Diseñar un protocolo estandarizado para cultivar queratinocitos in vitro en los laboratorios de ciencia de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Identificar mediante una revisión bibliográfica las propiedades que deben cumplir los queratinocitos creados in vitro.
- Determinar los equipos y materiales requeridos para la realización del cultivo de queratinocitos in vitro.

## 1.4 Objetivos

---

- Evaluar el protocolo de cultivo de queratinocitos in vitro con las recomendaciones sobre las condiciones y actividades que deben efectuarse para evitar una contaminación celular.

## 2. Marco teórico

### 2.1. La piel y su estructura

La piel se caracteriza por desempeñar un papel de barrera protectora del cuerpo, frente a agentes químicos, biológicos y físicos; esto se debe a la matriz de lípidos intercelulares y corneocitos con la que cuenta, ya que esta impide el acceso de sustancias externas; mientras que, las glándulas sebáceas y sudoríparas se encargan de lubricar y regular la temperatura corporal (Ita, 2020). Además, la piel es el órgano más grande del cuerpo, con un aproximado de  $2\text{m}^2$  y equivale a un 15 % del peso corporal (Lai-Cheong & McGrath, 2009).

Dentro de su estructura la piel está conformada por tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Gilaberte et al., 2016), pero en otras literaturas llaman a la tercera capa subdermis o grasa subcutánea (Dehdashtian et al., 2018; Lai-Cheong & McGrath, 2009).

#### 2.1.1. La epidermis: capas y células

- **Epidermis:** es la capa externa de la piel, conformada por un epitelio escamoso estratificado que está constituido por queratinocitos, los cuales forman parte del 95 % de las células de la piel; mientras que, las células dendríticas, como los melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel figuran el 5 % restantes (Gilaberte et al., 2016; Lai-Cheong & McGrath, 2009). La relación entre las células de melanocitos y queratinocitos, es que el primero elabora pigmentos que transportan melanina del citoplasma a los queratinocitos, de esta manera la piel se protege de los rayos ultravioleta UVR (Dehdashtian et al., 2018). Esta se puede dividir en cuatro capas según la condición de diferenciación en la que se encuentren los queratinocitos (Lai-Cheong & McGrath, 2009), estas son:

1. **Capa basal o estrato germinativo:** Presenta queratinocitos con apariencia de columnas unidos a la membrana basal, se caracterizan por tener células de núcleos ovals pigmentados de color oscuro por los melanocitos (Gilaberte et al., 2016).
2. **Capa de células escamosas o estrato espinoso:** Esta compuesta por cinco a seis células que tienen diferentes formas, estructura y características subcelulares que varían respecto a su ubicación, las propiedades con las que



cumplen estas células son más grandes y cuentan con gránulos laminares en el citoplasma (Gilaberte et al., 2016).

3. **La capa granular o estrato granuloso:** Es una capa superficial que contiene células vivas, especialmente células aplanadas que tienen una gran cantidad de gránulos de queratohialina, los cuales se caracterizan por su tamaño y forma basófilos e irregulares; esto se produce por la síntesis de la proteína filagrina, que tiene histidina, esta última se agrupa con las queratinas 1 y 10, además de otras proteínas de filamentos intermedios que se encuentran en el citoesqueleto de los queratinocitos para dar origen a haces apretados (Gilaberte et al., 2016).
4. **Capa córnea o estrato córneo:** Esta conformada por corneocitos, estos son células muertas unificadas por corneodesmosomas, también los cubre una envoltura corneiforme que cuenta con proteínas y lípidos, debido a esto es fundamental para la barrera de la piel; las características de los corneocitos se pueden identificar de acuerdo a las células donde se desarrollen, estas pueden ser las superiores o las supragranulares, las cuales ayudan en el proceso de descamación de la piel (Gilaberte et al., 2016).

La matriz extracelular de la epidermis (ECM) esta compuesta por una membrana basal en forma de lámina que separa la dermis y epidermis sus funciones se basan en la adhesión y el soporte celular, la comunicación intercelular, la regulación y la diferenciación celular y procesos relacionados en condiciones normales y patológicas; su principal función es controlar el destino de las células madre de la epidermis esto tiene un rol crucial en la regulación de proliferación para mantener la homeostasis de la epidermis protegiendo contra el agotamiento y estímulos nocivos (Chermnykh et al., 2018).

La comunicación entre células y la ECM mantiene a las células madre en estado indiferenciado o las dirige hacia la diferenciación. Se han identificado tres nichos en la piel: la capa basal de la epidermis interfolicular, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas (Chermnykh et al., 2018).

### 2.1.2. Dermis

Es la segunda capa de la piel, considerada como intermedia, tiene un espesor de 0.55 mm, pero puede variar según la zona del cuerpo, ya que esta compuesta por colágeno, tejido conectivo amorfo, apéndices epidérmicos, fibroblastos, macrófagos y mastocitos (Gilaberte et al., 2016; Lai-Cheong & McGrath, 2009). Se divide en dos capas, según con lo que este en contacto (Lai-Cheong & McGrath, 2009):

1. **Dermis papilar:** Se une con la ZMO, es irrigada por vasos sanguíneos y terminaciones de nervios sensoriales (Lai-Cheong & McGrath, 2009).

2. **Dermis reticular:** La parte principal de la dermis hace una conexión con el subcutis (Lai-Cheong & McGrath, 2009).

### 2.1.3. Hipodermis

Es un órgano endocrino que está formado por adipocitos, los cuales están divididos por tabiques fibrosos, a esta capa también se la conoce como tejido subcutáneo (Gilaberte et al., 2016).

## 2.2. Queratinocitos

Los queratinocitos son células que se encuentran en la capa basal y forman parte del 90 % de las células epidérmicas, por lo que son considerados como un factor principal para formar la epidermis; el desarrollo de estas células empieza en la capa basal y luego viajan a la superficie donde se desprenderán, a su vez pasan por diferentes procesos de diferenciación, los cuales dan origen a las capas del estrato basal, espinoso, granuloso y córneo (Das et al., 2022; Xu et al., 2022). También se ocupan de producir una barrera protectora para el organismo, intervienen en el desarrollo de queratina y el sistema inmune de la piel (Larouche et al., 2009; Phua et al., 2023).

La función principal de los queratinocitos es defender al organismo de agentes externos y contribuir en la acción inmunológica que realiza la piel (Das et al., 2022). Además de que participan en la función de la barrera, en la función sensorial, la intercomunicación con las neuronas sensitivas y la conservación de la homeostasis de la piel (Xu et al., 2022).

### 2.2.1. Tipos de queratinocitos

Los queratinocitos se clasifican según su localización, estas son:

- **Queratinocitos del epitelio corneal**
  - **Células madre del epitelio corneal:** Están ubicadas en la capa basal en la zona limbal del ojo (Miller et al., 1997).
  - **Queratinocitos diferenciados:** Tiene queratina K3 en estructura, lo que funciona como un marcador de diferenciación avanzada (Miller et al., 1997).
- **Queratinocitos de la epidermis**
  - **Células madre epidérmicas:** Se presentan al final de las crestas de los rete en la palma y tronco de cuerpo humano (Miller et al., 1997).

- **Células no dentadas (nsc):** Se encuentran en la piel de la palma y el tronco del cuerpo humano, se caracterizan por su morfología (Miller et al., 1997).
  - **Células amplificadoras transitoras (TA):** Se estima que son activas en el aspecto mitótico y tiene un subtipo de células terminalmente diferenciadas (TD) (Miller et al., 1997).
  - **Células basal serradas (SO):** Son consideradas parte del entorno de las células madre epidérmicas (Miller et al., 1997).
- **Queratinocitos del folículo piloso**
- **Células madre del folículo piloso:** Se encuentran en la protuberancia de la vaina externa de la raíz del folículo piloso (Miller et al., 1997).
  - **Células de la matriz del bulbo:** Se estima que son células progenitoras que tienen ciclos rápidos, lo que las convierte en pluripotentes y con altos pigmentos (Miller et al., 1997).

### 2.2.2. Importancia del estudio de los queratinocitos in vitro

El estudio de los queratinocitos in vitro es importante, ya que permite llevar a cabo un modelado de la piel y enfermedades dermatológicas, las cuales permiten comprender la fisiología de la piel y las patologías cutáneas; se realizan investigaciones para desarrollar mecanismos de detección sensorial y tratamientos para el dolor; a su vez se verifican productos y tratamientos dermatológicos mediante evaluaciones de seguridad en modelos in vitro como alternativa de las pruebas en animales (Xu et al., 2022).

También se utilizan para entender el funcionamiento de la barrera cutánea, investigar las interacciones celulares, como el microambiente y los nichos de células madre, además de analizar el impacto de los factores ambientales y genéticos (Das et al., 2022; Miller et al., 1997).

### 2.2.3. Aplicaciones de los cultivos de queratinocitos in vitro

El cultivo in vitro de queratinocitos permite desarrollar modelos 2D y 3D de la epidermis, de esta manera se producen tejidos artificiales que pueden ser utilizados en terapias celulares para regenerar o reparar los tejidos dañados (Miller et al., 1997). Es decir que, pueden utilizarse para tratar lesiones (quemaduras) y patologías como: psoriasis, epidermólisis bullosa, melanomas (Dehdashtian et al., 2018; Ferran et al., 2008; González et al., 2016; Lorenzini et al., 2014).

Adicionalmente se cultivan queratinocitos in vitro para crear y estudiar modelos de cicatrización de heridas, las interacciones entre las células y la matriz extracelular, la

proliferación y migración celular (Fujisaki et al., 2019).

Asimismo se puede emplear los cultivos de queratinocitos in vitro para analizar la diferenciación de células madres en las células epidérmicas, estudiar los procesos inflamatorios, desarrollar cosméticos y evaluar los agentes antimicrobianos (El-Serafi et al., 2022).

## **2.3. Métodos de aislamiento de queratinocitos**

El aislamiento de cultivo in vitro de queratinocitos es en esencia un estudio experimental que presenta desafíos por problemas en su baja tasa de división celular (Ścieżyńska et al., 2019). Este busca minimizar el daño en las células epidérmicas así como, su contaminación mediante el desarrollo de diversos estudios para aislar los queratinocitos (Ścieżyńska et al., 2019).

Uno de los métodos más conocidos es el tratamiento enzimático para separar la epidermis de la dermis en el que se usa tripsina solo o en combinación con proteasas neutras (dispasa o termocidina) que tiene dos pasos, otro de los métodos es la técnica de explantes de piel que evita la digestión enzimática preliminar y permite la generación rápida y simple de cultivos viables a partir de pequeñas muestras de piel (Ścieżyńska et al., 2019).

Se han desarrollado técnicas avanzadas para enriquecer células progenitoras de queratinocitos como la agitación magnética, centrifugación en gradiente de densidad y clasificación celular basada en la gravedad o con anticuerpos específicos, el desarrollo de estas técnicas aumentan el rendimiento de queratinocitos y mejoran la proporción de células dando una alta eficiencia en la formación de colonias (Ścieżyńska et al., 2019).

### **2.3.1. Biopsias de piel**

Cuando se desea realizar un análisis de laboratorio a una muestra de tejido del cuerpo se debe realizar un procedimiento médico, este se llama biopsia, tiene como finalidad diagnosticar varias enfermedades, incluyendo cáncer, infecciones y trastornos inflamatorios (George et al., 2021).

Existen diferentes técnicas de biopsias, la más común es por incisión, en la cual se extrae una porción de tejido con el uso de un bisturí; otra forma puede ser la biopsia por punción, donde se emplea una jeringa para obtener una muestra del tejido y por último, la biopsia con sacabocados, esta consiste en usar un punch para extraer una muestra cilíndrica de tejido (George et al., 2021). Después de obtener la muestra se debe colocar en un conservante adecuado, para esto existen varios métodos, como el

aislamiento enzimático, este se enfoca en el uso de tripsina, dipasa o colagenasa para disgregar la epidermis y desprender los queratinocitos; mientras que en el cultivo enzimático, se realiza una digestión de la piel utilizando estas enzimas con el fin de mantener la viabilidad de los queratinocitos, permitiendo su uso en cultivos posteriores; por otro lado, el método de raspado mecánico consiste en raspar la epidermis de manera mecánica para recolectar queratinocitos; aunque es un proceso rápido, puede reducir la viabilidad celular. En cuanto a los métodos basados en láser y microdissección, la microdissección por láser destaca por su alta precisión, lo que permite separar los queratinocitos de las secciones del tejido con gran exactitud (Cuadra et al., 2023).

Las condiciones de asepsia para la biopsia por incisión o por sacabocados, incluyen la preparación antiséptica de la piel del paciente, el uso de guantes y equipos estériles, y la creación de un ambiente controlado para minimizar la contaminación (S. Khan et al., 2021). Es esencial reconocer la diferencia entre las técnicas limpias y asépticas:

- **Técnicas limpias:** es utilizada para biopsias por punción y afeitado (S. Khan et al., 2021).
- **Técnica aséptica:** se emplea en procedimientos más complejos como excisiones y reparaciones de Mohs (S. Khan et al., 2021). Esta implica:
  - Un contacto exclusivamente estéril (S. Khan et al., 2021).
  - Un control estricto del entorno, como cerrar puertas durante los procedimientos y minimizar el tráfico (S. Khan et al., 2021).

La implementación cuidadosa de estas medidas reduce significativamente el riesgo de infecciones (S. Khan et al., 2021).

Las condiciones de asepsia para la biopsia líquida, en el caso de la biopsia por punción, incluye la recolección de tejido o líquido mediante venopunción utilizando un sistema de vacío estéril; es clave invertir suavemente las muestras varias veces y centrifugarlas inmediatamente o después de un almacenamiento controlado a temperatura ambiente o a 4°C.

Además, se debe añadir una solución tamponada neutra con formaldehído al 10% para estabilizar las membranas celulares y reducir la lisis celular en los tubos EDTA antes de la centrifugación, el almacenamiento y la centrifugación se deben llevar a cabo en condiciones estériles para prevenir la contaminación, cumplir con los tiempos y temperaturas recomendados para mantener la integridad del ADN (Gerber et al., 2020).

### 2.3.2. Obtención de células de la mucosa oral

La obtención de la toma de muestra de mucosa oral, se lleva a cabo de manera esteril para prevenir una contaminación, luego se la coloca en una solución fría de Hanks'

Balanced Salt Solution (HBSS) con antibióticos y antimicóticos para conservar la viabilidad celular para poder transportarla hasta el laboratorio, en el cual se encargarán de quitar el excedente de tejido conectivo y grasa subyacente con unas pizas y bisturí; después se pone en una solución dipasa a 4°C en la noche para agilizar la división del epitelio de la lámina propia (Aasen & Belmonte, 2010).

Por último, se corta en pequeños pedazos el epitelio, los cuales serán incubados con TrypLE Select a 37 °C para desprender a los queratinocitos, estas células se esparcen en placas de cultivo cubiertas con matriz de colágeno, un medio sin suero y una baja concentración de calcio, con la finalidad de que no se de una diferenciación prematura; es un procedimiento que da como resultado una población de queratinocitos en gran medida proliferativos, lo que los hace muy utilizados en estudios de biología celular y aplicaciones clínicas (Aasen & Belmonte, 2010).

### 2.3.3. Cultivo de células desprendidas

El cultivo de células desprendidas es una técnica que permite conseguir una gran cantidad de células homogéneas, para usar en diversas aplicaciones, estas pueden ser: regeneración de tejidos, producción de anticuerpos, desarrollo de terapias celulares, investigación farmacológica y toxicológica (Tauchi et al., 2019).

El proceso que se debe seguir para cultivar células desprendidas, como los queratinocitos se describe a continuación:

- **Aislamiento de queratinocitos:** Se aíslan los queratinocitos de las muestras de piel (biopsias) o cabello arrancado, en el primer caso se debe retirar la epidermis para procesarla y aplicar enzimas (dipasa o tripsina) y poder liberar estas células (Aasen & Belmonte, 2010).
- **Métodos de cultivo:** Existen dos métodos, estos son:
  - **Método dependiente de alimentadores:** Emplea células alimentadoras irradiadas y medio de cultivo que contenga suero, con la finalidad de impulsar un rápido crecimiento y alta resistencia a la apoptosis (Aasen & Belmonte, 2010).
  - **Método libre de suero y alimentadores:** Usa un medio bajo en calcio para impedir la contaminación por otras células, sin la necesidad de utilizar células alimentadoras (Aasen & Belmonte, 2010).
- **Cultivo Inicial:** Se ocupan placas de cultivo tratadas con una matriz de recubrimiento, como colágeno tipo I para maximizar el rendimiento de los queratinocitos, esto se debe cambiar cada 2 a 3 días, ya que de esta manera se conserva un ambiente ideal para el crecimiento de las células (Aasen & Belmonte, 2010).

- **Mantenimiento y pasaje de células:** Se espera hasta que la concurrencia de las células este en un 70 % a 75 % para disociarlas con tripsina y moverlas a nuevas placas de cultivo cada dos semanas, de esta manera se evita la diferenciación y senescencia de los queratinocitos (Aasen & Belmonte, 2010).

## 2.4. Medios de cultivo para queratinocitos

Los medios de cultivos para los queratinocitos son soluciones nutritivas, las cuales favorecen al crecimiento y proliferación de estas células en un ambiente in vitro, ya que cuentan con nutrientes esenciales, factores de crecimiento y hormonas que simulan las condiciones fisiológicas del cuerpo humano para conservar la viabilidad celular y producir colonias (Takagi et al., 2011).

Los medios más utilizados para el cultivo de queratinocitos in vitro son: DMEM, medio con suero, medio sin suero (VN), medio basal con suero, medios libres de suero y sin alimentadores, MCDB 153, Surge y SFM Light (Batista, 2011; Ghio et al., 2023; Lamb & Ambler, 2013; Richards et al., 2008; Seo et al., 2016).

### 2.4.1. Composición básica de los medios de cultivo

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) :** Este medio contiene 10 % FBS (suero bovino fetal) y 1 % solución antibiótica/antimicótica (Seo et al., 2016).
- **Medio con suero:** Es un medio DMEM o HAMS (Invitrogen), que contiene 0.4 mg/mL de hidrocortisona, 10  $\mu\text{g/mL}$  de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 0.1 nM de toxina colérica,  $1.8 \times 10^{-4}$  M de adenina,  $2 \times 10^{-7}$  M de triyodotironina-L, 5  $\mu\text{g/mL}$  de insulina, 5  $\mu\text{g/mL}$  de transferrina, 2 mM de glutamina, 1000 IU/mL de penicilina/1000  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomocina y 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Richards et al., 2008).
- **Medio sin suero (VN):** Compuesto por medio DMEM, 0.4 mg/mL de hidrocortisona, 10  $\mu\text{g/mL}$  de factor de crecimiento epidérmico (EGF), 0.1 nM de toxina colérica,  $1.8 \times 10^{-4}$  M de adenina,  $2 \times 10^{-7}$  M de triyodotironina-L, 5  $\mu\text{g/mL}$  de insulina, 5  $\mu\text{g/mL}$  de transferrina, 2 mM de glutamina, 1000 IU/mL de penicilina/1000  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomocina, incluye la combinación VN:GF (Vitronectina (VN) a 10 ng/mL, IGF-I a 50 ng/mL y IGFBP-3 a 250 ng/mL) (Richards et al., 2008).
- **Medio basal con suero:** Esta conformado por suero y suplementado con factores de crecimiento (Lamb & Ambler, 2013).
- **Medios libres de suero y sin alimentadores:** Es un medio que han sido creado en la última década con la finalidad de impedir que agentes potencialmente dañinos como la encefalopatía espongiiforme bovina y algunos virus de ratón; este

medio al estar libre de suero y de alimentadores, posibilitan la propagación y expansión de queratinocitos humanos (Lamb & Ambler, 2013).

- **MCDB 153:** Es un medio conformado por 153 a 1 g/L de glucosa, insulina, transferrina, hidrocortisona y selenio (Batista, 2011).
- **Surge SFM Light:** El medio esta compuesto con factores de crecimiento, elementos traza específicos para la supervivencia y proliferación de queratinocitos (Ghio et al., 2023).

#### 2.4.2. Medios con factores de crecimiento y hormonas para queratinocitos

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium):** Esta constituido por EGF (Epidermal Growth Factor), insulina, hidrocortisona y transferrina (Seo et al., 2016).
- **Medio con suero:** Esta compuesto con 0.4 mg/mL de hidrocortisona, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), 0.1 nM de toxina Colérica,  $2 \times 10^{-7}$  M de triyodotironina-L y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina (Richards et al., 2008).
- **Medio sin suero (VN):** Contiene 0.4 mg/mL de hidrocortisona, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), 0.1 nM de toxina Colérica,  $2 \times 10^{-7}$  M de triyodotironina-L y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina (Richards et al., 2008).
- **Medio basal con suero:** Su composición lleva insulina, hidrocortisona, toxina del cólera, y factor de crecimiento epidérmico (Lamb & Ambler, 2013).
- **Medios libres de suero y sin alimentadores:** Es un medio conformado de insulina, hidrocortisona, toxina del cólera, y factor de crecimiento epidérmico (Lamb & Ambler, 2013).
- **MCDB 153:** Es una combinación de Epidermal Growth Factor (EGF), bovine Pituitary Extract (BPE) y hydrocortisona (Batista, 2011).
- **Surge SFM Light:** El medio es una mezcla de Fibroblast Growth Factor (FGF), keratinocyte Growth Factor (KGF), colera Toxin e isoproterenol, este último se utiliza en unos cuantos cultivos primarios (Ghio et al., 2023).

#### 2.4.3. Medios con suplementos adicionales para el cultivo de queratinocitos

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium):** Es un medio conformado de FBS (suero bovino fetal) y antibióticos o antimicóticos (Seo et al., 2016).



- **Medio con suero:** Contiene  $1.8 \times 10^{-4}$  M de adenina,  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  de transferrina, 2 mM de glutamina y antibióticos (1000 IU/mL de penicilina o  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina) (Richards et al., 2008).
- **Medio sin suero (VN):** Esta compuesto  $1.8 \times 10^{-4}$  M de adenina,  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  de transferrina, 2 mM de glutamina y antibióticos (1000 IU/mL de penicilina o  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina) (Richards et al., 2008).
- **Medio basal con suero:** Es un medio que tiene calcio exógeno en su composición (Lamb & Ambler, 2013).
- **Medios libres de suero y sin alimentadores:** El medio es una mezcla de calcio exógeno y 10 % de suero FBS (inactivado por calor pero no hervido), este último ayuda a la formación de una epidermis estratificada (Lamb & Ambler, 2013).
- **MCDB 153:** Esta conformado por Aurintricarboxylic Acid (ATA), sodium Pyruvate, selenium, penicillin-Streptomycin-Glutamine y fetal Bovine Serum (FBS) (Batista, 2011).
- **Surge SFM Light:** Se elabora con fibronectina plasmática humana derivada (Ghio et al., 2023).

## 2.5. Condiciones de cultivo para queratinocitos

El cultivo in vitro de queratinocitos es una técnica ampliamente utilizada en la investigación biomédica y dermatológica. Para garantizar el crecimiento y la viabilidad de estas células, es necesario establecer y mantener condiciones óptimas en varios aspectos críticos del entorno de cultivo, incluyendo temperatura, pH, osmolaridad, humedad, concentración de oxígeno, adhesión celular y el tipo de soporte. Establecer estas condiciones adecuadas es fundamental para replicar el entorno fisiológico natural de los queratinocitos y asegurar su correcto comportamiento en el cultivo (Ghio et al., 2019; Mattei et al., 2020).

### 2.5.1. Temperatura, pH y osmolaridad

La temperatura es un factor crucial en el cultivo de queratinocitos. Según el método descrito por Cortez S. en 2019, las co-culturas de queratinocitos humanos normales (nhK) deben incubarse a una temperatura constante de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Este entorno replica las condiciones fisiológicas del cuerpo humano, proporcionando un ambiente óptimo para el crecimiento y proliferación de las células (Ghio et al., 2019).

El pH del medio de cultivo se debe ajustar entre 7.1 a 7.4, ya que la precisión en el ajuste del pH es vital para mantener un ambiente estable que favorezca la supervivencia y funcionalidad de los queratinocitos (Ghio et al., 2019; Gönczi et al., 2007).

En el estudio realizado por Gönczi, se determinó que los queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) se cultivaron en condiciones hipotónicas con una osmolaridad de aproximadamente el 50 % de la solución de Tyrode original, es decir,  $174 \pm 2$  mOsmol/l; para lograr esta osmolaridad se tuvo que eliminar la mitad del Na-glutamato en la solución de Tyrode, lo cual permitió investigar los efectos del estrés hipotónico en el potencial de membrana y la proliferación de los queratinocitos (Gönczi et al., 2007).

### **2.5.2. Humedad y concentración de dióxido de carbono**

La atmósfera de incubación también debe tener un control estricto de la humedad y la concentración de dióxido de carbono, Cortez S. sugiere una atmósfera con 8 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad, condiciones que se consideran óptimas para la proliferación y diferenciación de los queratinocitos, esto se debe a que una alta humedad evita la desecación del medio de cultivo, mientras que el control del CO<sub>2</sub> ayuda a mantener el pH adecuado del medio (Ghio et al., 2019).

### **2.5.3. Adhesión celular y tipo de soporte**

Hay diferentes tipos de estudios sobre adhesión celular y tipo de soporte, ya que estos son cruciales para el éxito del cultivo de queratinocitos. Según el estudio realizado por Mattei en 2020, menciona que los queratinocitos de la línea celular HaCaT fueron incubados con diferentes concentraciones del enjuague bucal blue®m (1, 10 y 100  $\mu$ l/ml), utilizando otro pozo como control sin la presencia del enjuague. Este tipo de ensayo permite evaluar la proliferación celular en respuesta a diferentes tratamientos, mostrando la importancia del medio y de los suplementos específicos en el cultivo celular (Mattei et al., 2020).

Por otro lado, el método descrito por Cortez S. utiliza biopsias de piel humana normal, de las cuales se extraen queratinocitos normales (nhK) y fibroblastos humanos irradiados (HFL). Los fibroblastos no proliferativos sirven como una capa de soporte para los queratinocitos, facilitando su adhesión y crecimiento. Este enfoque destaca la importancia de los andamios y matrices en la creación de un entorno tridimensional que soporte el crecimiento celular (Ghio et al., 2019).

Adicionalmente, el estudio de Borowiec en 2013 investigó los efectos de varios tratamientos en la proliferación y viabilidad de los queratinocitos, mostrando que ciertas concentraciones de los compuestos probados aumentaron significativamente la prolifera-

ción celular, mientras que otras tuvieron un efecto citotóxico. Estos resultados subrayan la necesidad de optimizar el medio de cultivo y los tratamientos suplementarios para mejorar la viabilidad y proliferación celular (Borowiec et al., 2013).

Por último, Batista evaluó la efectividad de diferentes medios de cultivo para el crecimiento de queratinocitos humanos en 2011. Los resultados demostraron que ciertas formulaciones de medios mejoraron significativamente la proliferación y viabilidad celular, sugiriendo su uso potencial en aplicaciones clínicas. Esto resalta la importancia de seleccionar el medio adecuado para obtener resultados óptimos en el cultivo de queratinocitos (Batista, 2011).

## **2.6. Crecimiento y proliferación de queratinocitos in vitro**

Los queratinocitos son las células predominantes en la epidermis, y su proliferación es crucial para la regeneración y mantenimiento de la piel. En sus estudios, Cabunac ha demostrado que factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) juegan un papel significativo en la proliferación de queratinocitos tanto orales como epidérmicos. (Cabunac et al., 2016).

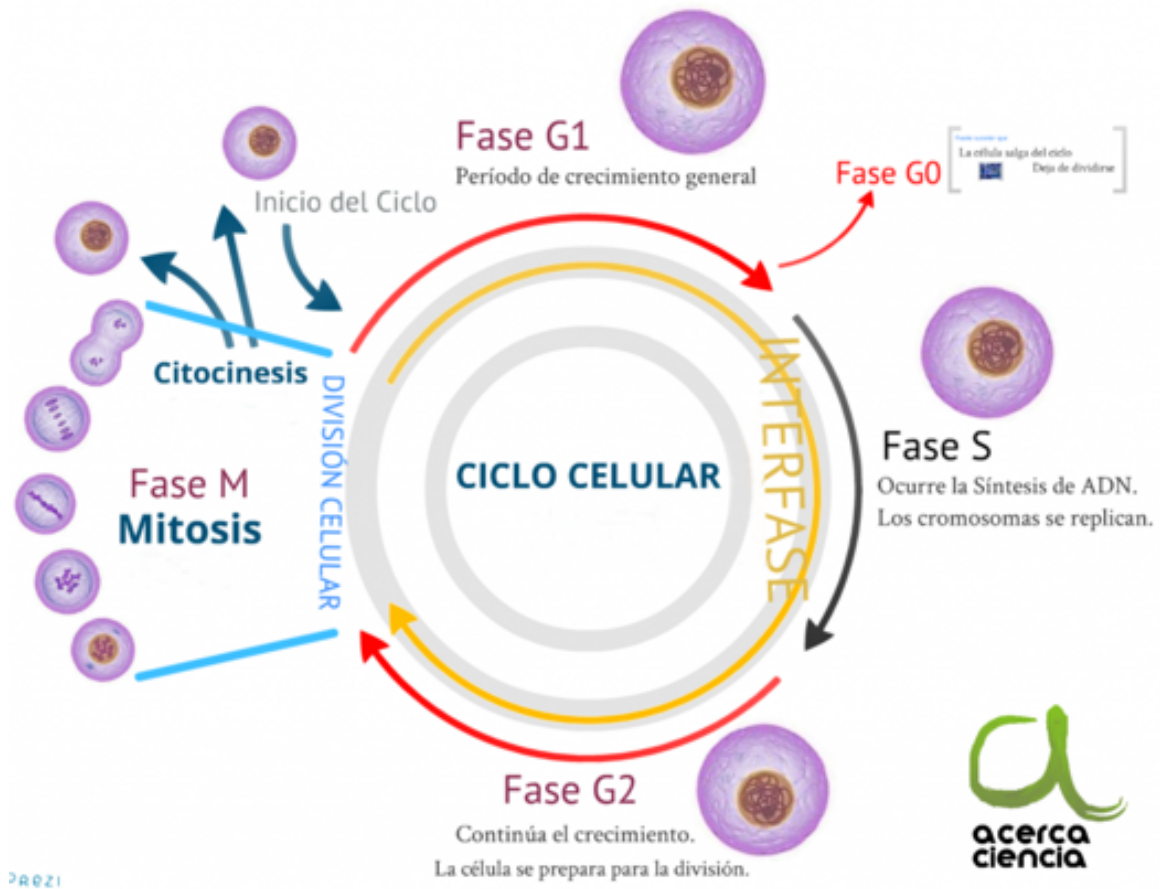
Cabunac, ha observado que en cultivos in vitro las concentraciones bajas de EGF (de 2ng/L a 10ng/L) aceleran la proliferación de queratinocitos; otros factores como la composición de la matriz extracelular (ECM) y la presencia de integrinas también afectan la adhesión y proliferación de estas células. (Dickhuth et al., 2015).

### **2.6.1. Cinética de crecimiento y ciclo celular**

La cinética de crecimiento y ciclo celular se enfoca en estudio de las tasas y los procesos que se realizan, para conocer cuantas células proliferan y se dividen; a su vez analizan las diferentes fases del ciclo celular y su duración, incluyen los siguientes estadios: el crecimiento inicial (G1), la de síntesis de ADN (S), la preparación para la mitosis (G2) y la mitosis (M) (D & Flaxman, 1974).

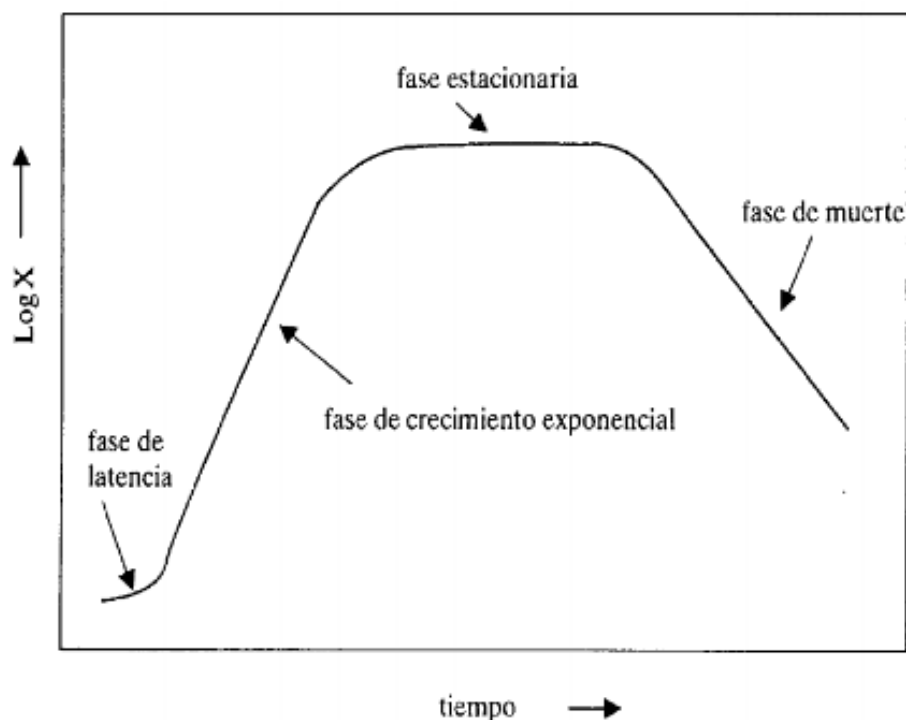
La cinética de crecimiento de los queratinocitos en cultivo sigue fases características: fase de adaptación (lag phase), fase logarítmica (log phase) donde ocurre la duplicación celular, fase estacionaria (stationary phase) y fase de muerte celular (death phase). Durante estas fases, los queratinocitos muestran diferentes tasas de proliferación y apoptosis. (Dickhuth et al., 2015).

**Figura 2-1.:**  
*Ciclo celular*



*Nota.* Proceso de proliferación de células. Imagen obtenida de: Biología 2ªA por Oscar Montecinos, 2013.

**Figura 2-2.:**  
*Cinética celular*



*Nota.* Cinética de crecimiento celular. Imagen obtenida de: Filadd por Sofía, 2019.

### 2.6.2. Métodos para evaluar la viabilidad celular

Los métodos para evaluar la viabilidad celular son técnicas que se emplean con el objetivo de definir la capacidad de las células para mantener su actividad metabólica, proliferarse y diferenciarse, con la finalidad de demostrar el estado de salud y funcionalidad de las mismas (Şenkal et al., 2022).

Los métodos comunes para evaluar la viabilidad celular utilizan los siguientes equipos:

- **CASY Cell Counter:** Utilizado para contar células y analizar su viabilidad mediante una técnica de medición de partículas conocida como análisis de área de pulso (Dickhuth et al., 2015).
- **WST-1 Assay:** Un ensayo no radiactivo y espectrofotométrico que cuantifica la viabilidad celular midiendo la actividad mitocondrial (Dickhuth et al., 2015).
- **xCELLigence System:** Permite un análisis en tiempo real de la proliferación celular, proporcionando datos sobre el conteo celular, la viabilidad, la morfología y la adhesión celular (Dickhuth et al., 2015).

### 2.6.3. Factores que afectan el crecimiento de los queratinocitos

El crecimiento de los queratinocitos puede ser influenciado por varios factores:

- **Factores de crecimiento:** El EGF es crucial para la proliferación y migración de queratinocitos. Diferentes concentraciones de EGF pueden tener efectos variados; concentraciones bajas favorecen la proliferación mientras que concentraciones altas pueden tener un efecto migratorio más que proliferativo (Cabunac et al., 2016).
- **Composición de la matriz extracelular (ECM):** La presencia de componentes como colágeno IV y laminina en la ECM facilita la adhesión y proliferación de los queratinocitos. Las integrinas juegan un papel esencial en la mediación de estas interacciones célula-ECM (Dickhuth et al., 2015).
- **Condiciones de cultivo:** Las condiciones como la temperatura de cultivo pueden influir en la proliferación. Por ejemplo, temperaturas de 34°C pueden mejorar la proliferación de queratinocitos (Dickhuth et al., 2015).
- **Factores externos:** Factores liberados por plaquetas, como los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PRGF), pueden inhibir la proliferación de queratinocitos en concentraciones dependientes (Bayer et al., 2018).

Como dato adicional, algunos estudios han demostrado que las condiciones de cultivo, como el uso de extracto de embrión de pollo y plasma en la preparación de cultivos de queratinocitos, pueden influir en el crecimiento y proliferación de estas células (D & Flaxman, 1974).

Estos factores combinados determinan la eficacia y la velocidad del crecimiento de queratinocitos en condiciones *in vitro*, siendo cruciales para aplicaciones en ingeniería de tejidos y estudios dermatológicos.

## 2.7. Diferenciación de queratinocitos *in vitro*

La diferenciación de los queratinocitos es un proceso fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de la piel y la formación de la barrera epidérmica. Los modelos de cultivo *in vitro* han sido ampliamente utilizados para estudiar los mecanismos moleculares y celulares que regulan este proceso, así como para evaluar el impacto de diferentes factores en la diferenciación de los queratinocitos (Bikle et al., 2012; El-Ghalbzouri et al., 2002).

### 2.7.1. Modelos de diferenciación en cultivo

- **Cultivo de queratinocitos en monocapa:** Este modelo es muy utilizado debido a su simplicidad y reproducibilidad. Además de la privación de calcio y la adición de agentes como el ácido retinoico o la vitamina D3, también se pueden usar otros inductores de la diferenciación, como el ácido butírico, el ácido

valpróico o el interferón-gamma. Los cambios morfológicos y bioquímicos observados durante la diferenciación en este modelo incluyen la formación de gránulos de queratohialina, la expresión de proteínas estructurales como las involucrina y las queratinas suprabásicas, y la formación de un estrato córneo (Bikle et al., 2012; Micallef et al., 2009).

- **Cultivo de queratinocitos en aire-líquido:** Este modelo permite estudiar los distintos estadios de la diferenciación epidérmica, desde la capa basal hasta el estrato córneo. La expresión de marcadores de diferenciación específicos, como las queratinas K1 y K10, la involucrina y la loricina, sigue un patrón similar al observado en la epidermis humana in vivo. Este modelo ha sido utilizado para evaluar el impacto de diferentes compuestos y tratamientos en la formación de la barrera epidérmica y la integridad de la función barrera (Poumay & Pittelkow, 1995; Pruniéras et al., 1983).
- **Cultivo de queratinocitos en matrices de colágeno o equivalentes dérmicos:** Estos modelos tridimensionales permiten estudiar la interacción entre los queratinocitos y su entorno, incluyendo la influencia de la matriz extracelular y las señales procedentes de otros tipos celulares, como los fibroblastos. Estas interacciones pueden modular la diferenciación de los queratinocitos y la formación de la barrera epidérmica a través de vías de señalización como TGF- $\beta$ , Wnt y Notch (Blanpain et al., 2006; Proksch et al., 2008). Estos modelos han sido utilizados para evaluar la eficacia de nuevos compuestos y terapias en la regeneración de la piel y el tratamiento de enfermedades relacionadas con la diferenciación anormal de los queratinocitos.

### 2.7.2. Factores de la diferenciación de queratinocitos

Estos se puede ver afectados por factores internos y externos, como:

- **Factores de transcripción:** Los factores de transcripción como p63, Klf4, Ovol1/2 y AP-1, otros factores como C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  y Grainy head-like (Grhl) también participan en la regulación de la diferenciación de los queratinocitos (Candi et al., 2006; Segre et al., 1999; Truong et al., 2006). Estos factores de transcripción actúan en diferentes etapas de la diferenciación y regulan la expresión de genes involucrados en la formación de la barrera epidérmica, la adhesión celular y la respuesta al estrés.
- **Vías de señalización:** La vía de señalización Notch desempeña un papel crucial en la regulación de la diferenciación de los queratinocitos, actuando como un interruptor entre la proliferación y la diferenciación (Blanpain et al., 2006). La vía de señalización Wnt también es importante en la diferenciación de los queratinocitos, regulando la expresión de genes involucrados en la formación de la barrera epidérmica. Otras vías de señalización relevantes incluyen la vía de señalización

TGF- $\beta$ , que regula la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos, y la vía de las MAPK, que modula la respuesta a estímulos externos como el estrés oxidativo.

- **Factores de crecimiento y citocinas:** Factores como EGF, KGF, TGF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, otros factores como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (HB-EGF) también desempeñan un papel importante en la regulación de la diferenciación de los queratinocitos (Li et al., 2024). Estos factores actúan a través de vías de señalización específicas y pueden modular la proliferación, la migración y la diferenciación de los queratinocitos.
- **Interacciones célula-célula y célula-matriz:** Las interacciones entre los queratinocitos y las células vecinas, como los fibroblastos y los melanocitos, pueden modular la diferenciación a través de la liberación de factores solubles y la activación de vías de señalización específicas (Proksch et al., 2008). Las interacciones con la matriz extracelular también son importantes, ya que las proteínas de la matriz, como las lamininas y los colágenos, pueden regular la diferenciación de los queratinocitos a través de la activación de vías de señalización mediadas por integrinas.
- **Factores ambientales:** La radiación UV puede inducir la diferenciación prematura de los queratinocitos y alterar la formación de la barrera epidérmica a través de la generación de especies reactivas de oxígeno y la activación de vías de señalización como la vía de las MAPK. Otros factores ambientales, como los contaminantes químicos y los agentes físicos, también pueden modular la diferenciación de los queratinocitos a través de diversos mecanismos, como la alteración de la expresión génica y la activación de vías de señalización específicas (Segre et al., 1999).

## 2.8. Aplicaciones de los cultivos de queratinocitos in vitro

La principal aplicación del cultivo de queratinocitos in vitro en la medicina regenerativa, es el tratamiento de heridas grandes y complejas, como quemaduras severas o extirpación de tumores, ya que es una alternativa eficaz a los injertos de piel tradicionales; además, se utiliza en la creación de autoinjertos epiteliales cultivados (CEA) que pueden cubrir grandes defectos cutáneos (Aojanepong et al., 2022).

Se puede realizar modelados 2D y 3D de la piel para crear tejidos artificiales que pueden ser usados en terapias celulares, comprender la fisiología y patología cutánea (Miller et al., 1997); también son estudiados e inventados mecanismos de detección sensorial y tratamientos del dolor; y con el propósito de la evaluación de la seguridad de productos



y tratamientos dermatológicos, los modelos in vitro son utilizados como una alternativa a las pruebas en animales (Xu et al., 2022).

Los cultivos in vitro de queratinocitos también se pueden aplicar a la diferenciación de células madre en la epidermis, procesos inflamatorios, la producción de cosméticos y la evaluación de agentes (Fujisaki et al., 2019)..

Otra aplicación de los cultivos de queratinocitos in vitro es la investigación de queratinocitos primarios humanos obtenidos de la mucosa colorrectal normal, debido a su localización se puede estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el inicio y progresión del carcinoma colorrectal y otras enfermedades intestinales (Torrregiani et al., 2019).

### 2.8.1. Estudios de toxicidad y citotoxicidad

En la actualidad existen una gran variedad de estudios sobre toxicidad y citotoxicidad en piel cultivada in vitro empleando diferentes tipos de células. Un caso específico, es el uso de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) para crear un cultivo tridimensional y evaluar su toxicidad; este cultivo presenta una expresión génica y proteica similar a la de la piel, lo cual lo hace apropiado para los análisis de toxicidad, para esto se expusieron los cultivos 3D a varios compuestos químicos durante 1 y 24 horas, luego se examinaron en el microscopio y los resultados determinaron que el cultivo in vitro de HaCaT respondieron de manera más parecida a la piel humana en comparación con los cultivos en monocapa, bidimensionales o pruebas en animales, por lo que los cultivos tridimensionales son recomendados para estudios de toxicología porque dan resultados más fiables (Şenkal et al., 2022).

Mientras que, un estudio de citotoxicidad sobre el agua ozonizada y los desinfectantes de manos, de este último probaron diferentes productos, los cuales están compuestos de etanol, cloruro de benzalconio, povidona yodada y clorhexidina en un modelo de epidermis tridimensional creado a base de queratinocitos humanos; analizaron los daños estructurales que se dieron en el estrato córneo y los queratinocitos, la producción de interleucina  $1\alpha$  usando el método de barrido por microscopía electrónica con tinción con hematoxilina-eosina. Gracias a esto, determinaron que más del 80 % de los queratinocitos mueren al ser expuestos 15 minutos a los desinfectantes, pero el agua ozonizada causa menos daño y no produce una respuesta inflamatoria (Kashiwazaki et al., 2020).

### 2.8.2. Ensayos de irritación y sensibilidad dérmica

Los ensayos de irritación y sensibilidad dérmica se centran en el análisis y evaluación de los modelos de piel humana cultivada in vitro, específicamente EPISKIN® y EpiDerm™, los cuales tienen como objetivo determinar el potencial irritante de las sustancias químicas en la piel humana, para optimizar la sensibilidad y especificidad de

los modelos *in vitro* y ajustarse con los resultados obtenidos en pruebas *in vivo* [? ]. El protocolo Modified EpiDerm SIT, se centra en optimizar la sensibilidad para reconocer irritantes cutáneos, manteniendo una alta especificidad; mientras que, proporciona una técnica eficaz para clasificar y regular las sustancias químicas en base a su capacidad de irritabilidad (Kandárová et al., 2009).

También se pueden realizar ensayos de irritación y sensibilidad dérmica en una línea celular sensora basada en queratinocitos humanos (HaCaT), estos son modificados genéticamente para revelar la proteína verde fluorescente (GFP) cuando se use el gen HSP70B' (Hofmann et al., 2014). El objetivo de este ensayo es proporcionar una herramienta sensible y rápida para determinar respuestas de estrés oxidativo en queratinocitos expuestos a sustancias químicas, como su estado redox, ya que este actúa como un indicador temprano del desarrollo de trastornos de la piel humana como la dermatitis de contacto alérgica e irritante; además, favorece el desarrollo de sistemas de análisis micro-total ( $\mu$ TAS), los cuales son aplicables en dermatología, toxicología, farmacología y cribado de fármacos (Hofmann et al., 2014).

### 2.8.3. Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa

La Ingeniería de Tejidos, se origino a partir de las décadas de 1980 y 1990, busca reconstruir tejido humano o animal dentro del cuerpo del receptor o fabricar el tejido en un biorreactor para luego inyectarlo al sujeto, creando así un tejido autólogo (Curtis & Riehle, 2001; Liu & Cao, 2011). Para la reconstrucción de tejidos, se pueden utilizar sustratos no vivos que ayudan a mejorar el volumen y la resistencia en áreas afectadas por extirpación o daño del tejido (Curtis & Riehle, 2001).

Inicialmente, la Ingeniería de Tejidos se consideraba parte del subcampo de biomateriales, ya que abordaba la reparación o sustitución de hueso, cartílago, vasos sanguíneos y piel (Bronzino, 2016). En 1988, un taller de la Fundación Nacional de Ciencias definió la expresión "Ingeniería de Tejidos", centrada en la reconstrucción de tejidos utilizando biomateriales, andamios y factores de crecimiento (Akter, 2016). Este campo emplea métodos de ingeniería y ciencias de la vida para entender la relación estructura-función en tejidos normales y patológicos de mamíferos, así como para desarrollar sustitutos biológicos que reparen o reemplacen tejidos u órganos (Bronzino, 2016; Verma & Verma, 2013). Es una disciplina multidisciplinaria que combina ciencia y medicina con el objetivo de crear sustitutos funcionales para reparar, preservar y mejorar tejidos lesionados, además de satisfacer la demanda de órganos para trasplantes.

En la actualidad, la Ingeniería de Tejidos forma parte de la Ingeniería Biomédica, que integra biología e ingeniería para desarrollar tejidos celulares *in vitro* o restaurar tejidos dentro del cuerpo. Esto requiere abordar problemas en los procedimientos de injertos y terapias celulares, tales como la recolección de tejidos, el procesamiento y aislamiento

de células, las pruebas de seguridad, y el almacenamiento y control de cultivos (McClelland et al., 2005; Verma & Verma, 2013).

Otros investigadores, como E. Lavik y R. Langer, afirman que la Ingeniería de Tejidos abarca la biología celular, la ciencia de los materiales, la ingeniería de reactores y la investigación clínica para crear tejidos u órganos similares a los del receptor o modificados usando células madre y progenitoras (Lavik & Langer, 2004).

En 1997 Whithman propuso incorporar plasma rico en plaquetas (PRP) en la cola de fibrina, dando así inicio a la medicina regenerativa; un año más tarde, Marx reveló que el PRP podía inducir la regeneración ósea en la mandíbula, lo que potenció este método en la comunidad científica (Porcellini, 2009). Definiendo así, a la medicina regenerativa como la encargada de reemplazar o reparar tejidos y órganos enfermos mediante el uso de células madre con un alto potencial de diferenciación multipotente y productos biológicos cultivados in vitro, los cuales se aplicaran in vivo, con la finalidad de inducir la migración y proliferación de células madre al tejido dañado, y así reparar el tejido afectado (Porcellini, 2009).

A su vez, la medicina regenerativa trabaja en conjunto con la biología celular, la ingeniería biomédica y la medicina clínica para tener un enfoque multidisciplinario al momento de crear sustitutos biológicos funcionales con el objetivo de estimular la regeneración de tejidos y órganos (Muraca et al., 2007). En la actualidad esta área cuenta con una variedad de aplicaciones, puede utilizarse en la terapia celular, la ingeniería de tejidos y los órganos bioartificiales, pero a pesar de los avances que existen en este campo, sigue siendo considerado experimental y se debe demostrar su efectividad al pasar del laboratorio a la práctica clínica (Muraca et al., 2007).

### 2.8.4. Modelos de enfermedades de la piel

Para estudiar las enfermedades dermatológicas se utilizan modelos tridimensionales de epidermis, ya que estos permiten recrear el microambiente de la piel nativa, de esta manera se puede obtener información sobre la patogénesis de diversas condiciones dermatológicas, para esto se emplea el método de uso de la dermis descelsularizada, andamiajes de colágeno y bioimpresión 3D, con el objetivo de recrear modelos de piel humana que ayuden a comprender los mecanismos subyacentes de las enfermedades cutáneas (Stanton et al., 2022).

Con los avances tecnológicos que existen en la actualidad se han desarrollado modelos digitales para clasificar y diagnosticar enfermedades en la piel, para ello utilizan procesamiento de imágenes y aprendizaje automático. Empieza con la adquisición de imágenes, luego con un preprocesamiento, continua con una segmentación, finaliza con la extracción de características y clasificación; para reconocer patrones importantes de

cuatro enfermedades: acné, angioma cereza, melanoma y psoriasis (Aldera et al., s.f.). Además, este modelo utilizó algoritmos de aprendizaje automático, como SVM, RF y K-NN, siendo el clasificador SVM el más efectivo, ya que alcanzó una precisión del 90.7%; mientras que, su principal función era diagnosticar las enfermedades a una alta velocidad y exactitud, ayudando a sí a los dermatólogos en el diagnóstico (Aldera et al., s.f.).

## 3. Marco metodológico

### 3.1. Equipos e insumos

#### 3.1.1. Equipos

La tabla 3-1 presenta el costo estimado de los equipos que se van a utilizar para la investigación y que cuentan los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana.

Tabla 3-1.:  
*Equipos*

| Denominación                  | Cantidad | Costo Unitario (\$) | Costo Total (\$) |
|-------------------------------|----------|---------------------|------------------|
| Incubadora                    | 1        | 2000                | 2000             |
| Microscopio óptico            | 1        | 1500                | 1500             |
| Autoclave                     | 1        | 1500                | 1500             |
| Centrífuga                    | 1        | 3000                | 3000             |
| Baño María                    | 1        | 100                 | 100              |
| Cámara de bioseguridad        | 1        | 6000                | 6000             |
| Refrigerador                  | 1        | 500                 | 500              |
| Congelador                    | 1        | 1000                | 1000             |
| Espectrómetro de absorción    | 1        | 2000                | 2000             |
| Equipo de citometría de flujo | 1        | 30000               | 30000            |

*Nota.* Equipos utilizados para el cultivo celular de queratinocitos in vitro, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

#### 3.1.2. Reactivos

La tabla 3-2 se puede observar el presupuesto estimado de los reactivos que se van a emplear para el proyecto, los cuales se encuentran en los laboratorios de ciencia de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana, a excepción de la clorhexidina que se tuvieron que conseguir de manera externa.

*Nota.* Reactivos utilizados para el cultivo celular de queratinocitos in vitro, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

**Tabla 3-2.:**  
*Reactivos*

| <b>Denominación</b>                                     | <b>Cantidad</b> | <b>Costo Unitario (\$)</b> | <b>Costo Total (\$)</b> |
|---|-----------------|----------------------------|-------------------------|
| Células de queratinocitos inmortales (HaCaT)            | 100 $\mu$ g     | \$ 612.97                  | \$ 612.97               |
| Suero fetal bovino (FBS)                                | 50 ml           | \$ 110.74                  | \$ 110.74               |
| Medio de cultivo DMEM                                   | 500 ml          | \$ 35.50                   | \$ 35.50                |
| Tripsina EDTA   | 100 ml          | \$ 19.76                   | \$ 19.76                |
| Antibióticos (penicilina/estreptomicina/anfotericina B) | 20 ml           | \$ 37.46                   | \$ 37.46                |
| Etanol 70 %   | 500 ml          | \$ 27.90                   | \$ 27.90                |
| Clorhexidina  | 500 ml          | \$6.75                     | \$ 6.75                 |

### 3.1.3. Materiales

En la tabla 3-3 se muestra el costo de los materiales que se van a necesitar usar en el proyecto de investigación y que deben ser adquiridos por el tesista.

**Tabla 3-3.:**  
*Materiales.*

| <b>Denominación</b>                  | <b>Cantidad</b> | <b>Costo Unitario (\$)</b> | <b>Costo Total (\$)</b> |
|--------------------------------------|-----------------|----------------------------|-------------------------|
| Guantes quirúrgicos                  | 25              | \$ 1.01                    | \$ 25.48                |
| Batas esteriles desechables          | 6               | \$ 3.27                    | \$ 19.62                |
| Gorros esteriles desachables         | 6               | \$ 0.05                    | \$ 0.30                 |
| Zapatones esteriles desechables      | 6               | \$ 0.25                    | \$ 1.50                 |
| Gafas de bioseguridad                | 3               | \$ 2.50                    | \$ 7.50                 |
| Tubos Falcon de 15 ml                | 4               | \$25.29                    | \$ 25.29                |
| Tubos Falcon de 50 ml                | 4               | \$25.29                    | \$ 25.29                |
| Matraz de cultivo celular T25        | 4               | \$ 3.14                    | \$ 12.56                |
| Controladores de pipetas serológicas | 1               | 50                         | 50                      |
| Micropipetas serológicas             | 1               | 40                         | 40                      |
| Puntas para micropipetas             | 20              | 15                         | 15                      |
| Pipetas serológicas de 5 ml          | 20              | \$ 22                      | \$ 22                   |

*Nota.* Materiales utilizados para el cultivo celular de queratinocitos in vitro, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

## 3.2. Metodología de la Investigación

El presente estudio es una investigación experimental transversal, realizado en el periodo 64, con enfoque cualitativo y cuantitativo, teniendo en cuenta los siguientes requerimientos: insumos, reactivos y equipos utilizados para llevar a cabo este proyecto en función a la información que se va a recolectar y analizar, siendo esta: el crecimiento y viabilidad celular de los queratinocitos cultivados un vitro; además, el tipo de investigación que se realizó fue exploratorio y aplicado, esto con respecto a la naturaleza del problema.

Por otra parte, se utilizó una metodología descriptiva para explicar el proceso y las características que tienen los queratinocitos cultivados in vitro, de esta manera se conoció el alcance de la investigación y permitir que en el futuro se desarrollen proyectos de cultivo celular de tejido epitelial in vitro.

## 3.3. Metodología del proceso

El proceso de investigación se estructura en las siguientes etapas:

**Identificación de necesidades:** por medio de una revisión bibliográfica se determinaron los conceptos más importantes con respecto al cultivo celular de queratinocitos in vitro y el método que se va a utilizar para diseñar el protocolo de cultivo in vitro de queratinocitos. Esto se describe en el capítulo 2.

**Revisión de recursos materiales:** se identificó información acerca de los equipos, insumos, reactivos y materiales a utilizarse para la realización del cultivo de queratinocitos in vitro, el mismo que se detalla en el capítulo 3.

**Desarrollo del protocolo de cultivo celular de queratinocitos in vitro:** se expone el formato elaborado del protocolo y la descripción paso a paso de cada ítem que se debe cumplir para su implementación piloto, utilizando la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) donado por la Dra. Marbel Torres directora de la carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) de Sangolquí. Además, se presenta un análisis de los resultados obtenidos y una evaluación de la viabilidad celular, esto se presenta en el capítulo 4.

**Conclusiones y recomendaciones:** se plantearon las conclusiones en relación con los objetivos; mientras que, en las recomendaciones se propone implementar una sala destinada para el cultivo celular humano en el capítulo 5.

## 4. Desarrollo del protocolo de cultivo celular de queratinocitos in vitro

Este protocolo esta orientado al cultivo de queratinocitos in vitro en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana, utilizando la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT), debido a que cuenta con una gran variedad de características fenotípicas y una alta cantidad de propagación (Deyrieux & Wilson, 2007).

### 4.1. Normas de bioseguridad

1. Al entrar a la área gris (es una zona de preparación del personal, aquí también se realiza el lavado quirúrgico (Canovas, 2018)), se debe cumplir con ciertas normas de bioseguridad, como el uso de equipos de protección personal (EPP) (for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 2010), estos son:
  - Guantes de procedimiento (for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 2010).
  - Mascarilla KN-95 (for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 2010).
  - Gafas protección (for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 2010).
  - Gorro desechables estériles (for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 2010).
  - Zapatones desechables estériles (for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), 2010).

Esto tiene como finalidad, evitar contaminar las células o tejidos con los que se vaya a trabajar (Méndez & Inca, 2018).

2. Realizar un lavado de manos quirúrgico con clorhexidina, este debe durar de 40 a 60 segundos, para que las manos y antebrazos queden desinfectados (Méndez & Inca, 2018), indicado en el **Anexo A**.
3. Secar con un campo estéril, se procede a ponerse los guantes y la bata quirúrgica (Méndez & Inca, 2018).



### 4.1.1. Desinfección al área de trabajo

1. Efectuar una desinfección química en las superficies inorgánicas y materiales inanimados, empleando etanol al 70 %, para disminuir el número de agentes biológicos. También se puede utilizar cuando se sospeche de una contaminación en los instrumentos.
2. Limpiar el interior de la cabina de flujo laminar con alcohol etílico al 70 % luego se debe dejar en radiación ultravioleta durante 15 minutos, indicado en el **Anexo B**.
3. Rocíar etanol al 70 % a todo los instrumentos que se vayan a utilizar, se prosigue a meter estos materiales dentro de la cabina e irradiar con rayos UV durante 15 minutos, indicado en el **Anexo C**.

### 4.1.2. Prevención de Contaminación

1. Utilizar EPP exclusivo para las instalaciones de cultivo de tejidos y mantenerlo separado del EPP utilizado en el entorno general del laboratorio.
2. Los reactivos, matraces, medio y ampollas deben estar etiquetados con su contenido y fecha de preparación.
3. Es recomendable trabajar con una sola línea celular para disminuir la probabilidad de contaminación cruzada y la transferencia de bacterias.

## 4.2. Activación de células

1. Preparación del Material y Equipo:
  - a) Preparar matraces T25 con medios de cultivo precalentados a la temperatura adecuada.
  - b) Utilizar alcohol al 70 % (v/v) en agua esterilizada para la desinfección.
  - c) Preparar un baño María de agua a 37°C.
2. Descongelación de las Células:
  - a) Retirar una ampolla de células HaCaT del almacenamiento de nitrógeno líquido utilizando equipo de protección personal adecuado.
  - b) Transferir la ampolla al baño María anteriormente mencionado, por 1-2 minutos, hasta que solo queden uno o dos pequeños cristales de hielo. Es importante no sumergir totalmente la ampolla para evitar contaminación.
  - c) Limpiar la ampolla con un pañuelo empapado en alcohol al 70 % antes de abrirla.
3. Reanimación de las Células:

- a) Pipetear todo el contenido de la ampolla en un tubo Falcon de 15 ml estéril.
  - b) Agregar lentamente 5 ml de medio de crecimiento precalentado y suplementado con los componentes apropiados.
  - c) Determinar la densidad de células viables.
4. Siembra de las Células:
- a) Transferir el volumen apropiado de suspensión celular a un matraz T25, este debe ser de 8 ml, para lograr la densidad de siembra celular recomendada.
  - b) Asegurarse de que el matraz T25 tenga una tapa con ventilación para permitir el intercambio gaseoso dentro de una incubadora alimentada con CO<sub>2</sub>.
5. Incubación de las Células:
- a) Incubar las células HaCaT a una temperatura de 35°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
  - b) Después de 24 horas, examinar el contraste de fases de las células en el microscopio.
  - c) Realizar un subcultivo según sea necesario para mantener la proliferación de las células en la fase logarítmica de crecimiento y asegurar una viabilidad óptima.

### 4.3. Tripsinización de queratinocitos in vitro

Después de un período de incubación de las células de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) se debe verificar si existe confluencia de células en el microscopio de contraste de fase invertida, esta debe estar entre un 60% a 70%, si cumple con este requisito se procede a realizar la tripsinización, esta técnica permite separar las células, las mismas que serán utilizadas para proliferar nuevos cultivos.

1. Se debe rociar con alcohol al 70% y colocar todos los materiales e insumos, como: controladores de pipetas serológicas, pipetas serológicas, tubos Falcon de 15 ml, tubos Falcon de 50 ml, matraces de cultivo celular T25 y los guantes quirúrgicos dentro de la cabina de flujo laminar y se activa la cámara de rayos UV por 15 minutos, indicado en el **Anexo D**.
2. Los reactivos, como: las células HaCaT, el suero fetal bovino (FBS), el medio de cultivo DMEM, la tripsina EDTA y los antibióticos se rocíaran con alcohol al 70% y se colocarán después de que haya acabado de irradiar los materiales, ya que los rayos UV pueden alterar el ADN de los reactantes.
3. Luego, en un vaso de precipitación de 600 ml se debe mezclar 300 ml agua destilada con 5% de cloro, esto servirá para depositar las puntas de las jeringas, el instrumental y reactivos utilizados.

#### 4.4 Mantenimiento del Cultivo

---

4. A continuación, se debe colar 3 ml de tripsina en la matraz T25 que contiene las células HaCaT incubadas, esto se deja por un minuto y luego se decanta.
5. Se procede a realizar un medio suplementado en un tubo Falcon de 50 ml, este debe contener 7 ml de medio DMEM con glucosa (Sigma #D5796) y 10 % de suero fetal bovino (Sigma #2442) para inactivar la tripsina, indicado en el **Anexo E**.
6. Con una pipeta serológica se va a sacar el medio suplementado del tubo y se lo debe poner en la matraz T25 donde solo quedaron las células HaCaT.
7. Dejar actuar durante 5 minutos, mientras se dan pequeños toques en la base de la matraz T25 para tratar de separar las células que están adheridas a la superficie de la matraz.
8. De forma inmediata se debe sacar el contenido de la matriz T25 con una nueva pipeta serológica y se debe situar en un tubo Falcon de 15 ml, indicado en el **Anexo F**.
9. La muestra del medio suplementado con las células colocada en el tubo Falcon de 15 ml, se llevará a centrifugar por 10 minutos a 1500 revoluciones por minuto (rpm), indicado en el **Anexo G**.
10. Una vez acabe de centrifugarse la muestra, se puede observar un pellet o pastilla de células al fondo del tubo Falcon, se debe decantar el medio del tubo con mucho cuidado para no votar el pellet.
11. Dentro del mismo tubo Falcon de 15 ml se debe colocar 1 ml de medio DMEM con glucosa (Sigma #D5796) para romper el pellet.
12. En un nuevo tubo Falcon de 50 ml se hace otro medio suplementado con 7 ml de medio DMEM con glucosa (Sigma #D5796), 10 % de suero fetal bovino (Sigma #2442) y 1 % de antibióticos (estreptomicina).
13. Con otra pipeta serológica se debe extraer el medio suplementado y se lo ubica en una matraz T25 estéril, en seguida se debe añadir el 1 ml del medio con el pellet.
14. Después, el nuevo medio de la matraz T25 en el que están las células HaCaT se deja en la incubadora, la cual debe estar a una temperatura de 35°C, 40 % de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>, indicado en el **Anexo H**.

#### 4.4. Mantenimiento del Cultivo

1. Limpiar periódicamente las superficies del gabinete de seguridad microbiológica con un desinfectante adecuado.

2. Se debe cambiar el medio DMEM con glucosa (Sigma #D5796) de la matraz T25 donde están las células de HaCaT cada dos días o las células pueden morir, esto se puede observar cuando el medio cambia a un color más claro, ya que las células absorben todos los nutrientes del mismo.
3. Verificar todos los días si los cultivos y medios no adquirieron una contaminación bacteriana o fúngica.
4. Mantener todas las superficies ordenadas y desinfectadas entre operaciones.
5. Asegurar que las incubadoras, gabinetes, centrifugas y microscopios se les realice mantenimiento en intervalos regulares.

## 4.5. Análisis de resultados

Para analizar si existió una buena proliferación celular de los queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) se debe observar las células cultivadas en un microscopio.

1. Con una pipeta serológica se extrajo 1 ml del cultivo celular de los queratinocitos HaCaT y se colocó en una cámara de Neubauer, esta tiene dos cuadrículas con nueve cuadrantes grandes cada una y 16 cuadrados pequeños en cada cuadrado grande.
2. Luego se llevo la muestra al microscopio para contar las células viables que existen, lo ideal sería que existan más de 100 células.
3. Se seleccionaron 4 cuadros grandes en cada esquina, dando un total de 16 cuadros.
4. A estos cuadrados se les contó el número de células vivas que tenía y se los promedio.

A continuación se va a presentar los datos obtenidos de los 16 cuadros después de un período de incubación de dos semanas:

**Tabla 4-1.:**

*Datos obtenidos de los 2 primeros cuadros grandes de la esquina superior derecha de la cámara de Neubauer.*

| Número de cuadro    | Número de células vivas contadas |
|---------------------|----------------------------------|
| 1                   | 22                               |
| 2                   | 16                               |
| <b>Promedio: 19</b> |                                  |

*Nota.* Células de queratinocitos contabilizadas mediante un microscopio, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

**Tabla 4-2.:**

*Datos obtenidos de los 2 últimos cuadros grandes de la esquina superior derecha de la cámara de Neubauer.*

| Número de cuadro    | Número de células vivas contadas |
|---------------------|----------------------------------|
| 3                   | 15                               |
| 4                   | 13                               |
| <b>Promedio: 14</b> |                                  |

*Nota.* Células de queratinocitos contabilizadas mediante un microscopio, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

**Tabla 4-3.:**

*Datos obtenidos de los 2 primeros cuadros grandes de la esquina inferior derecha de la cámara de Neubauer.*

| Número de cuadro      | Número de células vivas contadas |
|-----------------------|----------------------------------|
| 1                     | 30                               |
| 2                     | 29                               |
| <b>Promedio: 29.5</b> |                                  |

*Nota.* Células de queratinocitos contabilizadas mediante un microscopio, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

**Tabla 4-4.:**

*Datos obtenidos de los 2 últimos cuadros grandes de la esquina inferior derecha de la cámara de Neubauer.*

| Número de cuadro      | Número de células vivas contadas |
|-----------------------|----------------------------------|
| 3                     | 29                               |
| 4                     | 26                               |
| <b>Promedio: 27.5</b> |                                  |

*Nota.* Células de queratinocitos contabilizadas mediante un microscopio, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

**Tabla 4-5.:**

*Datos obtenidos de los 2 primeros cuadros grandes de la esquina superior izquierda de la cámara de Neubauer.*

| Número de cuadro    | Número de células vivas contadas |
|---------------------|----------------------------------|
| 1                   | 23                               |
| 2                   | 33                               |
| <b>Promedio: 28</b> |                                  |

*Nota.* Células de queratinocitos contabilizadas mediante un microscopio, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

**Tabla 4-6.:**

*Datos obtenidos de los 2 últimos cuadros grandes de la esquina superior izquierda de la cámara de Neubauer.*

| Número de cuadro      | Número de células vivas contadas |
|-----------------------|----------------------------------|
| 3                     | 21                               |
| 4                     | 26                               |
| <b>Promedio:</b> 23.5 |                                  |

*Nota.* Células de queratinocitos contabilizadas mediante un microscopio, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

**Tabla 4-7.:**

*Datos obtenidos de los 2 primeros cuadros grandes de la esquina inferior izquierda de la cámara de Neubauer.*

| Número de cuadro      | Número de células vivas contadas |
|-----------------------|----------------------------------|
| 1                     | 26                               |
| 2                     | 25                               |
| <b>Promedio:</b> 25.5 |                                  |

*Nota.* Células de queratinocitos contabilizadas mediante un microscopio, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

**Tabla 4-8.:**

*Datos obtenidos de los 2 últimos cuadros grandes de la esquina inferior izquierda de la cámara de Neubauer.*

| Número de cuadro      | Número de células vivas contadas |
|-----------------------|----------------------------------|
| 3                     | 22                               |
| 4                     | 25                               |
| <b>Promedio:</b> 23.5 |                                  |

*Nota.* Células de queratinocitos contabilizadas mediante un microscopio, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

5. En este protocolo se uso un factor de dilución de 5 x 10.000
6. Cálculo de células viables de una muestra de cultivo de células HaCaT en el matraz T25.

Para conocer el número de células viables que existen, primero sacamos el promedio de los datos obtenidos en los cuadros grandes de la esquina derecha, estos serían:

$$\begin{aligned}
 \text{Células en la esquina derecha} &= \frac{19 + 14 + 29,5 + 27,5}{4} \\
 &= \frac{90}{4} \\
 &= 22,5
 \end{aligned}
 \tag{4-1}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Células en la esquina izquierda} &= \frac{28 + 23,5 + 25,5 + 23,5}{4} \\
 &= \frac{100,5}{4} \\
 &= 25,13
 \end{aligned}
 \tag{4-2}$$

Por consiguiente, sacamos un promedio total de las células en base a los valores que obtuvimos anteriormente.

$$\begin{aligned}
 \text{Total de células} &= \frac{22,5 + 25,13}{2} \\
 &= \frac{47,63}{2} \\
 &= 23,82
 \end{aligned}
 \tag{4-3}$$

7. Después, empleamos la fórmula de recuento de células viables por mililitro.

$$\begin{aligned}
 \text{Células viables por mililitro} &= \text{Total de células} * \text{Número de cuadros utilizado} * \text{Factor de dilución} \\
 &= 23,82 * 16 * 5 * 10000 \\
 &= 19056000 \\
 &= 1,9 * 10^7
 \end{aligned}
 \tag{4-4}$$

Es decir, que tenemos  $1,9 * 10^7$  células de queratinocitos HaCaT por cada mililitro de medio. Si en el matraz T25 tenemos 7.0077 ml de medio suplementado con suero fetal bovino y antibióticos, significa que existen 133146300 células de queratinocitos.

## **5. Conclusiones y recomendaciones**

### **5.1. Conclusiones**

Se reconoció las propiedades que deben cumplir los queratinocitos y los tipos que existen, lo cual permite un mejor entendimiento al realizar investigaciones sobre los mismos.

Se estableció por medio de un listado los equipos, reactivos y materiales que se deben emplear para efectuar este protocolo.

A través de la investigación y desarrollo experimental del protocolo, se ha logrado establecer un método estandarizado para el cultivo in vitro de queratinocitos en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

La implementación del protocolo utilizando la línea celular de queratinocitos humanos immortalizados (HaCaT) ha resultado en una alta proliferación y viabilidad de las células cultivadas. Esto demuestra la eficacia del medio de cultivo y las condiciones experimentales empleadas, lo cual es fundamental para su uso en aplicaciones clínicas y de investigación.

### **5.2. Recomendaciones**

Se recomienda crear un área específica para realizar cultivo celular humano in vitro dentro de la Universidad Politécnica Salesiana, con la finalidad de evitar una contaminación cruzada en los reactivos y células que se manejen, esto permitirá mejorar el tiempo de investigación y obtener mejores resultados.

El protocolo puede ser utilizado como guía para el desarrollo de otros protocolos de cultivos in vitro de células o tejidos humanos dentro de los laboratorios de ciencia de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana.



# A. Anexo: Guía de lavado de manos quirúrgico

Figura A-1.:

Guía de lavado de manos quirúrgico.

## ¿Cómo lavarse las manos?

¡Lávese las manos solo cuando estén visiblemente sucias! Si no, utilice la solución alcohólica

**⌚ Duración de todo el procedimiento: 40-60 segundos**

|  |   |   |
|--|---|---|
| <p><b>0</b></p>  <p>Mójese las manos con agua;</p>   | <p><b>1</b></p>  <p>Deposite en la palma de la mano una cantidad de jabón suficiente para cubrir todas las superficies de las manos;</p>                        | <p><b>2</b></p>  <p>Frótese las palmas de las manos entre sí;</p>  |
| <p><b>3</b></p>  <p>Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda entrelazando los dedos y viceversa;</p>        | <p><b>4</b></p>  <p>Frótese las palmas de las manos entre sí, con los dedos entrelazados;</p>  | <p><b>5</b></p>  <p>Frótese el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta, agarrándose los dedos;</p> |
| <p><b>6</b></p>  <p>Frótese con un movimiento de rotación el pulgar izquierdo, atrapándolo con la palma de la mano derecha y viceversa;</p> | <p><b>7</b></p>  <p>Frótese la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda, haciendo un movimiento de rotación y viceversa;</p> | <p><b>8</b></p>  <p>Enjuáguese las manos con agua;</p>  |
| <p><b>9</b></p>  <p>Séquese con una toalla desechable;</p>  | <p><b>10</b></p>  <p>Sírvase de la toalla para cerrar el grifo;</p>  | <p><b>11</b></p>  <p>Sus manos son seguras.</p>   |

|   |  |  |
|---|--|--|
|  <p><b>Organización Mundial de la Salud</b></p>  | <p><b>Seguridad del Paciente</b></p> <p>UNA ALIANZA MUNDIAL PARA UNA ATENCIÓN MÁS SEGURA</p> | <p><b>SAVE LIVES</b></p> <p>Clean Your Hands</p> |
| <p>La Organización Mundial de la Salud ha tomado todas las precauciones razonables para comprobar la información contenida en este documento. Sin embargo, el material publicado se distribuye sin garantía de ningún tipo, ya sea expresa o implícita. Compense al lector la responsabilidad de la interpretación y del uso del material. La organización Mundial de la Salud no podrá ser considerada responsable de los daños que pudiere ocasionar su utilización. La OMS agradece a los Hospitales Universitarios de Ginebra (HUG), en particular a los miembros del Programa de Control de Infecciones, su participación activa en la redacción de este material.</p> |  |  |

Organización Mundial de la Salud, Octubre 2010

*Nota.* Pasos para realizar un correcto lavado de manos quirúrgico. Imagen obtenida de: World Health Organization, 2010.

## B. Anexo: Limpieza del interior de la cabina de flujo laminar

Figura B-1.:

*Limpieza del interior de la cabina de flujo laminar.*



*Nota.* Se roció alcohol al 70 % en toallas de papel para limpiar la cabina de flujo laminar, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

## C. Anexo: Ingreso de los insumos a la cabina de flujo laminar

Figura C-1.:

*Ingreso de los insumos a la cabina de flujo laminar.*



*Nota.* Se rocía alcohol al 70 % a cada uno de los insumos y luego se ingresan a la cabina de flujo laminar, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

## D. Anexo: Activar cámara de rayos UV

**Figura D-1.:**  
*Activar cámara de rayos UV.*



*Nota.* Una vez este limpia la cámara de flujo laminar, se procede a encender la cámara de rayos UV por 15 minutos, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

## E. Anexo: Preparar medio suplementado en un tubo Falcon de 50 ml

**Figura E-1.:**

*Preparar medio suplementado en un tubo Falcon de 50 ml.*



*Nota.* Con el uso de una pipeta serológica se saco el medio DMEM y se lo puso en el tubo Falcon de 50 ml, de la misma manera, pero con una pipeta limpia se extrajo el suero fetal bovino para realizar el medio suplementado, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

## F. Anexo: Pasar el medio suplementado con las células a un tubo Falcon de 15 ml

**Figura F-1.:**

*Pasar el medio suplementado con las células a un tubo Falcon de 15 ml.*

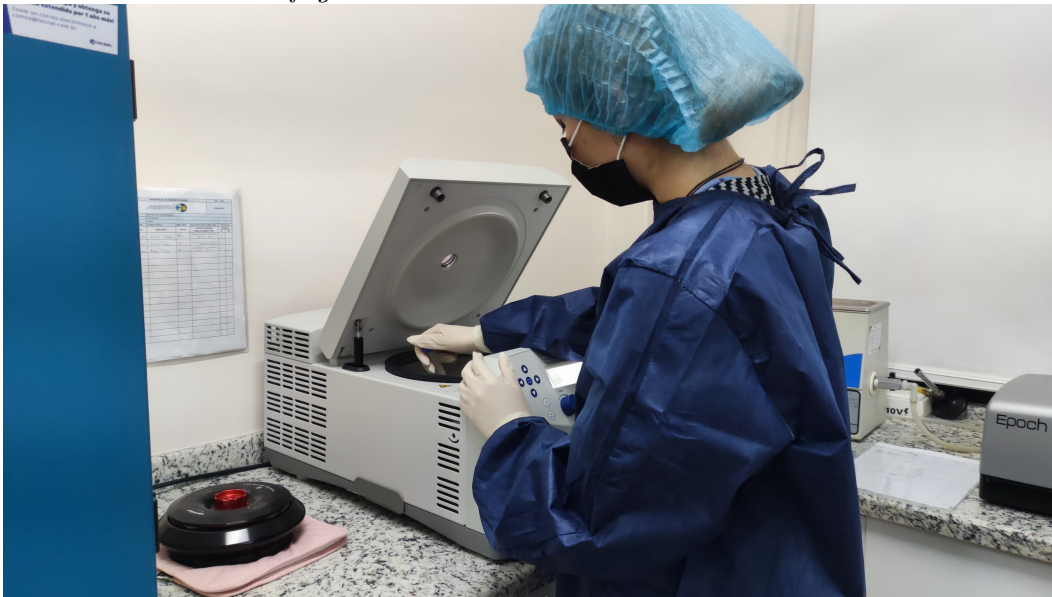


*Nota.* Se pasa el medio suplementado del matraz T25 al tubo Falcom de 15 ml con una pipeta serológica, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

## G. Anexo: Centrifugar la muestra del tubo Falcon de 15 ml

Figura G-1.:

*Centrifugar la muestra del tubo Falcon de 15 ml.*



*Nota.* Se lleva a centrifugar el medio con las células que están en el tubo Falcon de 15 ml por 10 minutos a 1500 rpm, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.

## H. Anexo: Guardar el nuevo medio del matraz T25 en la incubadora

**Figura H-1.:**

*Guardar el nuevo medio del matraz T25 en la incubadora.*



*Nota.* Se lleva a la incubadora de CO<sub>2</sub> el matraz T25 con el medio de las células tripsinizado para que puedan proliferar los queratinocitos, por Ariana Cedeño, 2024, Copyright.



# Bibliografía

- Aasen, T., & Belmonte, J. C. I. (2010). Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 5, 371-382. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.241>
- Akter, F. (2016, junio). What is Tissue Engineering? Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00001-1>
- Aldera, S. A., Tahar, M., & Othman, B. (s.f.). A Model for Classification and Diagnosis of Skin Disease using Machine Learning and Image Processing Techniques. *IJACSA) International Journal of Advanced Computer Science and Applications*, 13, 2022. [www.ijacsa.thesai.org](http://www.ijacsa.thesai.org)
- Aojanepong, C., Khaogate, K., Wongkajornsilp, A., Duangsa-ard, S., & Kasetsinsombat, K. (2022). Keratinocyte Culture: Siriraj's Experience. *Siriraj Medical Journal*, 74, 274-283. <https://doi.org/10.33192/Smj.2022.34>
- Batista, F. R. X. (2011). Evaluation of Culture Medium for Human Keratinocytes. *Journal of Stem Cell Research Therapy*, 01. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000101>
- Bayer, A., Tohidnezhad, M., Berndt, R., Lippross, S., Behrendt, P., Klüter, T., Pufe, T., Jahr, H., Cremer, J., Rademacher, F., Simanski, M., Gläser, R., & Harder, J. (2018). Platelet-released growth factors inhibit proliferation of primary keratinocytes in vitro. *Annals of Anatomy*, 215, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.09.002>
- Bikle, D. D., Xie, Z., & Tu, C. L. (2012). Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 7, 461-472. <https://doi.org/10.1586/eem.12.34>
- Blanpain, C., Lowry, W. E., Pasolli, H. A., & Fuchs, E. (2006). Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes and Development*, 20, 3022-3035. <https://doi.org/10.1101/gad.1477606>
- Borowiec, A. S., Delcourt, P., Dewailly, E., & Bidaux, G. (2013). Optimal Differentiation of In Vitro Keratinocytes Requires Multifactorial External Control. *PLoS ONE*, 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077507>
- Bronzino, J. D. (2016, abril). *Tissue engineering and artificial organs*. CRC Press. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7\\_21](https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_21)
- Cabunac, J., Stanković, S. T., Milosavljević, Z., Tanasković, I., & Kanjevac, T. (2016). Comparative analysis of proliferative activity of oral and epidermal keratinocytes under the influence of epidermal growth factor. [www.medjbio.com](http://www.medjbio.com)
- Candi, E., Rufini, A., Terrinoni, A., Dinsdale, D., Ranalli, M., Paradisi, A., Laurenzi, V. D., Spagnoli, L. G., Catani, M. V., Ramadan, S., Knight, R. A., & Melino,

- G. (2006). Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: Selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death and Differentiation*, *13*, 1037-1047. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401926>
- Canovas, D. G. M. (2018). Manual de CEyE y quirófano centro de excelencia medica en altura.
- Chermnykh, E., Kalabusheva, E., & Vorotelyak, E. (2018). Extracellular matrix as a regulator of epidermal stem cell fate. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*. <https://doi.org/10.3390/ijms19041003>
- Cuadra, G., Shamim, A., Shah, R., Morgan, J., & Palazzolo, D. (2023). Comparison of Culture Media for in-vitro Expansion of Oral Epithelial Keratinocytes: Implications for Testing E-liquid Flavors. <https://doi.org/10.20944/preprints202301.0150.v1>
- Curtis, A., & Riehle, M. (2001). Tissue engineering: The biophysical background. *Physics in Medicine and Biology*, *46*. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/46/4/201>
- D, D. P. C. A. N., & Flaxman, B. A. (1974). Comparative proliferative kinetics of cells from normal human epidermis and benign epidermal hyperplasia (psoriasis) in vitro.
- Das, P., Mounika, P., Yellurkar, M. L., Prasanna, V. S., Sarkar, S., Velayutham, R., & Arumugam, S. (2022). Keratinocytes: An Enigmatic Factor in Atopic Dermatitis. *Cells*, *11*. <https://doi.org/10.3390/cells11101683>
- Dehdashtian, A., Stringer, T. P., Warren, A. J., Mu, E. W., Amirlak, B., & Shahabi, L. (2018, junio). Anatomy and physiology of the skin. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-78310-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-78310-9_2)
- Deyrieux, A. F., & Wilson, V. G. (2007). In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*, *54*, 77-83. <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9076-1>
- Dickhuth, J., Koerdt, S., Kriegebaum, U., Linz, C., Müller-Richter, U. D., Ristow, O., Kübler, A. C., & Reuther, T. (2015). In vitro study on proliferation kinetics of oral mucosal keratinocytes. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *120*, 429-435. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2015.06.001>
- El-Ghalbzouri, A., S.Gibbs, Lamme, E., Van, C., & Ponec, M. (2002). Cutaneous Biology Effect of fibroblasts on epidermal regeneration.
- El-Serafi, A. T., El-Serafi, I., Steinvall, I., Sjöberg, F., & Elmasry, M. (2022). A Systematic Review of Keratinocyte Secretions: A Regenerative Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*. <https://doi.org/10.3390/ijms23147934>
- Fabres, C. (2010). INGENIERÍA DE TEJIDOS. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *21*, 488-493. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70562-9](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70562-9)
- Ferran, M., Giménez-Arnau, A., Bellosillo, B., Pujol, R., & Santamaría-Babi, L. (2008). Función efectora de linfocitos T CLA+ sobre queratinocitos autólogos en psoriasis. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, *99*, 701-707. [https://doi.org/10.1016/s0001-7310\(08\)76174-x](https://doi.org/10.1016/s0001-7310(08)76174-x)
- for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), A. (2010). Comprehensive guide to steam sterilization and sterility assurance in health care facilities.

- Fujisaki, H., Futaki, S., Mizuno, K., & Hattori, S. (2019). Evaluation of keratinocyte proliferation on two-and three-dimensional type I collagen substrates. *Journal of Visualized Experiments*, 2019. <https://doi.org/10.3791/59339>
- George, M., Noone, M. L., Santhosh, P., Santhoshkumar, R., Sagar, B. K., & Mahadevan, A. (2021). Skin biopsy as an aid to diagnosis of disorders of the nervous system without cutaneous manifestations. *International Journal of Dermatology*, 60, 1179-1182. <https://doi.org/10.1111/ijd.15513>
- Gerber, T., Taschner-Mandl, S., Saloberger-Sindhöringer, L., Popitsch, N., Heitzer, E., Witt, V., Geyeregger, R., Hutter, C., Schwentner, R., Ambros, I. M., & Ambros, P. F. (2020). Assessment of Pre-Analytical Sample Handling Conditions for Comprehensive Liquid Biopsy Analysis. *Journal of Molecular Diagnostics*, 22, 1070-1086. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.05.006>
- Ghio, S. C., Barbier, M. A., Doucet, E. J., Debbah, I., Safoine, M., Le-Bel, G., Cartier, A., Jolibois, E., Morissette, A., Larouche, D., Fradette, J., Guérin, S. L., Garnier, A., & Germain, L. (2023). A Newly Developed Chemically Defined Serum-Free Medium Suitable for Human Primary Keratinocyte Culture and Tissue Engineering Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24031821>
- Ghio, S. C., Le-Bel, G., Lavoie, A., Larouche, D., & Germain, L. (2019). Isolation and culture of human keratinocytes. Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9473-1_1)
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016, agosto). Anatomy and Function of the Skin. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
- Gönczi, M., Szentandrassy, N., Fülöp, L., Telek, A., Szigeti, G. P., Magyar, J., Bíró, T., Nánási, P. P., & Csernoch, L. (2007). Hypotonic stress influence the membrane potential and alter the proliferation of keratinocytes in vitro. *Experimental Dermatology*, 16, 302-310. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00533.x>
- González, A. F., Moreno, A. M. L., del Mar de Pablos Ramos, M., García, A. R., Ibáñez, O. E., Porcel, N. F., Calvo, J. G., Arrabal, M., López-Carmona, F., & Arias-Santiago, S. (2016). Optimization of human keratinocyte culture to develop an artificial human skin model: cell alternatives as feeder layer of Advanced Therapies. *Actualidad Medica*, 101, 85-94. <https://doi.org/10.15568/am.2016.798.or04>
- Hofmann, U., Priem, M., Bartzsch, C., Winckler, T., & Feller, K. H. (2014). A sensitive sensor cell line for the detection of oxidative stress responses in cultured human keratinocytes. *Sensors (Switzerland)*, 14, 11293-11307. <https://doi.org/10.3390/s140711293>
- Ita, K. (2020). Anatomy of the human skin. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822550-9.00002-8>
- Kandárová, H., Hayden, P., Klausner, M., Kubilus, J., Kearney, P., & Sheasgreen, J. (2009). The reconstructed human skin model.

- Kashiwazaki, J., Nakamura, K., Hara, Y., Harada, R., Wada, I., & Kanemitsu, K. (2020). Evaluation of the cytotoxicity of various hand disinfectants and ozonated water to human keratinocytes in a cultured epidermal model. *Advances in Skin and Wound Care*, *33*, 313-318. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000658592.51430.ea>
- Khan, E. S., Sankaran, S., Llontop, L., & Campo, A. D. (2020). Exogenous supply of Hsp47 triggers fibrillar collagen deposition in skin cell cultures in vitro. *BMC Molecular and Cell Biology*, *21*. <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00267-0>
- Khan, S., Shih, T., Shih, S., & Khachemoune, A. (2021). Reappraising Elements of the Aseptic Technique in Dermatology: A Review. *Dermatology Practical Conceptual*, e2020126. <https://doi.org/10.5826/dpc.1101a126>
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2009). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, *37*, 223-226. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.03.002>
- Lamb, R., & Ambler, C. A. (2013). Keratinocytes Propagated in Serum-Free, Feeder-Free Culture Conditions Fail to Form Stratified Epidermis in a Reconstituted Skin Model. *PLoS ONE*, *8*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052494>
- Larouche, D., Paquet, C., Fradette, J., Carrier, P., Auger, F. A., & Germain, L. (2009). Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods in Molecular Biology*, *482*, 233-256. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-060-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-060-7_15)
- Lavik, E., & Langer, R. (2004). Tissue engineering: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *65*, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1580-z>
- Li, G., Guo, J., Mou, Y., Luo, Q., Wang, X., Xue, W., Hou, T., Zeng, T., & Yang, Y. (2024). Keratin gene signature expression drives epithelial-mesenchymal transition through enhanced TGF- signaling pathway activation and correlates with adverse prognosis in lung adenocarcinoma. *Heliyon*, *10*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24549>
- Liu, W., & Cao, Y. (2011, septiembre). Tissue-Engineering Technology for Tissue Repair and Regeneration. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00454-2>
- Lorenzini, N. V., Manterola, C. D., & Moraga, J. C. (2014). Bioingeniería de tejidos: cultivo de queratinocitos humanos en el tratamiento de la epidermólisis bullosa\*, 359-363.
- Mattei, B. M., Imanishi, S. A. W., de Oliveira Ramos, G., de Campos, P. S., Weiss, S. G., & Deliberador, T. M. (2020). Mouthwash with Active Oxygen Induces Keratinocytes Proliferation. *Open Journal of Stomatology*, *10*, 107-114. <https://doi.org/10.4236/ojst.2020.106012>
- McClelland, R., Dennis, R., Reid, L. M., Palsson, B., & Macdonald, J. M. (2005). Tissue engineering. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-238662-6.50009-4>
- Méndez, C. I. P., & Inca, N. V. M. (2018). Manual de bioseguridad para los laboratorios clínicos de Microbiología, Citología y Biología Molecular. <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5562>

- Micallef, L., Belaubre, F., Pinon, A., Jayat-Vignoles, C., Delage, C., Charveron, M., & Simon, A. (2009). Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Experimental Dermatology*, *18*, 143-151. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x>
- Miller, S. J., Lavker, R. M., & Sun, T.-T. (1997). Keratinocyte stem cells of cornea, skin and hair follicles. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-012563455-7/50012-x>
- Muraca, M., Galbiati, G., Realdi, G., Vilei, M. T., Fabricio, A. S. C., & Caruso, M. (2007). Regenerative Medicine: An Insight. *Transplantation Proceedings*, *39*, 1995-1998. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.07.020>
- Nuñez, M. C. M. (2014). Aislamiento e implementación de un cultivo primario de queratinocitos de mamífero para la realización de estudios en ciencias básica y aplicada.
- Phua, R., Tien, T. Z., Goh, G., Pantelireis, N., Sim, K. S. H., Lim, J., & Clavel, C. (2023). In vitro quantification of pigment production and transfer in 2D cocultures and 3D skin organotypic. *STAR Protocols*, *4*. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102334>
- Porcellini, A. (2009). Regenerative medicine: A review Medicina regenerativa: Uma revisão revista brasileira de hematologia e hemoterapia.
- Poumay, Y., & Pittelkow, M. R. (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *Journal of Investigative Dermatology*, *104*, 271-276. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12612810>
- Poumay, Y., & Coquette, A. (2007). Modelling the human epidermis in vitro: Tools for basic and applied research. *Archives of Dermatological Research*, *298*, 361-369. <https://doi.org/10.1007/s00403-006-0709-6>
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J. M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, *17*, 1063-1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- Pruniéras, M., Régnier, M., & Woodley, D. (1983). Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *The Journal of Investigative Dermatology*, *81*, 28-33.
- Richards, S., Leavesley, D., Topping, G., & Upton, Z. (2008). Development of defined media for the serum-free expansion of primary keratinocytes and human embryonic stem cells. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, *14*, 221-232. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2007.0428>
- Sánchez, J. S. (2008). Protocolo: herramienta comunicativa persuasiva y simbólica Protocolo: A Symbolic, Persuasive Communicative Tool. *Revista de estudios de comunicación = Komunikazio ikasketen aldizkaria*, *13*, 337-361.
- Ścieżyńska, A., Nogowska, A., Sikorska, M., Konys, J., Karpińska, A., Komorowski, M., Ołdak, M., & Malejczyk, J. (2019). Isolation and culture of human primary ke-

- keratinocytes—a methods review. *Experimental Dermatology*, *28*, 107-112. <https://doi.org/10.1111/exd.13860>
- Segre, J. A., Bauer, C., & Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. <http://genetics.nature.com>
- Şenkal, S., Burukçu, D., Hayal, T. B., Kiratli, B., Şişli, H. B., Sağraç, D., Asutay, B., Sümer, E., Şahin, F., & Doğan, A. (2022). 3D CULTURE OF HaCaT KERATINOCYTE CELL LINE AS AN in vitro TOXICITY MODEL. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, *23*, 211-220. <https://doi.org/10.23902/trkjnat.1158811>
- Seo, B. F., Kim, K. J., Kim, M. K., & Rhie, J. W. (2016). The effects of human keratinocyte coculture on human adipose-derived stem cells. *International Wound Journal*, *13*, 630-635. <https://doi.org/10.1111/iwj.12335>
- Stanton, D. N., Ganguli-Indra, G., Indra, A. K., & Karande, P. (2022). Bioengineered Efficacy Models of Skin Disease: Advances in the Last 10 Years. *Pharmaceutics*, *14*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020319>
- Strüver, K., Friess, W., & Hedtrich, S. (2017). Development of a Perfusion Platform for Dynamic Cultivation of in vitro Skin Models. *Skin Pharmacology and Physiology*, *30*, 180-189. <https://doi.org/10.1159/000476071>
- Takagi, R., Yamato, M., Murakami, D., Kondo, M., Yang, J., Ohki, T., Nishida, K., Kohno, C., & Okano, T. (2011). Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *5*. <https://doi.org/10.1002/term.337>
- Tauchi, H., Imashiro, C., Kuribara, T., Fujii, G., Kurashina, Y., Totani, K., & Takemura, K. (2019). Effective and Intact Cell Detachment from a Clinically Ubiquitous Culture Flask by Combining Ultrasonic Wave Exposure and Diluted Trypsin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *24*, 536-543. <https://doi.org/10.1007/s12257-018-0491-2>
- Torreggiani, E., Rossini, M., Bononi, I., Pietrobon, S., Mazzoni, E., Iaquinta, M. R., Feo, C., Rotondo, J. C., Rizzo, P., Tognon, M., & Martini, F. (2019). Protocol for the long-term culture of human primary keratinocytes from the normal colorectal mucosa. *Journal of Cellular Physiology*, *234*, 9895-9905. <https://doi.org/10.1002/jcp.28300>
- Truong, A. B., Kretz, M., Ridky, T. W., Kimmel, R., & Khavari, P. A. (2006). p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. *Genes and Development*, *20*, 3185-3197. <https://doi.org/10.1101/gad.1463206>
- Verma, P., & Verma, V. (2013). Concepts of Tissue Engineering. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00013-4>
- Xu, X., Yu, C., Xu, L., & Xu, J. (2022). Emerging roles of keratinocytes in nociceptive transduction and regulation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.982202>