

Purificación de fibroblastos gingivales a partir de tejido de la mucosa bucal (Gingival fibroblast purification from oral mucose tissue)

Karla Padrón¹, Siham Salmen², Lisbeth Berrueta², Erika González, Lorena Dávila³, Joselyn Rojas², Lisbeth Sosa³, Daniela Olávez¹, Eduvigis Solórzano¹✉

¹ Grupo de Investigaciones Biopatológicas, Laboratorio Integrado de Biología Molecular y Celular, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Venezuela. ² Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Venezuela. ³ Cátedra de Periodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes, Venezuela.

[ARTICULO ORIGINAL]

Recibido: 03 de Marzo de 2011. Aceptado: 26 de Mayo de 2011.

Resumen

Los fibroblastos son ampliamente utilizados en la medicina regenerativa como elementos clave en la restauración del tejido gingival y tratamientos faciales. El objetivo de este estudio fue estandarizar un método para obtener fibroblastos gingivales, con alta pureza, procedentes de la mucosa bucal, para ello se cultivaron células procedentes del tejido gingival mecánicamente disgregado y sometido a separación mediante gradientes de densidad en ficoll hypaque. Después de varios pasajes se obtuvo un cultivo enriquecido de células adherentes. El 51% de estas fueron positivas para el marcador específico de fibroblastos humanos ER-TR7. Nuestros resultados indican que el método utilizado permite la obtención de los fibroblastos del tejido gingival, células con gran relevancia en el campo de la medicina regenerativa y que representa en nuestra comunidad, el paso inicial para la implementación de estrategias terapéuticas hacia la restitución de tejidos perdidos, particularmente a nivel de la mucosa bucal.

Palabras clave

Mucosa gingival, fibroblastos gingivales, ER-TR7, citometría de flujo, inmunofluorescencia.

Abstract

Fibroblasts are widely used in regenerative medicine, as key elements in the restoration of the gingival tissue and facial treatments. The aim of this study was to standardize in our laboratory a method to obtain highly pure fibroblasts from gingival tissue. In order to do that, cells were mechanically disaggregated from gingival tissue and separated by ficoll hypaque density gradients. This procedure was performed several times yielding an enriched culture of adherent cells, where 51% resulted positive for the fibroblast marker ER-TR7. Our results indicate that the method used, allow to obtain fibroblasts from gingival tissue; cells with great potential in the field of regenerative medicine and it represents, in our community, the first step to implement therapeutic strategies that will allow the restoration of damaged tissues, particularly in the oral mucosa.

Keywords

Gingival mucose, gingival fibroblast, ER-TR7, flow cytometry, immunofluorescence.

Introducción

Los fibroblastos son subpoblaciones celulares en forma de huso y distribuidas ampliamente a nivel de los tejidos del cuerpo. Su origen es mesenquimático y se consideran el componente principal del tejido conectivo (1). De los subtipos existentes, los

fibroblastos dermales (FD) y gingivales (FG), contienen características morfológicas y funcionales similares; sin embargo, se ha establecido que los FG median la reparación de los tejidos de manera más rápida y con bajo nivel de cicatrización (2). Esta característica particular de los FG, está asociada a su alta capacidad de replicación (3) y actividad de la telomerasa, enzima encargada de mantener la longitud de los telómeros y

que está asociada con la longevidad celular (3, 4). Es por ello que ha despertado el interés de muchos grupos de investigadores, por su gran potencialidad en la regeneración tisular (5).

Los fibroblastos son fuente principal de colágeno tipos I y III (6), fibronectina, glicosaminoglicanos, proelastina, factores de crecimiento y de la matriz extracelular, elementos que juegan un papel importante en la regulación de los procesos homeostáticos y en la interacción célula-célula (1). Estas células además, responden a citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento, y de esta manera controlan el balance entre la producción de matriz extracelular y la degradación tisular (7).

Adicionalmente, los FG están en estrecho contacto con las células epiteliales, de esta manera controlan la morfogénesis, homeostasis y reparación de los tejidos (8), mediante la modulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células del tejido epitelial, (9) especialmente de los queratinocitos (10). Este efecto está asociado con la liberación del factor de crecimiento de los queratinocitos, que juega un papel importante tanto en la proliferación como en la diferenciación de esta subpoblación celular (9).

Los fibroblastos aislados y cultivados *in vitro* o sobre sustancias bioactivas, han sido utilizados para la reposición de los tejidos periodontales alterados y en casos de retracción postquirúrgica de la encía, con resultados prometedores en la regeneración de heridas, asociado con la producción de EGF β que estimula la angiogénesis y la aparición de pericitos (células mesenquimales) y de células pluripotentes, con capacidad de diferenciarse hacia fibroblastos y osteoblastos (1, 11).

Las observaciones clínicas y estudios experimentales en animales indican consistentemente que el proceso de cicatrización en la mucosa bucal tiene mejores resultados que en la piel (7, 12-14). Por lo que se ha postulado que las células de la mucosa bucal poseen características distintivas de la promoción de cierre acelerado de heridas (12, 15). Los FG pueden ser purificados de tejidos de diferentes regiones de la cavidad bucal, como el paladar, rebordes edéntulos (16) y en casos de erupción pasiva de terceros molares, a partir del cual pueden ser cultivados *in vitro*, donde se expanden y proliferan sin necesidad de condiciones especiales (17).

En base a estos hallazgos, en este trabajo se estandarizó el procedimiento para el cultivo y caracterización de los FG, como primer paso para el desarrollo y aplicación de procedimientos que

restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos de soporte en la cavidad bucal.

Metodología

Muestra de tejido gingival: posterior a la obtención de consentimiento escrito por los voluntarios reclutados en el estudio y cumpliendo con las normas bioéticas de la Universidad de Los Andes (ULA), se procedió a la obtención de la muestra de tejido gingival. Los individuos seleccionados acudieron a la clínica de Periodoncia, Facultad de Odontología, ULA con alteraciones en la erupción pasiva; en ausencia de patologías periodontales inflamatorias o asociadas a medicamentos. El tejido se obtuvo mediante la realización de una cuña distal en la mucosa de los terceros molares inferiores, efectuada con fines terapéuticos; para lo cual, previo al acto quirúrgico, se indicó al paciente realizar enjuagues con Gluconato de clorhexidina 0,12%, por 1 minuto. Bajo anestesia infiltrativa, se realizó la cuña distal; obteniéndose así un fragmento de tejido de aproximadamente 3 mm², el cual fue lavado con solución fisiológica estéril para eliminar restos de sangre y sobre una loseta estéril se procedió a retirar mecánicamente el epitelio.

Cultivo *in vitro* del tejido gingival: el tejido fue disgregado sobre una capsula de petri y con la ayuda del bisturí se cortó en porciones de aproximadamente 2 mm x 2 mm. Posteriormente fue homogeneizado con el émbolo de una jeringa estéril, a fin de obtener fragmentos de tejido más pequeños. La muestra fue resuspendida en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) completo (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 2,5 mg/mL de anfotericina B y suplementado con 10% de suero bovino fetal. La suspensión celular fue sometida a separación por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque, densidad 1077, a fin de eliminar las células mononucleares presentes en el tejido. Posterior a la centrifugación a 400 g durante 30 min, el botón celular ubicado en el fondo del tubo fue recuperado, lavado tres veces y sembrado en placas de 6 pozos estériles en medio D-MEM completo. El medio de cultivo fue reemplazado cada 7 días. Después de tres semanas, las células en suspensión fueron separadas de las adherentes, estas últimas fueron tratadas con Tripsina (0,25%)/EDTA a fin de realizar los repiques y lavados correspondientes. La viabilidad celular se determinó mediante la técnica de coloración supravital con Azul Trypan al 0,4%.

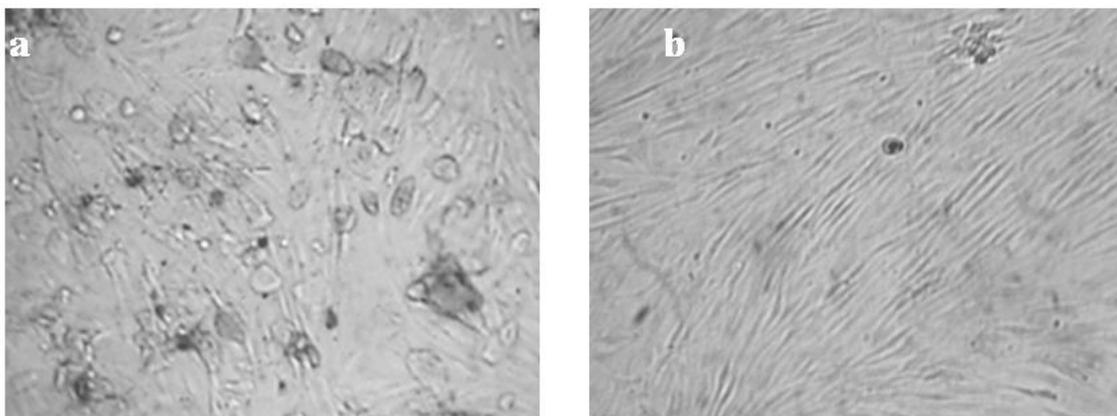


Figura 1. En la figura 1a, se muestra la presencia de células adherentes y no adherentes después de dos semanas de cultivo. La figura 1b, muestra la predominancia de células adherentes las cuales se observan confluentes después de 4 semanas de cultivo.

Determinación del fenotipo de las células en cultivo mediante citometría de flujo: las células adherentes y no adherentes fueron fijadas con paraformaldehído (PAF) al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego de tres lavados, estas fueron permeabilizadas con PBS, 0,5% de BSA y saponina 0,1%, durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego centrifugadas y teñidas con 10 μ L (1 μ g/mL) del anticuerpo marcador específico de fibroblastos humanos: ER-TR7-PE (Santa Cruz Biotechnology, CA), durante 30 minutos a 4 °C, luego de tres lavados con PBS, las células fueron adquiridas y analizadas en un citómetro de flujo FACSort mediante el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

Fueron capturados 10,000 eventos y mediante un gráfico tipo “dot-plot”, se estableció la región donde se ubican las células en un gráfico de FSC (Forward scatter) (ajustado a E-1, debido al tamaño celular) y SSC (Side scatter).

De esta región se identificaron aquellas células con marcaje positivo para ER-TR7.

Inmunofluorescencia directa: Una porción (2×10^5 células/mL) de células adherentes se sembraron en laminillas estériles y se cultivaron durante 2 semanas hasta obtener una confluencia del 80%.

Las células fueron fijadas con metanol por 10 minutos a -20 °C, se lavaron tres veces con PBS-Gelatina, fueron incubadas con ER-TR7-PE (1:50) y luego de tres lavados las células se visualizaron con un objetivo de 100X en un microscopio de epifluorescencia LEICA DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH), las imágenes fueron registradas empleando el sistema de captura CoolSNAP acoplado al software ImagePro (MediaCybernetics).

Resultados y Discusión

En este estudio se implementó un método para la purificación de FG a partir de la mucosa bucal para establecer cultivos in vitro, que pueden utilizarse en procedimientos de regeneración de tejido conectivo con aplicación en diferentes áreas biomédicas. Las células fueron extraídas del tejido y sometidas a ficoll hypaque a fin de eliminar las células mononucleares, fue posible diferenciar células adherentes de las no adherentes a partir de los primeros 14 días de cultivo (ver figura 1a) logrando establecerse una monocapa de células confluentes en cuatro semanas (ver figura 1b). Para evaluar el porcentaje de fibroblastos presentes en ambas subpoblaciones (adherentes y no adherentes), se utilizó un marcador específico de fibroblastos humanos (ER-TR7) (18).

Tal y como se muestra en la figura 2, el enriquecimiento de fibroblastos fue mayor en la población de células en monocapa (51%) (Figura 2b) en comparación con aquellas que se mantuvieron en suspensión (17%) (Figura 2a).

Los resultados de la inmunofluorescencia (Figura 3) permitieron evaluar la morfología de estas células así como la presencia y patrón de localización del antígeno ER-TR7 en la población en las células adheridas a las laminillas, corroborando así el enriquecimiento predominante de fibroblastos en las preparaciones estudiadas. Existen reportes previos de la presencia de células progenitoras gingivales multipotenciales a nivel de la mucosa gingival con morfología similar a los fibroblastos, con capacidad de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos (19), por lo que es importante establecer estudios

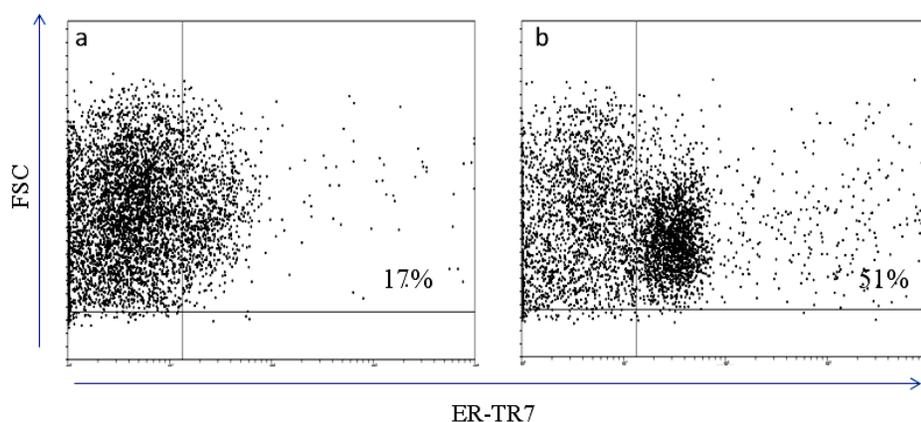


Figura 2. La figura 2a, evidencia el porcentaje de fibroblastos presentes en las células no adherentes, mientras que la figura 2b, evidencia el enriquecimiento de fibroblastos en las células adherentes.

adicionales para caracterizar a las poblaciones adherentes aisladas con morfología de fibroblastos, pero negativas al marcador ER-TR7.

Desde hace varios años diferentes grupos de investigación han trabajado en la regeneración de tejidos mediante el uso de matrices no-celulares inertes con o sin la presencia de FG autólogos (1, 20); sin embargo los resultados hasta ahora obtenidos indican que en estos injertos, la repoblación es más lenta y depende exclusivamente de la infiltración celular y de vasos sanguíneos del periostio, debido a ausencia de células mesenquimáticas, importantes en la reconstitución del tejido (20-22). Tomando en consideración estas observaciones la tendencia actual es enriquecer estas matrices acelulares con

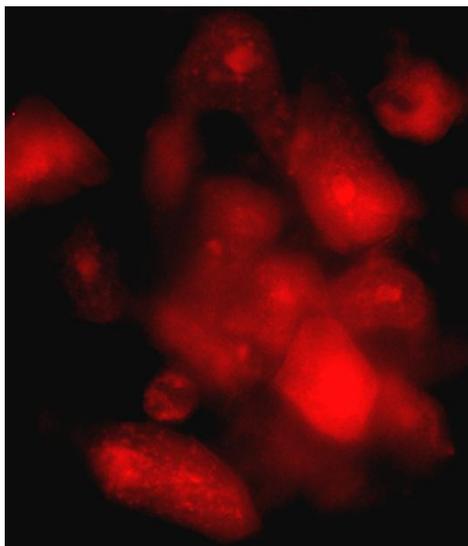


Figura 3. Muestra la morfología y patrón de tinción intracelular de ER-TR7 en los fibroblastos cultivados en monocapa.

fibroblastos, previo a su colocación en el tejido blanco para acelerar la recuperación y regeneración del tejido (23), por cuanto representan una fuente importante de matriz extracelular (1, 7, 24), de reclutamiento de células que contribuyen en la regeneración tisular (1, 23), además de favorecer las morfogénesis epitelial, diferenciación e integridad del epitelio de la mucosa gingival (25).

Las FG no son sólo de gran interés para el campo de la odontología y la estética médica, sino también para la generación de células progenitoras pluripotenciales inducidas (iPS), procedimiento que inicialmente fue explorado en fibroblastos de piel y tejidos viscerales, pero que por su facilidad de obtención de muestras, purificación y cultivo, además de su alta tasa de replicación y actividad de telomerasa, son consideradas como el modelo ideal para generar iPS (3, 26).

La ingeniería de tejidos se ha convertido en una nueva frontera en la odontología para la regeneración de tejidos bucales (3), por lo que la purificación de FG en nuestro laboratorio representa un paso inicial para la implementación de nuevas estrategias terapéuticas en nuestra región, a fin de ofrecerle a los pacientes una alternativa en la restitución de tejido perdido o dañado especialmente en la mucosa bucal.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al CDCHT de la Universidad de los Andes subvención O-255-10-07-C.

Referencias

1. Stepanova II, The use of fibroblasts in periodontology and implantology. *Bull Exp Biol Med* 2007; 144: 147-50. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart DA, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H, Häkkinen L, Larjava HS, Expression of integrin alphavbeta6 and TGF-beta in scarless vs scar-forming wound healing. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 543-57. [[PubMed](#)]
3. Egusa H, Okita K, Kayashima H, Yu G, Fukuyasu S, Saeki M, Matsumoto T, Yamanaka S, Yatani H, Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2010; 5: e12743. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Martín-Rivera L, Herrera E, Albar JP, Blasco MA, Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 95: 10471-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Ebisawa K, Kato R, Okada M, Sugimura T, Latif MA, Hori Y, Narita Y, Ueda M, Honda H, Kagami H, Gingival and dermal fibroblasts: their similarities and differences revealed from gene expression. *J Biosci Bioeng* 2011; 111: 255-8. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Ren L, Fu Y, Deng Y, Qi L, Jin L, Advanced glycation end products inhibit the expression of collagens type I and III by human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2009; 80: 1166-73. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y, Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003; 74: 103-10. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Werner S, Smola H, Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 143-6. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Costea DE, Loro LL, Dimba EA, Vintermyr OK, Johannessen A, Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 1479-86. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. El Ghalbzouri A, Lamme E, Ponec M, Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res* 2002; 310: 189-99. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Saito A, Saito E, Kawanami M, Shimada A, Healing in transplanted teeth with periodontal ligament cultured in vitro. *Cell Transplant* 2003; 12: 519-25. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Sukotjo C, Lin A, Song K, Ogawa T, Wu B, Nishimura I, Oral fibroblast expression of wound-inducible transcript 3.0 (wit3.0) accelerates the collagen gel contraction in vitro. *J Biol Chem* 2003; 278: 51527-34. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Sciubba JJ, Waterhouse JP, Meyer J, A fine structural comparison of the healing of incisional wounds of mucosa and skin. *J Oral Pathol* 1978; 7: 214-27. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Walsh LJ, L'Estrange PR, Seymour GJ, High magnification in situ viewing of wound healing in oral mucosa. *Aust Dent J* 1996; 41: 75-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Lin A, Hokugo A, Choi J, Nishimura I, Small cytoskeleton-associated molecule, fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner 2/wound inducible transcript-3.0 (FGFR1OP2/wit3.0), facilitates fibroblast-driven wound closure. *Am J Pathol* 2010; 176: 108-21. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Borghetti A, Louise F, Controlled clinical evaluation of the subpedicle connective tissue graft for the coverage of gingival recession. *J Periodontol* 1994; 65: 1107-12. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Giannopoulou C, Cimasoni G, Functional characteristics of gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Dent Res* 1996; 75: 895-902. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Van Vliet E, Melis M, Foidart JM, Van Ewijk W, Reticular fibroblasts in peripheral lymphoid organs identified by a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 883-90. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Fournier BP, Ferre FC, Couty L, Lataillade JJ, Gourven M, Naveau A, Coulomb B, Lafont A, Gogly B, Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A* 2010; 16: 2891-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Hou LT, Tsai AY, Liu CM, Feng F, Autologous transplantation of gingival fibroblast-like cells and a hydroxylapatite complex graft in the treatment of periodontal osseous defects: cell cultivation and long-term report of cases. *Cell Transplant* 2003; 12: 787-97. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Batista ELJ, Batista FC, Novaes ABJ, Management of soft tissue ridge deformities with acellular dermal matrix. Clinical approach and outcome after 6 months of treatment. *J Periodontol* 2001; 72: 265-73. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Wei PC, Laurell L, Geivelis M, Lingen MW, Maddalozzo D, Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. *J Periodontol* 2000; 71: 1297-305. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Novaes ABJ, Marchesan JT, Macedo GO, Palioto DB, Effect of in vitro gingival fibroblast seeding on the in vivo incorporation of acellular dermal matrix allografts in dogs. *J Periodontol* 2007; 78: 296-303. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Hillmann G, Steinkamp-Zucht A, Geurtsen W, Gross G, Hoffmann A, Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. *Biomaterials* 2002; 23: 1461-9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Müssig E, Tomakidi P, Steinberg T, Gingival fibroblasts established on microstructured model surfaces: their influence on epithelial morphogenesis and other tissue-specific cell functions in a co-cultured epithelium: an in-vitro model. *J Orofac Orthop* 2009; 70: 351-62. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Wada N, Wang B, Lin NH, Laslett AL, Gronthos S, Bartold PM, Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol Res* 2011; Mar 29. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]