

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE PIEL *IN VITRO* MEDIANTE BIOIMPRESIÓN 3D



Departamento: Bioquímica y biología molecular
Área: Bioquímica y biología molecular

Trabajo fin de grado
Curso 2023-2024
Universidad Miguel Hernández de Elche
Grado en biotecnología
Facultad de ciencias experimentales

Autor: Rafael Cámara Esclapez
Tutora: Asia Fernández Carvajal
Cotutoras: Verónica Rivero y Olivia Gross

ABREVIATURAS

3D: 3 dimensiones

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BSA: Suero de albúmina bovino

Células NK: Células *natural killer*

Col: Colágeno

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FBS: Suero bovino fetal

LAP: Litiobenzoilfenil-2,4,6-trimetilbencilfosfinato

MEC: Matriz extracelular

NGS: Suero normal de cabra

OCT: Temperatura optima de corte

p/s: penicilina/estreptomicina

p/v: peso/volumen

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: paraformaldehído

UV: Ultravioleta



RESUMEN

Actualmente los modelos animales son una pieza clave del desarrollo de fármacos para el tratamiento de la piel. Sin embargo, no representan totalmente el comportamiento de la piel humana, lo que puede explicar la falta de traslación de los modelos animales. El objetivo de este proyecto es desarrollar un modelo de piel humana inervada *in vitro* con el fin de disminuir estas diferencias entre el modelo de investigación y el destino último del producto a desarrollar. Además, al emplear células de humanos, se podrá estudiar cada paciente de manera concreta y personalizada, y así comprobar si un tratamiento es adecuado para el paciente concreto.

Este modelo se ha desarrollado mediante bioimpresión 3D, para lo cual se necesitan probar previamente distintas condiciones, con el fin de optimizar el proceso de bioimpresión y cultivo. Tras la bioimpresión y cultivo del modelo de piel humana, se ha procedido a la caracterización de este. Los resultados evidencian que contiene una dermis y epidermis maduras y completas. Esta es la fase inicial de un proyecto que podría suponer un cambio de paradigma en la investigación preclínica de enfermedades, alergias o sensibilidades dermatológicas.

PALABRAS CLAVE: Bioimpresión 3D, dermis, epidermis, modelo de piel.

ABSTRACT

Currently, animal models are a key component in the development of drugs for skin treatment. However, they do not fully represent the behaviour of human skin, which may explain the lack of translation from animal models. The aim of this project is to develop an innervated human skin model *in vitro* to reduce these differences between the research model and the final target of the product being developed. Additionally, by using human cells, it will be possible to study each patient specifically and personally, thereby determining if a treatment is suitable for a particular patient.

This model has been developed using 3D bioprinting, which requires testing various conditions beforehand to optimize the bioprinting and cultivation process. After the bioprinting and cultivation of the human skin model, characterization was carried out. The results show that it contains a mature and complete dermis and epidermis. This is the initial phase of a project that could represent a paradigm shift in preclinical research on dermatological diseases, allergies, or sensitivities.

KEYWORDS: 3D bioprinting, dermis, epidermis, skin model.

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. La piel: Características generales y organización.	4
1.1.1. Hipodermis	5
1.1.2. Dermis	5
1.1.2.1. Matriz extracelular.	5
a) <i>Proteínas de la matriz extracelular.</i>	5
b) <i>Unión dermis-epidermis.</i>	5
1.1.2.2. Otros elementos de la dermis.....	6
1.1.3. Epidermis.....	7
1.1.3.1. Estructura.....	7
1.1.3.2. Queratinocitos	8
1.1.3.3. Otros tipos celulares en la epidermis.....	8
1.2. Modelos de piel 3D bioimpresa	8
1.2.2. Hidrogeles biocompatibles para el desarrollo de la dermis.	9
a) Colágeno.....	10
b) Gelatina y alginato	10
c) GelMa y gelatina	10
1.2.3. Modelos de piel bioimpresos en 3D: Parámetros de bioimpresión.	12
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Líneas celulares	14
3.2. Hidrogel	14
3.4. Parámetros de bioimpresión 3D	14
3.5. Desarrollo del modelo de piel humana.....	14
3.6. Análisis de la viabilidad celular en el modelo de dermis.....	15
3.7. Preparación de muestras	15
3.8. Análisis inmunohistológico.....	16
3.9. Análisis de imagen.....	17
4. RESULTADOS	18
4.1. Optimización del método de fijación para el modelo de piel.	18
4.3. Impacto de la suplementación del medio con vitamina C en la maduración de la dermis.	20
4.4. Optimización del medio de cultivo para la maduración del modelo de piel.....	22
4.5. Determinación de la viabilidad celular en el modelo de dermis post-impresión.	23
4.6. Caracterización del modelo de piel humana bioimpreso en 3D	24
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	32
BIBLIOGRAFÍA	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La piel: Características generales y organización.

La piel es el órgano más grande del cuerpo y es la principal barrera de protección frente al entorno. Desempeña funciones que resultan esenciales para la protección y correcto funcionamiento del organismo. Entre ellas destaca la labor de protección frente a agentes externos como patógenos, luz ultravioleta y la deshidratación. Además, también participa en la regulación de la temperatura, mediante la producción de sudor; en la percepción de estímulos táctiles, mediante los distintos receptores sensoriales que contiene; o en la cicatrización y regeneración. Cuando se produce una lesión en la piel, el proceso de curación involucra una secuencia de eventos fisiológicos, que incluyen la coagulación, la formación de tejido de granulación, la regeneración de la epidermis y la reorganización de la matriz extracelular.

La piel está dispuesta en tres capas principalmente: la hipodermis, la dermis y la epidermis (Figura 1).

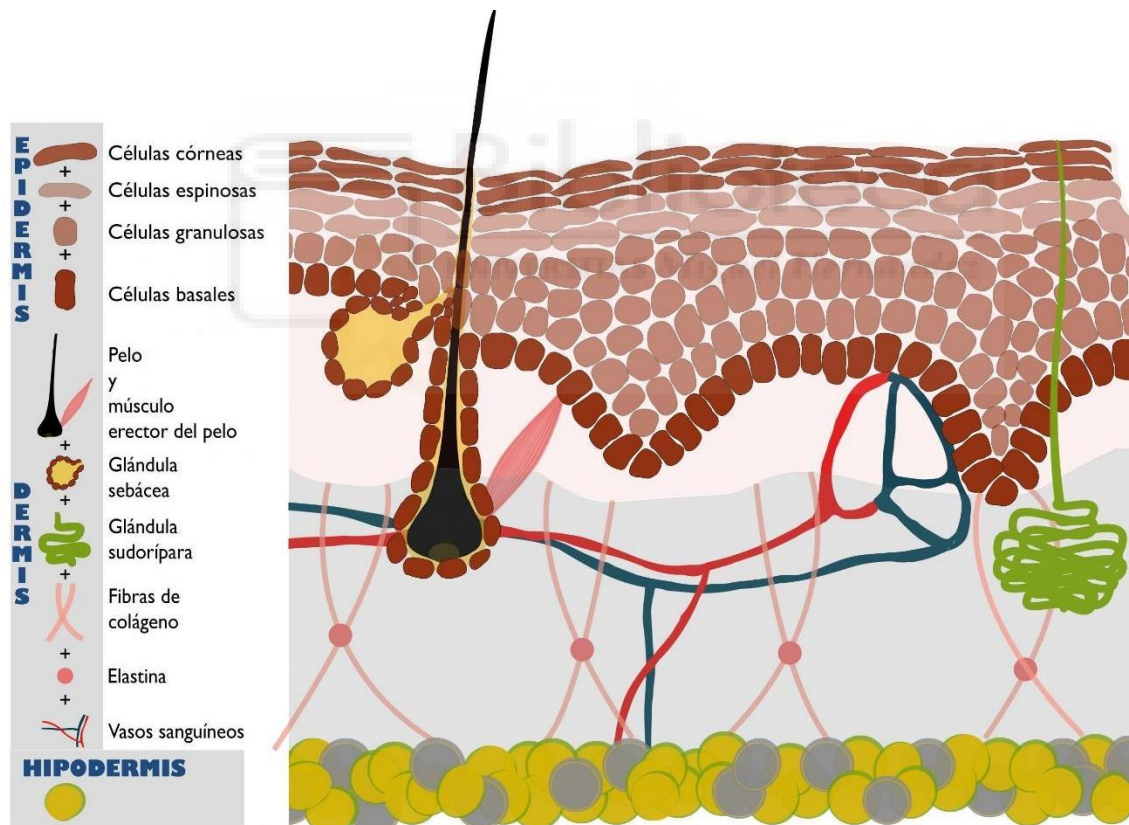


Figura 1: Estructura de la piel. Se pueden apreciar los tres estratos principales: Hipodermis, dermis y epidermis. En la dermis se encuentran, además de fibroblastos, diversas proteínas como la elastina o el colágeno, así como los distintos apéndices de la dermis, entre los que destacan las glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas y los folículos pilosos. Por su parte, la epidermis se encuentra segmentada en 4 capas principales: basal, granulosa, espinosa y córnea. Imagen obtenida de <https://isabelmayoral.es/>

1.1.1. Hipodermis

La hipodermis es la capa más interna de la piel, se encuentra directamente debajo de la dermis y conecta la piel con tejidos subyacentes. El contenido de esta capa es eminentemente graso, pues contiene mayormente adipocitos, aunque también vasos sanguíneos y nervios. Además de mantener las propiedades mecánicas y termorreguladoras [1], también respalda la proliferación de queratinocitos y fibroblastos [2, 3] y la cicatrización de heridas.

1.1.2. Dermis

A continuación, encontramos la dermis, un tejido conectivo, que a su vez está dividido en dermis papilar, en la parte más externa; y dermis reticular, en la más interna (Figura 2). La dermis es una capa esencial de la piel que proporciona estructura y soporte. En cuanto al contenido celular, la principal línea celular de este estrato son los fibroblastos. Los fibroblastos son células inmaduras que proporcionan una estructura basal a la piel. Entre sus funciones principales encontramos la locomoción, producción de fibras de colágeno y elastina, y la regulación y degradación de la matriz extracelular (MEC) [4].

1.1.2.1. Matriz extracelular.

a) Proteínas de la matriz extracelular.

Dentro de la compleja estructura de la piel, se encuentra un elemento clave: la matriz extracelular. Se trata de una estructura presente en todas las capas de la piel, desde la dermis, hasta la hipodermis más profunda. Pese a ello, es notablemente más abundante en la dermis. La MEC participa en el soporte estructural, la resistencia y elasticidad, la comunicación y la migración celulares principalmente [5]. La forman diversas macromoléculas y proteasas, como fibrina, fibronectina, vitronectina, proteoglicanos o glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico, siendo el colágeno y la elastina sus principales componentes (Figura 2).

Las proteínas de colágeno son las más abundantes de la MEC. Son proteínas compuestas por una triple hélice y con diversas funciones, que incluyen la adhesión y migración celular. Además, contribuyen a la estructura y morfología del tejido. Se han identificado 28 tipos de colágeno, pero los más abundantes son el de tipo I (80% del total) y el de tipo III (15% del total), los cuales son responsables del mantenimiento de la estructura de la piel [5] [6].

b) Unión dermis-epidermis.

Como parte esencial de la MEC, encontramos la unión dermis-epidermis. Esta sección separa ambas capas de la piel, asegurando la integridad estructural y el anclaje de las mismas. Entre sus funciones

destaca el control del paso de moléculas de una capa a otra, dependiendo del tamaño y la carga de estas. Además, influye en el comportamiento de los queratinocitos modificando la polaridad celular. Esta función es clave en procesos de cicatrización de heridas y remodelación cutánea. Una de las proteínas que se expresa en esta unión es el **colágeno VII** [7].

1.1.2.2. Otros elementos de la dermis.

Esta capa también se encuentra irrigada por vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas. Además, contiene distintos apéndices que dotan a la piel de diversas funcionalidades, como la termorregulación, la osmorregulación, el control del agua corporal, la excreción de sustancias de desecho o el mantenimiento y lubricación de la piel y el cabello mediante la excreción de sebo [1]. Estos apéndices varían en función de la especie y en el caso de la piel humana, encontramos folículos pilosos, glándulas sebáceas, y glándulas sudoríparas (Figura 1). Cada folículo piloso se conecta a un músculo erector del pelo, que, además de permitir al animal dar una advertencia social en respuesta a la agresión, también coloca los pelos fuera de la superficie de la piel para permitir la refrigeración térmica, al crear una capa de aire entre los pelos y la piel, lo que ayuda a disipar el calor del cuerpo [8]. En cuanto al sistema inmunitario, la dermis es capaz de ser alcanzada por gran variedad de células, incluyendo células dendríticas, macrófagos, células NK, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos B y T y plaquetas [9].

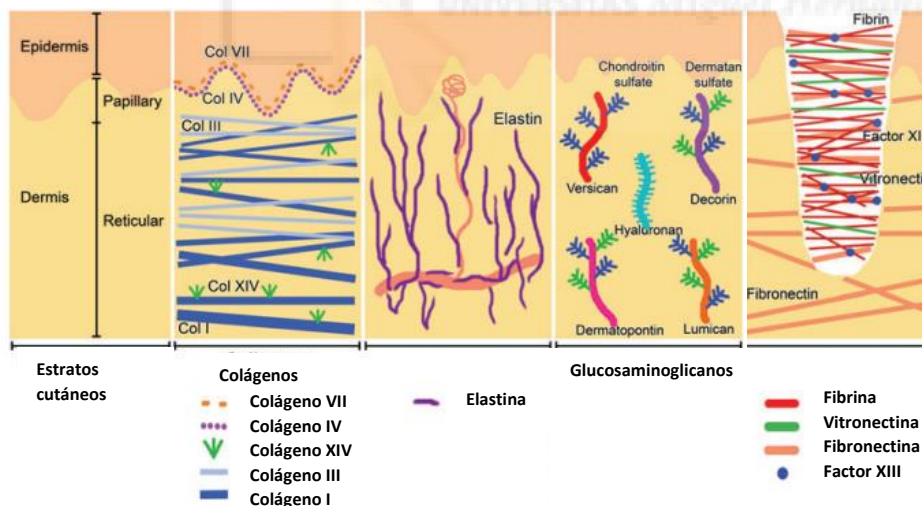


FIGURA 2: Estratificación de la dermis y diferentes proteínas de la matriz extracelular (MEC). La dermis está dividida en dos niveles: reticular y papilar. Las proteínas más representativas de la dermis son el colágeno y la elastina, pero también encontramos otras como la fibrina, fibronectina o vitronectina. No solo hay proteínas en la dermis, sino que también están presentes glucosaminoglicanos como el ácido hialurónico. Estos polisacáridos tienen la función de servir como soporte para las proteínas estructurales como el colágeno o la elastina. Imagen modificada de *Tracy et al.* [6].

1.1.3. Epidermis

1.1.3.1. Estructura

Por último, encontramos la capa más externa, la epidermis. Se trata de un epitelio escamoso estratificado. La epidermis contiene una capa basal con células proliferativas, los queratinocitos. Se trata de células con capacidad de diferenciarse, formando así las diversas capas de la epidermis. La capa basal está compuesta por queratinocitos y proteínas de la matriz extracelular, así como factores de crecimiento, que permiten a los queratinocitos mantener esta capacidad proliferativa. En esta capa se aprecia expresión de proteínas tales como la **citoqueratina 15** o la **integrina $\beta 1$** . Esta última es de especial relevancia, pues participa en funciones como la diferenciación queratinocítica y el mantenimiento de la integridad de los folículos pilosos [10].

Los queratinocitos son capaces de separarse de la membrana basal e iniciar un proceso de diferenciación que dará lugar al resto de capas de la epidermis: La capa espinosa, granular y el estrato córneo. Los queratinocitos se diferencian a medida que avanzan a capas más externas, debido a la interfaz aire-líquido hasta alcanzar el estado de corneocitos, células anucleadas llenas de proteínas pertenecientes a la familia de las queratinas [1]. El resultado es una barrera molecular impenetrable que excluye a los microbios dañinos y protege contra la pérdida de líquidos. La capa superior, el estrato córneo, es continuamente reemplazada por nuevos corneocitos, permitiendo así que se mantenga la función de barrera. En esta capa se expresan algunas proteínas tales como la **filagrina** y la **involucrina** [11].

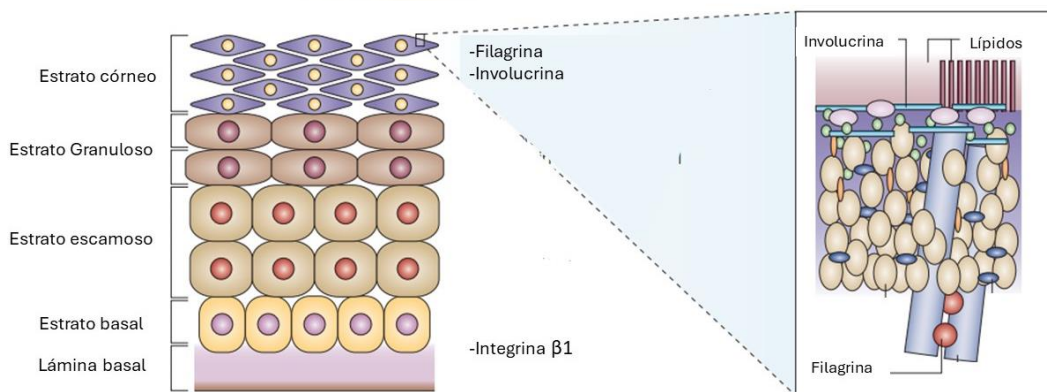


FIGURA 3: Capas de la epidermis. Los queratinocitos inmaduros que se encuentran en el estrato basal se diferencian formando las 4 capas principales de la epidermis: Basal, escamosa, granulosa y el estrato córneo. En esta última capa, las células se aplanan y pierden el núcleo. En este estado celular se denominan corneocitos. Los corneocitos se rodean de una envoltura celular cornificada, que consta de proteínas y lípidos asociados. La estratificación de la epidermis se puede apreciar también una expresión diferencial de proteínas. En la capa basal se expresan proteínas tales como la integrina $\beta 1$, mientras que en el estrato córneo se encuentran la integrina y la filagrina. Imagen modificada de *Candy et al.* [12].

1.1.3.2. Queratinocitos

El tipo celular predominante en la epidermis son los queratinocitos, los cuales se encuentran nucleados y viables desde la capa basal hasta la granular. Los queratinocitos producen y expresan diferentes proteínas estructurales y lípidos a medida que maduran.

Durante su diferenciación, los queratinocitos experimentan cambios estructurales, transformándose en células escamosas, planas y anucleadas del estrato córneo. Estas células se denominan corneocitos y presentan filamentos de queratina y se encuentran rodeadas por una capa de proteínas y lípidos, la envoltura cornificada. La envoltura celular cornificada es una fuerte estructura polimérica proteico-lipídica que se forma justo debajo de la membrana citoplasmática y cubre el exterior de los corneocitos (Figura 3). Las capacidades biomecánicas de dicha envoltura se ven reforzadas por la reticulación de determinadas proteínas estructurales como la involucrina [13].

Los desmosomas, que conectan los queratinocitos, desempeñan un papel crucial en la cohesión celular en las capas nucleadas y se desprenden durante el proceso de descamación. El proceso de descamación epidérmica ha de estar en equilibrio con el proceso de proliferación y diferenciación queratinocítica, permitiendo la renovación completa de la piel en un periodo aproximado de 28 días [14].

Además de su papel estructural en la epidermis, los queratinocitos también desempeñan funciones inmunológicas importantes y están implicados en la reparación de la piel después de lesiones o heridas. Su capacidad para producir citoquinas y otras moléculas señal, realza su importancia en la respuesta inflamatoria, así como en la modulación de la cicatrización de heridas.

1.1.3.3. Otros tipos celulares en la epidermis

Otro punto a destacar de la epidermis es que posee una microbiota rica y diversa que podría ser beneficiosa para el microambiente de la piel [1]. Además, la epidermis no solo contiene queratinocitos, sino que también alberga melanocitos y células del sistema inmunitario tales como: células dendríticas, células NK y linfocitos T [9].

1.2. Modelos de piel 3D bioimpresa

El completo entendimiento y comprensión de la morfología y estructura de nuestra piel es clave para el desarrollo, mediante ingeniería de tejidos, de modelos de piel *in vitro*. Los primeros modelos de piel construidos *in vitro*, estaban caracterizados por una estructura en dos dimensiones, que no replicaba de manera correcta el entorno de la piel [15]. Posteriormente aparecieron los modelos en 3D en los

que se utilizan hidrogeles compuestos por proteínas de MEC o derivados de estas proteínas, consiguiendo un entorno estratificado en dermis y epidermis, en el cual ambas capas son capaces de interactuar entre ellas.

Con el fin de mejorar la morfología e implementar una estructura más fiel a la realidad, la bioimpresión 3D emerge como una potente herramienta para aumentar la precisión y la reproducibilidad en la generación de tejidos *in vitro* [16]. Actualmente se pueden encontrar diversas estrategias de bioimpresión 3D entre las que destacan la bioimpresión por extrusión en la que el sistema es accionado por un pistón mediante una aplicación de presión por parte de una bomba, la bioimpresión por dispensación de gotas (*inkjet bioprinting*) y la bioimpresión asistida por láser.

1.2.2. Hidrogeles biocompatibles para el desarrollo de la dermis.

Para el desarrollo de un modelo de piel, es crucial elaborar una matriz extracelular, que aporte una estructura tridimensional y los componentes necesarios para crear el ambiente adecuado para la maduración de la dermis. Generalmente están constituidos por proteínas y otras macromoléculas de la MEC. En la tabla 1 se pueden observar las composiciones básicas de los distintos tipos de hidrogeles que han sido estudiados en este trabajo con el fin de obtener el mejor soporte para el modelo de piel *in vitro*.

Tabla 1. Composiciones de hidrogeles para bioimpresión 3D.

Composición del hidrogel	Método de gelificación	Referencias
Colágeno	Calor	Lee et al. [16](3 mg/mL); Kim et al. [17]; Lee et al. [16] (2%)
GelMa	UV	Levato et al. [18] (10%)
Alginato	Químico (Ca ²⁺)	Gao et al. [19] (2-5%) ; Zhang et al. [20] (3-5%)
Alginato / Gelatina	Químico (Ca ²⁺)	Pourchet et al. [15] (0,5% alginato/10% gelatina); Huang et al. [21] (4% alginato/ 20% gelatina)
GelMa/Gelatina	Calor + UV	Yin et al. [22] (5% GelMa/ 8% gelatina)

a) *Colágeno*

El colágeno es la proteína mayoritaria de la MEC. Este material ha sido comúnmente utilizado para la bioimpresión 3D de tejidos, debido a su alta biocompatibilidad y su baja inmunogenicidad. Sin embargo, las propiedades mecánicas de este hidrogel son limitadas [23]. En cuanto a la gelificación de este material, se da por la variación de temperatura. Comienza a gelificar en temperaturas cercanas a 15 ° C, llegando a su máxima estabilidad a una temperatura de 37 ° C [17]. Esto supone una gran ventaja, pues es la temperatura a la que se mantienen los cultivos celulares humanos. Habitualmente el colágeno es de fuente animal, incluyendo colágeno murino, porcino o bovino. La desventaja del colágeno es su fuerte contracción.

b) *Gelatina y alginato*

La gelatina es un componente frecuente en este tipo de hidrogeles. Se trata de un producto de la hidrólisis del colágeno, una proteína de MEC común para todos los mamíferos. La gelatina tiene un punto de gelificación entre 25° C y 30° C consiguiendo que se consolide de forma rápida. Pese a ello, cuenta con un inconveniente, ya que se licúa a la temperatura de 37°C, necesaria para el mantenimiento habitual de cultivos celulares. Por su parte, el alginato, a diferencia del resto de materiales estudiados, no se trata de una proteína de la MEC, sino de un polisacárido que, en presencia de calcio, es capaz de formar un andamio para el crecimiento celular. La estrategia de fijación a seguir en este tipo de hidrogeles consta de una fijación doble. Por una parte, se da una fijación rápida y reversible de la gelatina a una temperatura cercana a los 25°C. Tras ello, se eleva la temperatura y se añade una solución que contiene Ca^{2+} . De esta manera, el alginato se consolida, mientras que la gelatina se licúa al alcanzar los 37 °C.

c) *GelMa y gelatina*

Otro material con el que la gelatina es frecuentemente combinado es el GelMa. Se trata de una variación de la gelatina, que contiene el 50% de sustituyentes de metacrilóilo, que le aportan a este hidrogel sus capacidades físicas distintivas. Este gel, junto con un fotoiniciador, tiene la capacidad de formar reticulados cuando es expuesto a luz UV. Es crítico fijar la concentración adecuada de GelMa, ya que a bajas concentraciones (<5% p/v) es incapaz de mantener la estructura, y a concentraciones altas (>15% p/v) se reduce de manera drástica la viabilidad celular [22].

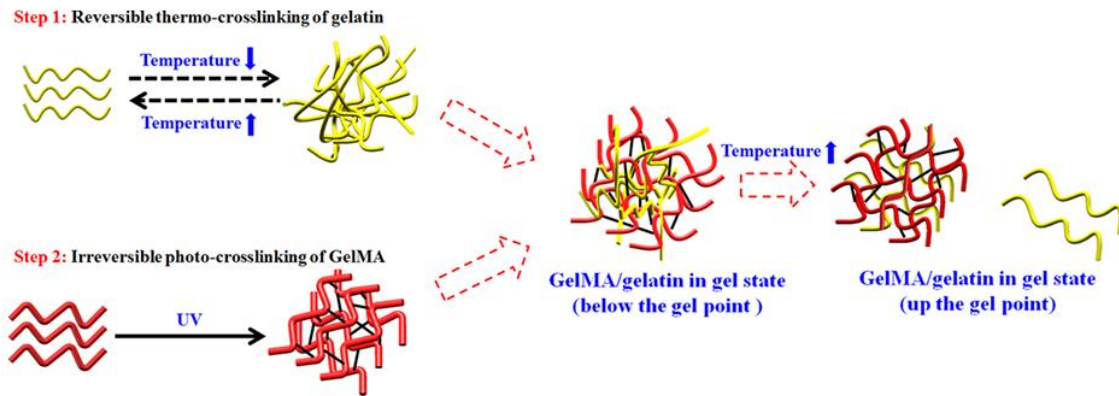


Figura 4: Doble fijación de una biotinta de gelatina t GelMa. En primer lugar, se da una fijación reversible por temperatura de la gelatina. Tras ello, se produce una fijación irreversible del GelMa gracias a la luz UV. Al aumentar la temperatura, la gelatina se licúa, saliendo del hidrogel. *Yin et al* 2018 [22].

Con la combinación de gelatina y GelMa, se consigue un hidrogel con un entrecruzamiento en dos pasos: en primer lugar el entrecruzamiento rápido y reversible de la gelatina, por un descenso en la temperatura al salir del extrusor y quedar en contacto con la superficie sobre la que se imprime (que normalmente se encuentra refrigerada); y en segundo lugar un entrecruzamiento lento e irreversible del GelMa, debido a la formación de enlaces covalentes entre los sustituyentes de metacrilóilo, mediado por el fotoiniciador que se activa por la radiación con una luz UV.

En consecuencia, cuando se deposita el hidrogel tiene elevada consistencia, de manera que puede mantener la estructura inicial propuesta hasta que se dé su entrecruzamiento permanente. Una vez finalizado el constructo, este se incuba a 37° C, temperatura superior a la temperatura de fusión de la gelatina, por lo que esta se vuelve líquida, dejando así poros que facilitan la entrada de oxígeno y nutrientes.

El fotoiniciador es el componente clave para la técnica de entrecruzamiento por UV. Como principales fotoiniciadores se encuentran el litiobenzoilfenil-2,4,6-trimetilbencilfosfinato (LAP) y el Irgacure 2959.

En primer lugar, el Irgacure 2959 presenta un espectro de absorción más limitado, siendo la irradiación a 365nm la principal opción, la cual resulta mucho más genotóxica. Además, al incluir este fotoiniciador en el hidrogel, se observó una mayor tasa de degradación del mismo, comparado con el hidrogel que presentaba LAP como fotoiniciador [24].

Por su parte, el LAP cuenta con un espectro de absorción que permite trabajar a longitudes de onda de 405 nm que son compatibles con una alta viabilidad celular. Presenta buena solubilidad en agua y medios de cultivo de base acuosa y proporciona estabilidad y bajo índice de degradación del hidrogel bioimpreso [24].

1.2.3. Modelos de piel bioimpresos en 3D: Parámetros de bioimpresión.

Por lo estudiado en la bibliografía, ya hay evidencias de la posibilidad de crear un modelo de piel mediante bioimpresión 3D. En la bioimpresión por extrusión, el control de los parámetros es clave en la formación del constructo. Los factores a tener en cuenta son varios: temperatura, presión, altura de capa, distancia de relleno, distancia de contorno, velocidad, altura final del constructo, o la punta con la que extruir. La temperatura debe ser la exacta, pues si es demasiado baja, el hidrogel es demasiado sólido y no es extruido y si es demasiado alta, el hidrogel, adquiere una forma líquida y sin consistencia. La presión, debe ser suficiente como para que el hidrogel transite a través de la punta, pero no excesiva, ya que en ese caso se extruye demasiado y no se mantiene la forma deseada [15]. La altura de capa es otro punto a tratar, pues si es demasiado baja, al hacer una capa, la punta del cartucho arrastra la anterior, pero si es demasiado alta, se pierde el control de la estructura.

Según lo observado en la bibliografía, la temperatura variaba en rangos de 15 a 28° C, la presión entre 50 y 300kPa y el diámetro de la punta entre 200 y 260 nm [15, 16, 21, 22].



2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El proyecto del que forma parte este trabajo pretende generar, mediante ingeniería de tejidos y Bioimpresión 3D, un modelo preclínico de piel inervada *in vitro* enfocado en la medicina personalizada, lo que permitirá el testeo de tratamientos dermatológicos, alergias o sensibilidades relacionadas con el sistema nervioso, tales como el prurito.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es la construcción un modelo de piel *in vitro* a partir de biopsias de pacientes humanos, con una dermis y epidermis que se asemejen lo máximo posible a la piel *in vivo*. Para ello los objetivos específicos son:

- Determinación de las condiciones de bioimpresión 3D para el desarrollo del modelo de piel.
- Elección de un método de cultivo adecuado para el mantenimiento del modelo de piel humana.
- Determinación de un método de fijación adecuado para la fijación de las muestras de piel humana y del modelo de piel para su posterior caracterización.
- Caracterización de modelo de piel mediante técnicas de tinción e inmunohistoquímicas.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Líneas celulares

Las células son obtenidas a partir de biopsias de piel que son proporcionadas por el Hospital General de Elche. Estas biopsias son recibidas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con 2% p/s (penicilina/estreptomicina) y son tratadas para separar la dermis y epidermis, de tal manera que se extraen fibroblastos y queratinocitos. Los fibroblastos son cultivados en un medio que contiene DMEM, 10% FBS (suero bovino fetal) y 1% p/s. Por otra parte, para los queratinocitos se utiliza un medio comercial sobre un revestimiento de colágeno (8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). En ambas líneas celulares, el cambio de medio se realizó 3 veces por semana. Cuando la confluencia superaba un 90%, se dio pase a las células mediante su incubación con tripsina-EDTA 0,25%. Las células se mantienen en un incubador a 37° C y 5% de CO₂.

3.2. Hidrogel

El hidrogel utilizado consta de GelMa (Cellink) al 5% p/v y gelatina comercial proveniente de piel porcina (Sigma Aldrich) al 8% p/v. El fotoiniciador utilizado es litiobenzoilfenil-2,4,6-trimetilbencilfosfinato (LAP) al 0,5% p/v. El LAP y GelMa (Cellink) liofilizados, se prepararon siguiendo las indicaciones de la casa comercial, añadiendo la gelatina en polvo a la concentración deseada. Brevemente, el LAP se disuelve en PBS 1X estéril, al 0,5% p/v. El GelMa y la gelatina en polvo se resuspenden con la solución con LAP a razón de 5% y 8% respectivamente, manteniendo la mezcla durante 1 hora a 60 °C hasta obtener una solución homogénea y sin burbujas. Tras la preparación, el hidrogel se mantiene a 37 °C hasta que se requiera su uso

3.4. Parámetros de bioimpresión 3D

Los parámetros empleados para la bioimpresión (**Bioscaffolder 3.3, GeSIM**) del modelo fueron determinados mediante prueba y error. Se utilizó un rango de temperaturas entre **24 y 30 ° C** y una presión entre **100 y 150 kPa**. La altura de capa se fijó en **0,6 mm, con una punta de 250 μm** . Para la consolidación del GelMa se expuso el constructo a luz UV (405 nm) durante 10 segundos tras cada capa de bioimpresión y de 120 segundos tras la finalización de la totalidad de las capas.

3.5. Desarrollo del modelo de piel humana.

Los fibroblastos (pase 5-7) se sembraron a una densidad de 1 millón de células/mL en el hidrogel sumergidos en medio A con o sin suplemento de vitamina C (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 14 días. Tras ello, se transfirieron a un soporte (Transwell® de la compañía costar (REF 3462)) donde se sembraron los queratinocitos sobre el hidrogel a una densidad de medio millón de células por dermis bioimpresa,

sumergidos en el medio (A, B o C) durante 7 días. Los modelos de piel se cultivaron posteriormente en la interfaz aire-líquido durante otros 14 días en medios suplementados con vitamina C a una concentración de 50 µg/mL y con 1,5 mM de Ca²⁺ (véase la figura 5). Se mantuvo en un incubador a 37° C y 5% de CO₂. Los cambios de medio se realizaron 3 veces a la semana en una cabina, manteniendo condiciones estrictas de esterilidad.

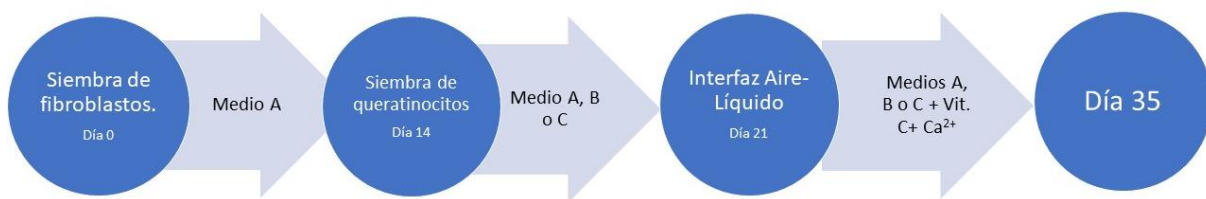


Figura 5: Línea temporal del cultivo del modelo de piel. Tras la bioimpresión del modelo de piel, se trasladó al soporte Transwell®. Durante dos semanas se empleó medio A (especializado en el cultivo de fibroblastos). Posteriormente se sembraron los queratinocitos sobre la dermis y se emplearon los medios A, B o C. Tras una semana, se aplicó la interfaz aire-líquido, con el fin de favorecer la diferenciación queratinocítica. Para ello, únicamente se cubrió el pocillo en el que se situaba el soporte hasta la mitad de su capacidad, con los medios A, B o C, esta vez suplementados con Vitamina C y Ca²⁺ para favorecer la diferenciación. El día 35 se recogieron los modelos de piel. En todos los periodos, los medios de cultivo fueron renovados tres veces a la semana.

3.6. Análisis de la viabilidad celular en el modelo de dermis

La viabilidad celular se midió en el día de la impresión y 6 días después de la misma. Con este propósito, las dermis bioimpresas se transfirieron a una solución de Alamar Blue 10% (Invitrogen) en DMEM y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 15-17h. Se midieron los cambios de coloración, asociados con la reducción del sulfuro en las células vivas, mediante espectrofotometría a longitudes de onda de 570 y 600 nm. Para el control negativo de viabilidad celular, se empleó Alamar Blue en ausencia de células.

3.7. Preparación de muestras

El último día de cultivo (Día 35 para modelo de piel o día 14 para modelo de dermis, véase Figura 5), los modelos se recolectaron y se procedió a la preparación de la muestra.

Fijación e inclusión

En este paso se pretende preservar la estructura y composición celular, evitando la degradación de nuestro constructo. En un primer experimento, se probaron dos métodos de fijación:

- Baño de paraformaldehído (PFA) durante 4 días, baño de sacarosa al 15% *overnight* y baño de sacarosa al 30% *overnight* para su posterior inclusión en OCT.

-Congelación instantánea durante 2 minutos con nitrógeno líquido para su posterior inclusión en OCT.

Posteriormente, se lleva a cabo una inclusión en OCT para poder dotar a la muestra de consistencia y preservar su integridad para realizar posteriormente cortes histológicos.

Cortes histológicos

Las muestras incluidas en OCT fueron cortadas en el criostato con un grosor de 7 μm .

3.8. Análisis inmunohistológico

Tras la preparación de las muestras, se llevaron a cabo tinciones mediante inmunofluorescencia.

Tabla 2: Lista de anticuerpos primarios empleados para las tinciones de inmunofluorescencia.

Anticuerpo Primario	Concentración
Citoqueratina 15 (REF: MA1-90926)	1:100
Colágeno I (REF: 20111-1)	1:500
Colágeno III (REF: 60315)	1:250
Colágeno VII (REF: SC-33710)	1:250
Involucrina (REF: SC-21748)	1:250
Integrina β 1 (REF: SC- 13590)	1:100
Filagrina (REF: SC- 66192)	1:500

En las muestras incluidas en OCT, se lleva a cabo un secado a temperatura ambiente durante un mínimo de una hora. Después, se procede a fijar la muestra en acetona o etanol a una temperatura de -20°C . El siguiente paso es el bloqueo de antígenos, el cual se lleva a cabo en un baño de 1 hora en PBS-BSA 4%-NGS 5%. El objetivo de este paso es el bloqueo de los antígenos que no son de nuestro interés, de esta manera el anticuerpo primario no se unirá, evitando falsos positivos.

A continuación, se aplica el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA 4%-NGS 5%, dependiendo la dilución del anticuerpo seleccionado (Tabla 2). Tras ello, se incubaron entre 16-24 horas a 4°C.

Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo acoplados al fluorocromo Alexa 488 (1:500 o 1:100) o Alexa 568 (1:500) (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los núcleos se visualizaron con tinción de Hoechst (1:1000) que se une al ADN de las células por intercalación y emite fluorescencia azul cuando se exponen a luz ultravioleta.

El último paso fue preparar los portaobjetos para su posterior observación bajo el microscopio de fluorescencia. Una vez las muestras se encontraban montadas, se guardaron en oscuridad hasta su estudio mediante microscopio de fluorescencia. La adquisición de imágenes se realizó con el microscopio Axio Observer (ZEISS).

3.9. Análisis de imagen

El tratamiento y el análisis de las imágenes se realizaron con el programa Fiji (Research Service Branch, US National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Se midió la densidad celular in dermis: Se contaron las células dérmicas y se expresaron como porcentaje relativo al área dérmica total analizada. Para el colágeno I y el colágeno III, se midieron las superficies cubiertas por la tinción y se expresaron como porcentaje relativo al área dérmica total analizada.

4. RESULTADOS

4.1. Optimización del método de fijación para el modelo de piel.

Uno de los métodos clásicos para caracterizar la piel en 3D es la inmunotinción. Para el corte histológico del modelo de piel *in vitro* es esencial realizar una fijación previa. El primer objetivo consistió en evaluar técnica de fijación que mejor preserva la estructura y las proteínas de la piel para la inclusión en OCT. Se evaluarán dos métodos: i) una fijación en PFA y posteriores baños de sacarosa, y ii) una fijación en nitrógeno líquido. En las fases iniciales de la optimización, los modelos de dermis se obtuvieron manualmente. La fijación se realizó en modelos de dermis que contienen fibroblastos humanos primarios en el hidrogel GelMa/Gelatina tras 14 días de cultivo. En el primer caso, se hizo pasar la muestra por un baño de PFA y posteriormente por sucesivos baños de sacarosa al 15% y 30%. En el caso de la fijación por congelación instantánea, se sumergieron las muestras en un tanque de nitrógeno líquido durante 2 minutos, para después incluirlos, igualmente, en OCT.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, el hidrogel empleado conlleva una fijación doble, en primer lugar, una fijación de la gelatina a baja temperatura, y en segundo lugar una fijación del GelMa gracias a la luz UV. Cuando el GelMa ya está consolidado, se eleva la temperatura a 37°C y la gelatina se licúa, dejando huecos en el hidrogel, que también son característicos de la piel humana. Visualmente, en un contraste claro, se pudo observar bajo el microscopio que las muestras fijadas con una congelación instantánea empleando nitrógeno líquido, presentaban una morfología más uniforme y definida, manteniendo esta porosidad típica de la dermis. Sin embargo, la muestra fijada con PFA, muestra una morfología menos definida, y los poros de la dermis ya no son apreciables (véase figura 6D).

Para evaluar el impacto de la fijación sobre las proteínas, se realizó una inmunotinción del colágeno I y III y los núcleos se marcaron con un marcador de los núcleos celulares (Hoechst). Tal y como se puede observar en la figura 6, las muestras en las que se empleó una congelación instantánea con nitrógeno líquido presentaron una densidad celular de $0,63 \pm 0,24$ células/mm². Por su parte, las muestras en las que se empleó una fijación de PFA y sacarosa, presentaron una densidad celular bastante inferior, de $0,32 \pm 0,09$ células/mm². Respecto a la superficie de colágeno I, las muestras tratadas con nitrógeno líquido, quintuplicaron la cantidad de esta proteína presente en la dermis. Por su parte, la tinción para el colágeno III, también ofreció unos resultados destacados. La presencia de colágeno III en las muestras tratadas con nitrógeno líquido fue más de 20 veces superior a la encontrada en las muestras fijadas con PFA y baños de sacarosa.

Por lo tanto, es evidente que las muestras fijadas por congelación instantánea en nitrógeno líquido presentan un mayor número de células/mm² así como una mayor superficie de colágeno I y III en

relación con la superficie dérmica, lo que permite concluir que este método ofrece una mayor conservación de la integridad del tejido. Por lo tanto, fue este método el seleccionado para posteriores tinciones de inmunofluorescencia.

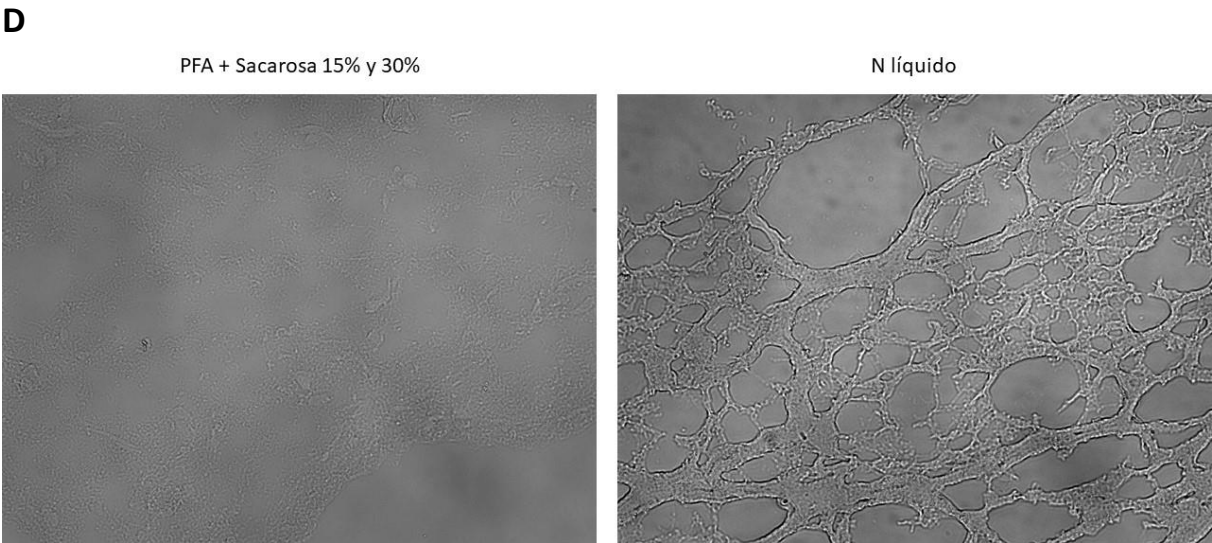
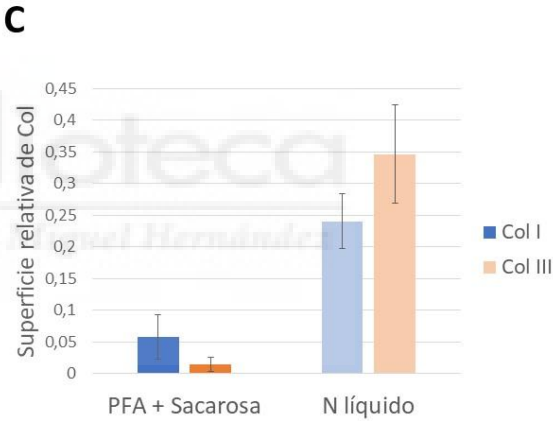
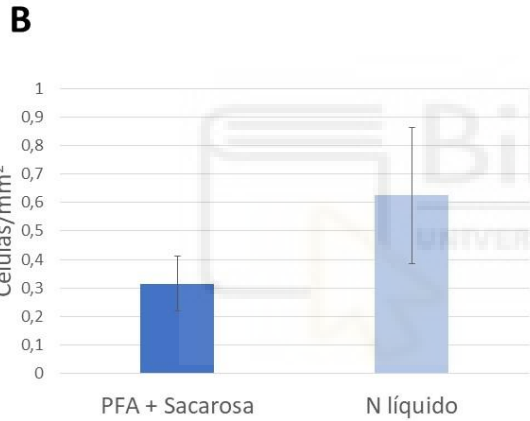
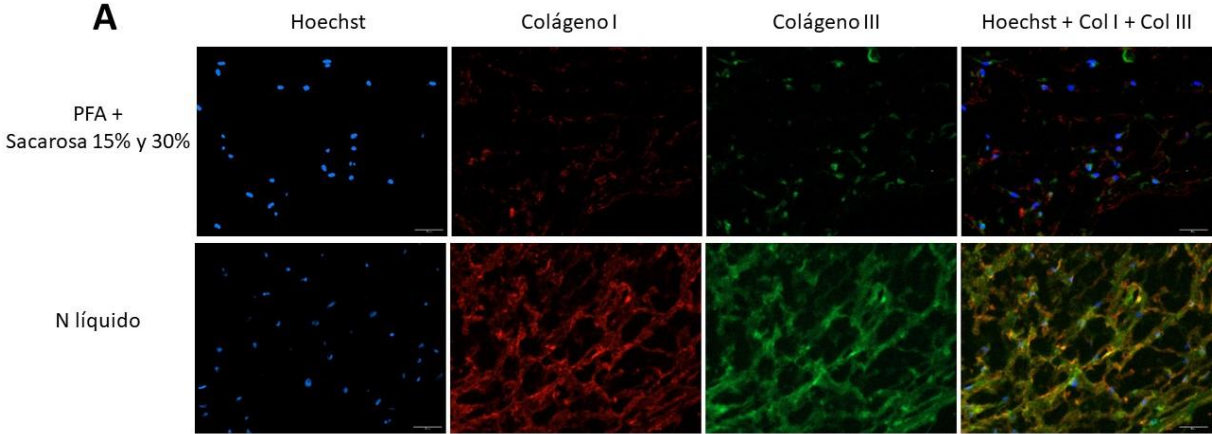


Figura 6: Determinación del método de fijación. Modelo de dermis con fibroblastos humanos en un hidrogel de GelMa/Gelatina después de 14 días de cultivo, fijadas con PFA seguido de un baño de sacarosa (15% y luego 30%) o 2 min en nitrógeno líquido antes de su inclusión en el OCT. A: Imágenes tomadas tras la tinción de los núcleos celulares con Hoechst (1:1000) y tinción de inmunofluorescencia con anticuerpos primarios para el colágeno I (1:500) y colágeno III (1:250) para ambos modelos de fijación. En rojo se observa la presencia de colágeno I y en verde la de colágeno III. B: Comparativa entre las densidades celulares (células/mm²) de los constructos fijados por ambas estrategias. Se aprecia una mayor densidad celular en el método de fijación por congelación instantánea en N líquido. C: Comparativa entre las superficies relativas de colágeno I y III (mm² con presencia de colágeno /mm² totales dérmicos) de los constructos fijados por ambas estrategias. La presencia de ambas proteínas es mayor en el método de fijación con N líquido. D: Comparativa entre la morfología de la muestra fijada por PFA y sacarosa con la fijada con N líquido. Esta última conserva mucho mejor su morfología, ya que se pueden observar trazos claros que dibujan los huecos característicos de la dermis. (n=3). Escala: 50 μm

4.3. Impacto de la suplementación del medio con vitamina C en la maduración de la dermis.

A la hora de desarrollar modelo de piel *in vitro*, la elección del medio de cultivo es esencial. En primer lugar, analizamos el impacto de la adición de vitamina C al medio de cultivo sobre la maduración dérmica. La vitamina C es un componente muy abundante en la piel humana y presenta numerosos beneficios entre los que destaca un incremento en la producción de proteínas estructurales tales como el colágeno. Como el propósito de este trabajo es crear una construcción que se asemeje a la piel humana, se quiso probar el efecto de la suplementación con vitamina C del medio con el que se mantiene el modelo de piel tras la bioimpresión. La concentración propuesta fue de 50 μg/mL de medio de cultivo. El propósito de este experimento fue ver el impacto de la vitamina C en la dermis, por lo que al final del cultivo de la dermis (Día 14), se recogieron los modelos y, tras la preparación de la muestra, se realizó una tinción con la intención de ver el efecto de la vitamina C sobre el número de células/mm² y en la expresión de colágeno I y III. De nuevo, se utilizó la tinción de Hoechst para marcar los núcleos celulares y anticuerpos específicos para el colágeno I y III con el fin de detectar dichas proteínas.

Los modelos de piel cultivados con un medio suplementado con vitamina C, duplicaron la densidad celular de aquellos cultivados con un medio sin suplementación ($0,63 \pm 0,24$ células/mm² frente a $0,34 \pm 0,1$ células/mm²).

Respecto a la presencia de colágeno I, las muestras tratadas con un medio suplementado con vitamina C, presentaron una superficie relativa de colágeno I de $0,24 \pm 0,04$, mientras que aquellas que se cultivaron sin presencia de vitamina C, obtuvieron una superficie relativa de colágeno I de $0,04 \pm 0,02$.

Si bien estas diferencias ya resultan bastante evidentes, se acentúan más cuando se trata del colágeno III, que en el medio suplementado con vitamina C, llega a multiplicar por 10 su presencia frente al medio no suplementado ($0,35 \pm 0,08$ frente a $0,03 \pm 0,01$).

Los resultados evidenciaron el impacto positivo de la suplementación del medio de cultivo tanto en la densidad celular como en la presencia de proteínas de la dermis (colágeno I y colágeno III). Debido a los beneficios experimentados en la dermis, posteriores experimentos se llevaron a cabo con una suplementación de vitamina C de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ en el medio de cultivo.

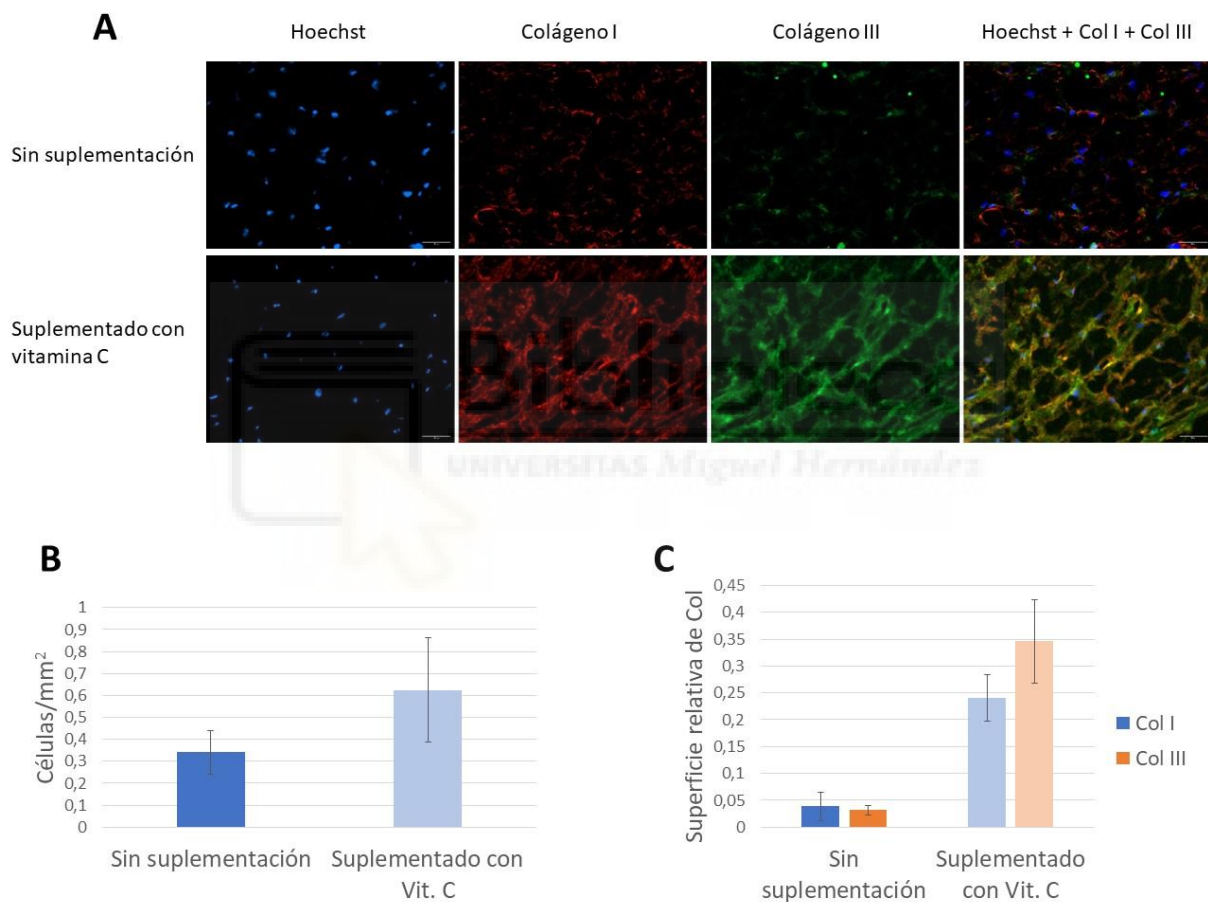


Figura 7: Impacto de la suplementación con vitamina C en el medio de cultivo. Modelo de dermis con fibroblastos humanos en un hidrogel de GelMa/Gelatina después de 14 días de cultivo, con medio con o sin suplementación de vitamina C. Los cambios de medio se realizaron 3 veces por semana. A: Tinción de los núcleos celulares con Hoechst (1:1000). En rojo se muestra la tinción de colágeno I (1:500) y en verde el colágeno III (1:250) para los constructos cultivados en medio con y sin vitamina C. B: Comparativa entre las densidades celulares (células/mm²) en ambas estrategias. La densidad en el medio suplementado es mayor. C: Comparativa de la superficie relativa de colágeno I y colágeno III (mm² con presencia de colágeno I/mm² totales dérmicos) en ambas estrategias (n=3). Escala: $50 \mu\text{m}$

4.4. Optimización del medio de cultivo para la maduración del modelo de piel.

Se evaluó el medio de cultivo para la maduración de los modelos de piel humana, en particular, el desarrollo de una epidermis madura diferenciada. Se obtuvieron modelos de piel tras 35 días de cultivo: 14 días de maduración de la dermis, 7 días de inmersión con queratinocitos y, por último, 14 días en la fase de interfaz aire-líquido. Los tres medios se pusieron a prueba durante los últimos 21 días de cultivo, etapa de proliferación y diferenciación de los queratinocitos, fueron: Medio A (Medio de cultivo basal para fibroblastos humanos), medio B (medio basal de cultivo sin suero de queratinocitos definidos), medio A:B (50% medio A y 50% medio B) y medio C (medio especializado para la diferenciación de tejido epitelial). En un primer momento, el objetivo de este experimento era determinar la influencia del medio de cultivo en los queratinocitos, pero no se pudo observar debido a pérdidas de material a través del soporte.

Sin embargo, se observó una inesperada diferencia significativa en la concentración de fibroblastos. Con el medio C no se pudo apreciar proliferación celular en el constructo. Con los medios especializados en fibroblastos y queratinocitos, pudimos observar que las células proliferaron en nuestro modelo, con concentraciones de 0,84 células/mm² y 0,528 células/mm² respectivamente. Sin embargo, el **mejor resultado se obtuvo con el medio mixto A:B**, es decir, 50% medio A y 50% medio B, con una densidad celular de 1,916 células/mm², demostrando así, ser el medio de cultivo más adecuado para el desarrollo del modelo de piel *in vitro*, y por tanto el que se utilizó en experimentos posteriores.

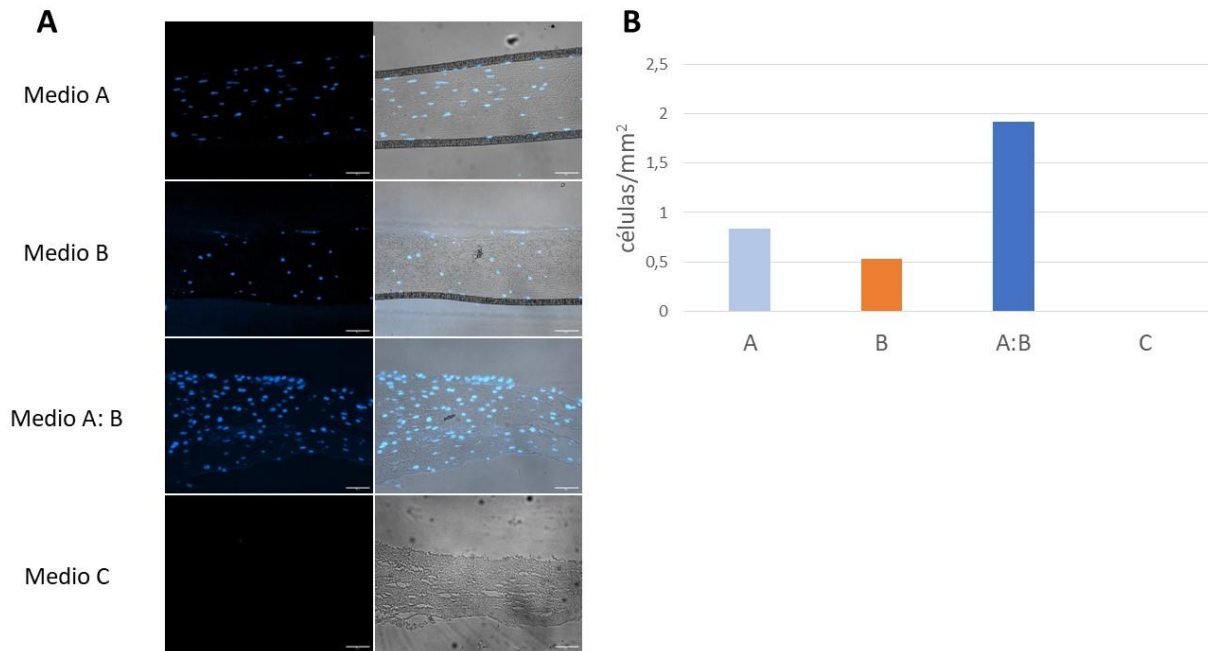


Figura 8: Determinación del medio de cultivo. Modelos de piel después de 35 días de cultivo con medio A, B, A:B o C durante los 21 últimos días. A: Imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia de cada constructo incluido en los respectivos medios de cultivo, en la que se muestran los núcleos celulares en color azul, gracias a la tinción de Hoechst (1:1000). B: Densidades celulares/mm² de los modelos de piel tratados con los medios A, B, A:B y C. Los medios fueron empleados desde el día de la bioimpresión hasta el día 35, con cambios de medio 3 veces a la semana en todos los casos (n=1). Escala: 50 μ m

4.5. Determinación de la viabilidad celular en el modelo de dermis post-impresión.

Una vez optimizadas las condiciones de cultivo y fijación de la piel reconstruida, se pudo pasar a la fase de bioimpresión. El primer paso es comprobar la viabilidad de las células tras la impresión, ya que el método de extrusión implica aplicar presión al hidrogel, que contiene las células. Este impacto puede ser perjudicial para las células. Para ello se midió la viabilidad celular con una solución de AlamarBlue al 10%. El AlamarBlue es un reactivo que contiene un colorante denominado resazurina. La resazurina, un compuesto de color azul, es metabolizado por las células vivas reduciéndolo a resorfurina, de color rosa intenso. Este cambio colorimétrico es proporcional a la viabilidad celular y se determinó por medida de absorbancia a dos longitudes de onda 570 nm y 600 nm. La viabilidad celular en los modelos de dermis con fibroblastos humanos en el hidrogel GelMa/Gelatina se estudió en dos periodos de tiempo: el día de la bioimpresión y el día 6 tras la bioimpresión.

Se observó un ligero aumento, no significativo, de la viabilidad celular 6 días después de la impresión en la dermis. Este resultado sugiere que las células siguen vivas tras la impresión. Como se ha

comentado anteriormente, el proceso de maduración de la piel tiene una duración de 35 días, por lo que las células continuarán proliferando hasta el dicho momento.

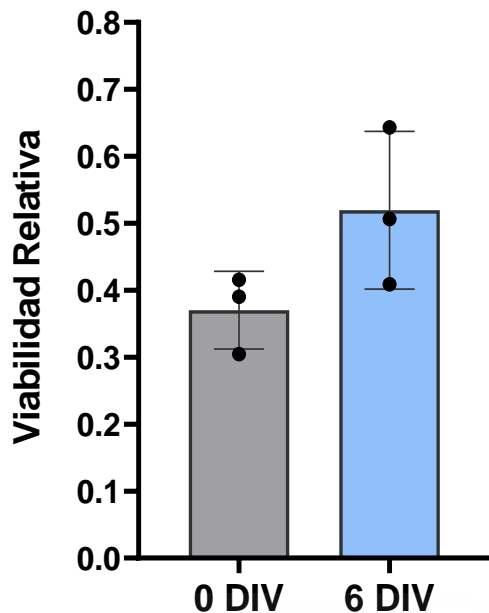


Figura 9: Viabilidad celular en el modelo de dermis bioimpresa. Tras la bioimpresión de los modelos de dermis con fibroblastos humanos en hidrogel GelMa/Gelatina, se transfirieron a una solución de Alamar Blue 10% y se incubó a 37°C y 5% CO² durante 15-17h. Se midió la absorbancia a 570 y 600 nm. El mismo proceso se repitió a los 6 días de la bioimpresión. Para calcular la viabilidad celular, se calculó la diferencia entre la absorbancia a 570 nm y a 600nm, y a esta diferencia se le restó la absorbancia del pocillo correspondiente a la solución de Alamar Blue sin células. n=3 (3 réplicas el día de la medida de Abs); N=3 (3 constructos, 3 días diferentes); Media ± Desviación Estándar; t-student no significativa.

4.6. Caracterización del modelo de piel humana bioimpreso en 3D

La caracterización y validación del modelo de piel pretende determinar si este simula la piel humana. Se realizaron tinciones de inmunofluorescencia en los modelos de piel humanas obtenidas a partir de dermis bioimpresa después de 35 días de cultivo. Con ello, se pretendió demostrar la presencia de una dermis y epidermis maduras en el constructo.

En primer lugar, se trató de demostrar si el modelo de piel era capaz de crear un entorno propicio para el crecimiento celular y, de ser así, como se distribuían estas células en el espacio.

Para ello se empleó la tinción de Hoechst, que marca los núcleos celulares. Tal y como se puede observar en la figura 10 A, se evidencia la presencia de células en nuestro modelo. Además, se puede distinguir una zona con mayor densidad celular (parte alta), correspondiente a la epidermis, y una parte con una densidad celular menor (parte baja), correspondiente a la dermis. Esto es algo que ocurre tanto en las muestras de piel humana, como en el modelo de piel bioimpreso.

La densidad celular en la dermis es menor en el modelo de piel que en la piel humana. Concretamente, la densidad celular en la piel humana es más del doble de la presente en el modelo de piel (Figura 10B). Esto puede venir motivado por la presencia de elementos como vasos sanguíneos en la piel humana, que no se encuentran presentes en nuestro modelo.

En cuanto a la epidermis, también se observan diferencias apreciables en la densidad celular. Las muestras de piel humana presentaron una densidad celular de $2,56 \pm 0,47$ células /mm², mientras que los modelos de piel presentaron una densidad de $1,42 \pm 0,2$ células /mm².

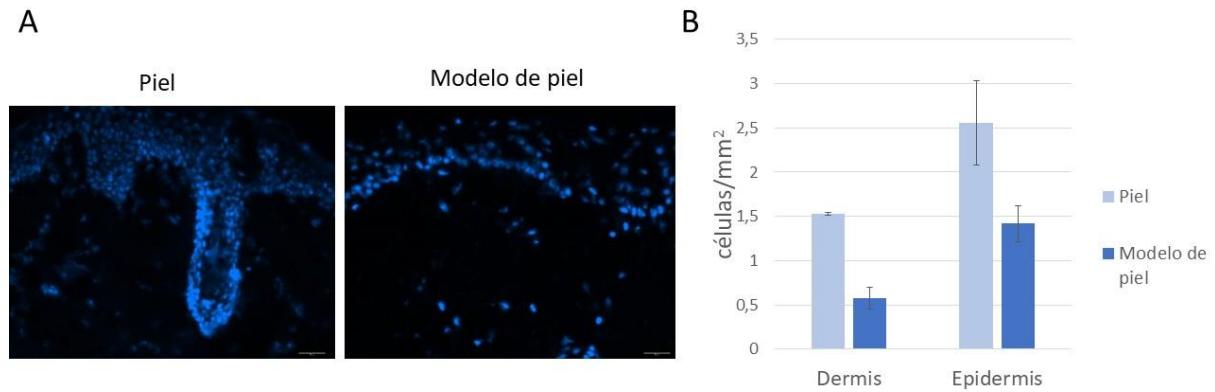


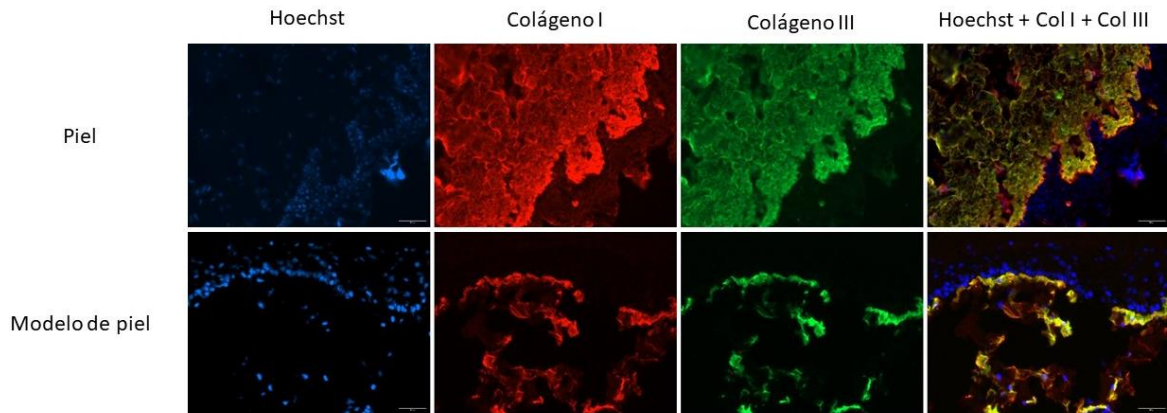
Figura 10: Presencia de células en el modelo de piel. Tinción tras 35 días de cultivo de pieles bioimpresas A: Tinción de Hoechst (1:1000) para una muestra de piel humana y para el modelo de piel. Ambas muestras fueron tratadas de la misma manera, fijación en nitrógeno líquido e inclusión en OCT. En la parte inferior de ambas imágenes se observa una zona que presenta una menor densidad celular, correspondiente a la dermis, mientras que la parte superior, correspondiente a la epidermis, muestra una mayor densidad celular. B: Densidades celulares (células /mm²) de muestras de piel humana y el modelo de piel bioimpreso en 3D. Tanto para la dermis como para la epidermis, se ha tenido en cuenta únicamente la superficie perteneciente a dicho estrato (dermis o epidermis) y las células presentes en el mismo. Tanto en la dermis como en la epidermis, la densidad celular de las muestras de piel es notablemente superior a la del modelo de piel (n=3). Escala: 50 μ m

Para determinar la existencia de una dermis definida, se trató de encontrar las proteínas características de esta sección de la piel. Entre ellas, objetivo de este experimento, fueron proteínas como el colágeno I y III, correspondientes a la dermis propiamente dicha; y el colágeno VII, correspondiente a la unión entre la dermis y la epidermis.

Se pudo observar claramente la presencia de colágeno I y III en nuestro modelo (Figura 11). Si bien, ambas proteínas se encuentran en cantidades inferiores a las presentes en la piel humana (Figura 11B), el hallazgo de estas proteínas en nuestro modelo de piel demuestra la existencia de una dermis. La presencia de colágeno I fue un 34% menor en el modelo de piel, mientras que el colágeno III del modelo de piel, no llegaba a alcanzar la mitad del presente en las muestras de piel humana.

En nuestras condiciones de cultivo, pudimos desarrollar piel humana bioimpresa con una dermis que contenía fibroblastos activos que producían colágeno I y III.

A



B

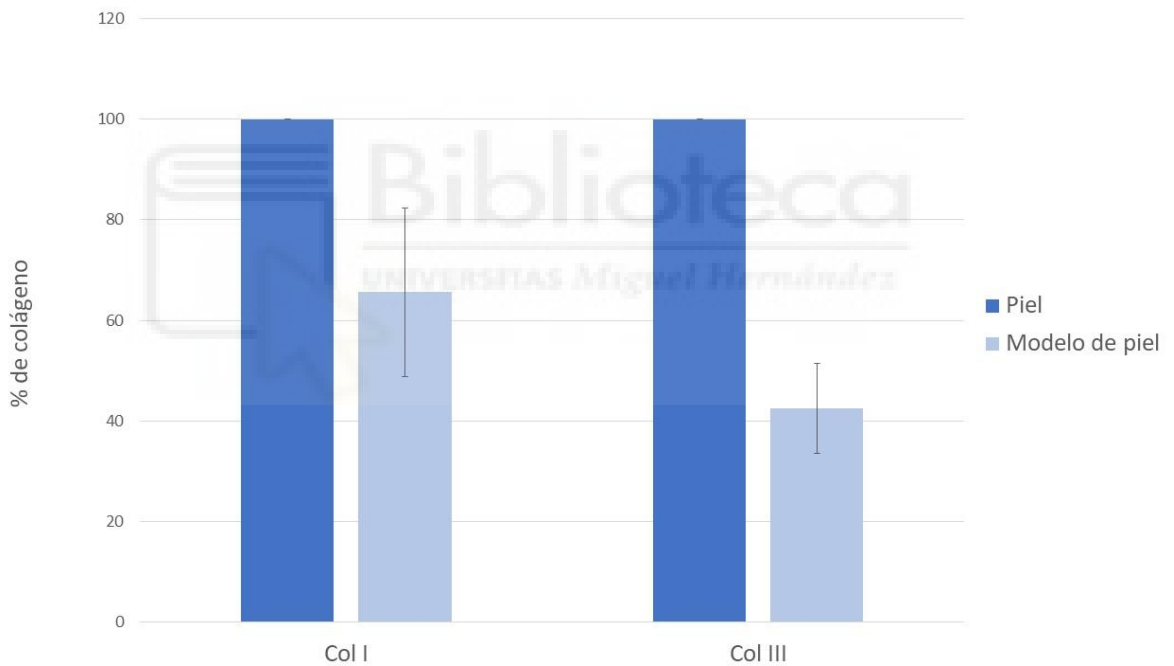


Figura 11: Tinción de inmunofluorescencia del colágeno I y III. Inmunotinción tras 35 días de cultivo de pieles bioimpresas. A: Tinciones de Hoechst (1:1000), colágeno I (1:500) y colágeno III (1:250) del modelo de piel bioimpreso y una muestra de piel humana. La tinción de los núcleos se muestra en azul, el colágeno I en rojo mientras que la fluorescencia verde equivale a la presencia de colágeno III. B: Comparativa entre el modelo de piel y la muestra de piel humana. Se han medido la cantidad de colágeno I y III en la piel humana y en el modelo de piel. Al tratarse de proteínas de la dermis, solo se ha considerado dicha región, tanto en el control como en el modelo de piel. El control (piel humana) se ha representado como el 100% y el modelo de piel se representa como un porcentaje relativo al control. La presencia de colágeno I y III es inferior en el modelo de piel (n=2). Escala: 50 μ m

La presencia de colágeno VII también queda evidenciada, pues se puede apreciar una línea de fluorescencia verde muy clara entre la dermis y la epidermis de nuestro modelo (Figura 12). Se ha desarrollado una unión dermoepidérmica homogénea que garantiza la adherencia de la epidermis a la dermis.

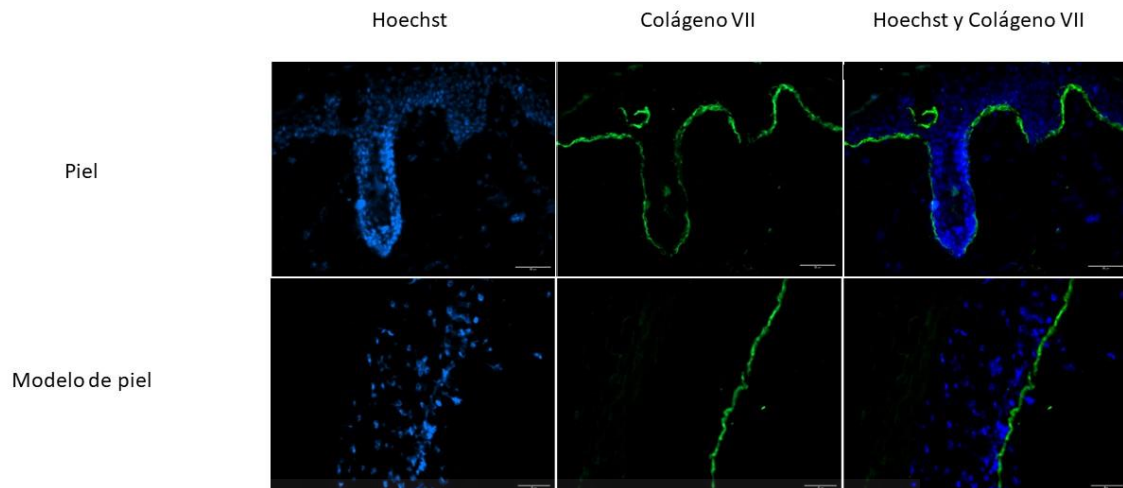


Figura 12: Presencia de colágeno VII en el modelo de piel. Inmunotinción tras 35 días de cultivo de pieles bioimpresas. Tinción de los núcleos celulares con la tinción de Hoechst (1:1000), que se muestra en azul. La fluorescencia verde corresponde a la tinción de colágeno VII (1:250). En la parte superior de las imágenes se distingue la epidermis, con mayor densidad celular. En la parte inferior de las imágenes la dermis, con menor densidad celular. Entre ambas capas se aprecia la fluorescencia verde que corresponde a la presencia de colágeno VII. (n=2). Escala: 50 μm

La segunda parte de la validación y caracterización del modelo de piel *in vitro* consistió en la búsqueda de la epidermis. Para ello, tras la fijación con nitrógeno líquido y la inclusión en OCT, se realizaron diversas tinciones de inmunofluorescencia. Concretamente, se trató de validar la síntesis de tres proteínas en nuestro modelo: integrina $\beta 1$, involucrina y filagrina. Al igual que con las proteínas de la familia del colágeno, para detectar estas proteínas se emplearon anticuerpos específicos: integrina $\beta 1$ (1:100), involucrina (1:250) y filagrina (1:500). También se incluyó en el experimento la tinción de Hoechst (1:1000), con el fin de relacionar la producción de las proteínas con el número de células de la epidermis.

La integrina $\beta 1$ es una proteína característica del estrato basal de la epidermis. Esta proteína es de particular interés, pues está involucrada en la diferenciación de los queratinocitos. De no estar presente, podría imposibilitar la diferenciación de queratinocitos inmaduros a queratinocitos maduros y corneocitos, impidiendo así la formación de una epidermis estratificada. Al realizar la tinción con el

anticuerpo específico para esta proteína, se pudo comprobar que, efectivamente, los queratinocitos de nuestro modelo eran capaces de producirla (Figura 13).

Respecto a la involucrina, es una proteína perteneciente al estrato córneo de la epidermis, y participa en la formación de la envoltura cornificada de los corneocitos. Cuando se analizó la presencia de esta proteína en nuestro modelo de piel, quedó evidenciada debido a la fluorescencia que se observa en el exterior de la epidermis (Figura 13).

Por último, se estudió la presencia de filagrina en la epidermis de nuestro constructo. Esta proteína, al igual que la involucrina es típica del estrato córneo. Sin embargo, la filagrina se expresa en un estado más avanzado del desarrollo de los corneocitos, por lo que, morfológicamente, se sitúa más al exterior que la involucrina. Como se puede apreciar en la Figura 13, los queratinocitos de nuestro modelo son capaces de producir filagrina. Comparando el modelo de piel *in vitro* con las muestras de piel humana, observamos un aumento del número de capas epidérmicas que contienen involucrina y filagrina.

Con las condiciones de cultivo fijadas, pudimos desarrollar piel humana bioimpresa con una epidermis homogénea y madura hasta que se forma la capa córnea.

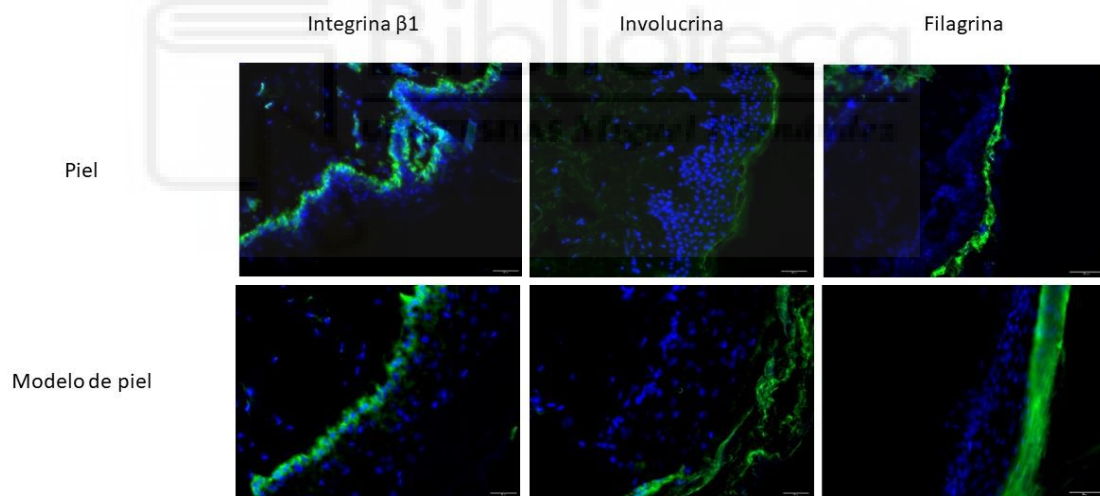


Figura 13: Proteínas de la epidermis en el modelo de piel. Inmunotinción tras 35 días de cultivo de pieles bioimpresas: Tinciones de Hoechst (1:1000) para la visualización de los núcleos celulares, integrina $\beta 1$ (1:100), involucrina (1:250) y filagrina (1:500). La presencia de las tres proteínas se muestra en color verde, mientras que los núcleos celulares se muestran en color azul. En todas las imágenes, la epidermis se sitúa en el lado derecho de las imágenes, delimitada por el incremento en la densidad celular(n=3). Escala: 50 μm

5. DISCUSIÓN

Con el objetivo de desarrollar un modelo de piel *in vitro* con células humanas se han puesto a prueba diferentes parámetros. En primer lugar, se ha descubierto, tal y como se menciona en Yin J. *et al.* [22], que para la constitución de un modelo de piel humana es necesario un hidrogel que combine propiedades mecánicas adecuadas y viabilidad celular. Se comprobó que el modelo de biotinta propuesto en dicho artículo (GelMa 5%/ Gelatina 8%), era perfectamente adecuado para la construcción de un modelo de piel *in vitro*. Este modelo combina una gelificación rápida por parte de la gelatina, debida a una bajada de temperatura, con una gelificación lenta del GelMa, por irradiación con luz UV.

El periodo de maduración del modelo de piel constó de 35 días, dividiéndose el mismo en dos fases. En primer lugar, tras la bioimpresión de la biotinta que contiene gelatina, GelMa y fibroblastos, se produjo la maduración de la dermis. Al haber solo un tipo celular en dicho periodo, el medio de cultivo empleado fue aquel específico para el crecimiento de fibroblastos (Medio A). La segunda fase de maduración del modelo es la relativa a la epidermis. Esta fase se inicia con la siembra de los queratinocitos sobre nuestra dermis, y tiene una duración de 21 días. En este periodo, conviven en nuestro modelo dos líneas celulares: fibroblastos y queratinocitos. Por ello, se quiso probar qué medio de cultivo era el más adecuado para nutrir ambos tipos de células, se manera similar a lo que ocurre en la piel humana. Se probaron cuatro medios de cultivo, y se evaluó la densidad celular en los constructos cultivados con los cuatro medios de cultivo, resultando el medio A:B el más beneficioso de todos ellos.

En lo relativo al medio de cultivo, también se quiso probar si la adición de vitamina C al mismo, podía suponer algún beneficio en el desarrollo del modelo de piel. Según lo estudiado en la bibliografía, la vitamina C es un componente muy abundante en la piel humana y tiene funciones relevantes en la misma [25]. Entre estas, era de particular interés su influencia en la producción de colágeno. Se quiso comprobar si, efectivamente, la adición de vitamina C al medio de cultivo mejoraba la producción de colágeno en nuestro modelo tal y como lo hace en la piel humana. Los resultados indicaron que la producción de colágeno I fue significativamente mayor en el constructo con el medio suplementado con vitamina C. Además, también se produjo un incremento en la densidad celular, por lo que, sin duda, la adición de vitamina C supone un beneficio en el desarrollo del modelo de piel.

Tras la maduración del modelo de piel, se lleva a cabo una etapa de preparación de la muestra para su posterior caracterización. Un paso clave de esta preparación es la fijación de la muestra. Mediante la fijación se consigue mantener la estructura celular y molecular y dar una consistencia que permita realizar los cortes histológicos *a posteriori*. Se determinó que el mejor método de fijación fue la

congelación instantánea en nitrógeno líquido. Al observar las muestras por el microscopio de fluorescencia, se pudo comprobar que la fijación en nitrógeno líquido mantuvo la morfología de la piel considerablemente mejor. Una misma dermis bioimpresa se dividió en dos, fijándose una mitad con baños de sacarosa y OCT, y la otra mitad en nitrógeno líquido y OCT. Para una misma dermis, se pudo observar mayor densidad celular y superficie relativa de colágeno I y III en las muestras fijadas mediante congelación instantánea en comparación con las fijadas con PFA y sacarosa. Al ser una misma dermis, se sabe que las diferencias no vienen dadas por la morfología de esta, sino por el método de fijación.

Una vez seleccionadas todas las características y variables del proceso, se procedió a la caracterización del modelo, con el fin de comprobar si la combinación de las condiciones que se habían probado experimentalmente era capaz de simular la piel humana. Mediante tinciones de inmunofluorescencia se validó el modelo. Referente a la dermis, los fibroblastos eran apreciables bajo el microscopio de fluorescencia gracias a la tinción de los núcleos celulares. Además, se vio una producción clara de colágeno I y III. Comparado con la piel humana, nuestro modelo tenía una densidad celular notablemente menor. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que la dermis humana contiene apéndices como folículos pilosos, glándulas sebáceas, y glándulas sudoríparas que no están incluidos en nuestro modelo de piel. Respecto al colágeno, tanto el colágeno I como el III mostraron una producción inferior a la producida en las muestras de piel humana. Uno de los experimentos que se podrían llevar a cabo en los siguientes avances del proyecto sería realizar una tinción específica de los fibroblastos en las muestras de piel humana, para así poder comparar concretamente el número de fibroblastos del modelo de piel con las muestras de piel humana.

Con la tinción de los núcleos celulares, se comprobó la presencia de una epidermis, resaltada por un incremento en la densidad celular. Este incremento en la densidad celular coincidía con la presencia de colágeno VII, que se encuentra en la unión entre la dermis y la epidermis (Figura 12). Además, también se puede apreciar la presencia de integrina $\beta 1$ internada en la zona de mayor densidad celular, es decir, en el estrato basal de la epidermis (Figura 13), lo cual coincide con la morfología de la piel humana.

El modelo de piel también fue capaz de sintetizar otras proteínas de la epidermis, tales como la involucrina o la filagrina, dos proteínas de la capa más externa de la epidermis, el estrato córneo. Al examinar una muestra de piel humana, mediante tinciones de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para las proteínas de la epidermis, es posible distinguir las zonas de producción de involucrina y filagrina. Pese a ser ambas características del estrato córneo, la producción de filagrina

se da en una superficie más externa, y en un estadio más avanzado de maduración epidérmica. Al comprobar que nuestro modelo produce tanto involucrina como filagrina, se comprueba también que el modelo se encuentra en un estado de diferenciación muy avanzado, y que los queratinocitos han sido capaces de desarrollar una epidermis con todas sus capas completas.

Examinando los niveles de filagrina, es apreciable una diferencia entre el modelo de piel *in vitro* y las muestras de piel humana. La presencia de esta proteína se encuentra en cantidades superiores a la piel humana, pues la banda de fluorescencia es mucho mayor en la inmunotinción del modelo de piel (Figura 13). Una explicación plausible para este resultado se encuentra en el proceso de renovación de la epidermis, que es característico de la piel humana. La constante descamación de los corneocitos en las capas más externas de la epidermis, junto con la producción y diferenciación ininterrumpida de nuevas células epidérmicas, da lugar a un ciclo continuo de renovación de la piel. En el modelo de piel *in vitro* no se produce la descamación de la epidermis, al encontrarse en un ambiente controlado. Por ello, los corneocitos son capaces de retener una mayor cantidad de filagrina.

También se observó una unión dermis-epidermis consolidada. Una representación clara de ello es la adherencia de dichas capas y la producción de colágeno VII, proteína característica de la matriz extracelular situada entre ambas capas de la piel.

6. CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

Tras la finalización de este trabajo se obtienen las siguientes conclusiones:

- El hidrogel compuesto por gelatina y GelMa es apto para la bioimpresión 3D y el crecimiento de células en su interior, incrementando la viabilidad celular a medida que avanza el tiempo.
- La suplementación con vitamina C es beneficiosa para el desarrollo de la dermis, mostrando una mayor densidad celular y producción de colágeno que el medio sin suplementación.
- El método de congelación instantánea con nitrógeno líquido para la fijación de las muestras histológicas es idóneo para la conservación de la morfología de las muestras
- Con las condiciones propuestas, se ha podido crear una dermis. Con tinciones de inmunofluorescencia se ha comprobado que las células presentes en el modelo son capaces de producir proteínas dérmicas tales como el colágeno I y III.
- Con las condiciones propuestas, se ha podido construir una epidermis. Esto se ha comprobado con tinciones de inmunofluorescencia para proteínas epidérmicas como integrina $\beta 1$, involucrina y filagrina. La filagrina es comúnmente producida en estados avanzados de la diferenciación queratinocítica, por lo que la presencia de esta proteína permite comprobar que el modelo de piel consta de una epidermis estratificada completa.
- La unión entre la dermis y la epidermis está consolidada, ya que, en las imágenes tomadas bajo el microscopio, ambas capas se encuentran ancladas. Además, hay presencia de colágeno VII en la unión dermis-epidermis, hecho que también se da en las muestras de piel humana.

Este trabajo forma parte de un proyecto que consiste en la creación de un modelo de piel innervado mediante bioimpresión 3D. Esta es la fase inicial del proyecto, en el que se han puesto a punto los parámetros de bioimpresión, cultivo y preparación de muestras para el desarrollo de un modelo de piel sin innervación. En este trabajo, la dermis se ha construido mediante bioimpresión 3D. Una vez la dermis hubo madurado, se depositaron los queratinocitos de manera manual. Uno de los siguientes pasos en el desarrollo del modelo de piel será depositar los queratinocitos de con la bioimpresora 3D, utilizando una pipeta piezoeléctrica. Otro objetivo futuro del proyecto será mejorar el hidrogel, de manera que se asemeje más a la MEC.

Otro punto a tener en cuenta es que los modelos de piel de este proyecto se han realizado con células de un único paciente, por lo que se han de realizar más experimentos utilizando otras células con el fin de detectar como la variabilidad de pacientes afecta a nuestro modelo. El paso final del proyecto consistirá en la innervación del modelo de piel. Con este fin, se están llevando a cabo esfuerzos para conseguir neuronas a partir de fibroblastos mediante transdiferenciación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzales, K.A.U. and E. Fuchs, *Skin and its regenerative powers: an alliance between stem cells and their niche*. Developmental cell, 2017. **43**(4): p. 387-401.
2. Kasza, I., et al., *Syndecan-1 is required to maintain intradermal fat and prevent cold stress*. PLoS genetics, 2014. **10**(8): p. e1004514.
3. Sugihara, H., et al., *Effects of fat cells on keratinocytes and fibroblasts in a reconstructed rat skin model using collagen gel matrix culture*. British Journal of Dermatology, 2001. **144**(2): p. 244-253.
4. Bautista-Hernández, L.A., et al., *Fibroblasts: the unknown sentinels eliciting immune responses against microorganisms*. European Journal of Microbiology Immunology, 2017. **7**(3): p. 151-157.
5. Xue, M. and C.J. Jackson, *Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring*. Advances in wound care, 2015. **4**(3): p. 119-136.
6. Tracy, L.E., R.A. Minasian, and E. Caterson, *Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound*. Advances in wound care, 2016. **5**(3): p. 119-136.
7. Burgeson, R.E. and A.M. Christiano, *The dermal—epidermal junction*. Current opinion in cell biology, 1997. **9**(5): p. 651-658.
8. Chaplin, G., et al., *The role of piloerection in primate thermoregulation*. Folia primatologica, 2013. **85**(1): p. 1-17.
9. Tsepkenko, A., et al., *The regenerative potential of skin and the immune system*. Clinical, cosmetic investigational dermatology, 2019: p. 519-532.
10. Brakebusch, C., et al., *Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on $\beta 1$ integrin expression on keratinocytes*. The EMBO journal, 2000.
11. Adhikary, G., et al., *Involucrin expression in the corneal epithelium: an essential role for Sp1 transcription factors*. Investigative ophthalmology visual science, 2005. **46**(9): p. 3109-3120.
12. Candi, E., R. Schmidt, and G. Melino, *The cornified envelope: a model of cell death in the skin*. Nature reviews Molecular cell biology, 2005. **6**(4): p. 328-340.
13. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Experimental dermatology, 2008. **17**(12): p. 1063-1072.
14. Webb, A., A. Li, and P. Kaur, *Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin*. Differentiation, 2004. **72**(8): p. 387-395.
15. Pouchet, L.J., et al., *Human skin 3D bioprinting using scaffold-free approach*. Advanced Healthcare Materials, 2017. **6**(4): p. 1601101.

16. Lee, V., et al., *Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting*. Tissue Engineering Part C: Methods, 2014. **20**(6): p. 473-484.
17. Kim, B.S., et al., *3D cell printing of in vitro stabilized skin model and in vivo pre-vascularized skin patch using tissue-specific extracellular matrix bioink: A step towards advanced skin tissue engineering*. Biomaterials, 2018. **168**: p. 38-53.
18. Levato, R., et al., *The bio in the ink: cartilage regeneration with bioprintable hydrogels and articular cartilage-derived progenitor cells*. Acta biomaterialia, 2017. **61**: p. 41-53.
19. Gao, Q., et al., *Coaxial nozzle-assisted 3D bioprinting with built-in microchannels for nutrients delivery*. Biomaterials, 2015. **61**: p. 203-215.
20. Zhang, Y., et al., *In vitro study of directly bioprinted perfusable vasculature conduits*. Biomaterials science, 2015. **3**(1): p. 134-143.
21. Huang, S., et al., *3D bioprinted extracellular matrix mimics facilitate directed differentiation of epithelial progenitors for sweat gland regeneration*. Acta biomaterialia, 2016. **32**: p. 170-177.
22. Yin, J., et al., *3D bioprinting of low-concentration cell-laden gelatin methacrylate (GelMA) bioinks with a two-step cross-linking strategy*. ACS applied materials interfaces, 2018. **10**(8): p. 6849-6857.
23. Diamantides, N., et al., *Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: the effects of riboflavin photocrosslinking and pH*. 2017. **9**(3): p. 034102.
24. Xu, H., et al., *Effects of Irgacure 2959 and lithium phenyl-2, 4, 6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs*. Biomedical Materials, 2020. **15**(5): p. 055021.
25. Pullar, J.M., A.C. Carr, and M.J.N. Vissers, *The roles of vitamin C in skin health*. 2017. **9**(8): p. 866.