

Estandarización de un método de cultivo de queratinocitos primarios y su co-cultivo con fibroblastos en mallas de colágeno I

1.1. Introducción.

Así como la piel es la cubierta de la superficie externa de nuestro cuerpo, la mucosa reviste internamente al aparato digestivo y es, a diferencia de la primera, una membrana húmeda denominada también membrana mucosa. Está compuesta de epitelio externo y una base de tejido conectivo más profunda (lámina propia), que se asemejan a la estructura de la epidermis y dermis de la piel, pero en algunas zonas se puede encontrar una tercera capa denominada submucosa, que se encuentra entre la lámina propia y el músculo o hueso subyacente. (1) (2).

Aunque lo anterior es cierto, es necesario tener en cuenta que la mucosa se especializa en cada una de las regiones de la boca, cambiando sus características histológicas. Es así como podemos encontrar que dentro de la boca, mucosa oral queratinizada y no queratinizada, la primera básicamente en paladar duro y encías y la segunda en el paladar blando y el carillo. Esta especialización le permite a la mucosa ejercer diferentes funciones, dentro de las que se encuentran la protección mecánica contra diferentes fuerzas, la acción de barrera contra los microorganismos, toxinas y otros antígenos, la intervención en la defensa inmunitaria, tanto celular como humoral, y la sensibilidad táctil, dolorosa y de los sabores, debida a la rica innervación de este tejido (2)(3).

La capa externa de la mucosa oral es estratificada, y es llamada también epitelio estratificado, se divide comúnmente en estrato germinativo, espinoso, granuloso y córneo o capa queratinizada. Estos estratos poseen diferente morfología y representan un proceso de maduración progresiva, es decir, el último de estos se descama de forma continua y es igualmente reemplazado por las células de los estratos inferiores (1) (2).

El estrato germinativo o basal es el único lugar en donde se lleva a cabo la mitosis y sus células se denominan progenitoras. Las células hijas migran hacia la superficie durante su proceso de maduración y adquieren el aspecto característico de las distintas capas por las que pasan. El estrato germinativo es una capa unicelular, adyacente a la lámina propia, formada por células cuboides, en su mayoría queratinocitos, que contienen los organelos habituales como nucleolo, mitocondrias, ribosomas, etc. Además se pueden encontrar también otros tipos de células, como melanocitos, células de Langerhans y linfocitos cuyo número, aunque pequeño en una mucosa sana, se ve aumentado cuando hay una infección (1)(2).

La lámina propia es el tejido conjuntivo situado por debajo del epitelio oral y está constituida por fibroblastos que sintetizan y secretan al exterior las fibras de colágeno, elastina y fibronectina y el gel hidratado de glicosaminoglicanos, que es la sustancia fundamental de este tejido conjuntivo (1).

En Colombia y en el mundo la incidencia de enfermedades y malformaciones que afectan la mucosa oral y que pueden causar la pérdida de ésta es relativamente alta (4). Por ejemplo, según el Ministerio de la Protección Social, en Colombia, uno de cada seiscientos cincuenta niños nace con labio y paladar hendido (4) (5). Estos niños deben someterse a múltiples operaciones en las que se hacen colgajos o extraen grandes porciones de mucosa oral.

Además de estas lesiones existen otras, como los defectos mucogingivales, las heridas de paladar subsecuentes a procedimientos de palatoplastia convencional, las causadas por cirugía periodontal, vestibuloplastia, resección de tumores y cirugías de implantes dentales entre otros (4)(7). Estas lesiones, así como la malformación de labio y paladar hendidos, disminuyen la calidad de vida del paciente desde el punto de vista clínico, socio-cultural y económico, debido a la estética, al funcionamiento defectuoso, al mayor riesgo de infecciones, al dolor y a la molestia severa (6)(7).

Cuando se tiene una lesión de gran tamaño en alguna parte del cuerpo, es necesario reponer cierta parte del tejido u órgano para evitar la pérdida de su función anatómica y fisiológica (4) (7). A fin de realizar este procedimiento, se debe disponer del mismo tipo de tejido u órgano proveniente de la misma persona o de una diferente. Si el órgano o tejido provienen de un donante distinto, injerto tejido homólogo, existirá el problema del rechazo inmunológico. Si provienen del mismo individuo, es decir, tejido autólogo, el problema radicarán en la disponibilidad de éste y la morbilidad del sitio de extracción. Para tratar los defectos mucosos orales existe la posibilidad de injertar mucosa diferente a esta, pero varios estudios han demostrado que cuando se usa piel o mucosa diferente a la oral, el tejido injertado retiene sus características originales por varios años, pudiéndose observar la presencia de anexos, como vellosidades y glándulas sebáceas. Esto resulta incómodo para el paciente, y genera problemas fisiológicos, ya que la textura y humectación de la zona cambian por completo (4) (7-10).

Cuando se utiliza mucosa oral autóloga, la fuente de tejido es muy limitada, pues el área de extensión de ésta es reducida. Además, es importante tener en cuenta que en el sitio de donde se saca el injerto, que generalmente es paladar, queda una lesión que se deja cicatrizar por segunda intención, aumentando así la morbilidad del sitio donante y la posibilidad de que aparezca, en los niños, una hipoplasia maxilar debido a la contracción de la herida (4)(10)(11).

Una manera de superar los problemas antes descritos es extraer pocas células de la mucosa oral del paciente afectado, cultivarlas en el laboratorio, aumentar la población, sembrarlas sobre soportes biodegradables que aporten volumen, incubar y luego injertar el tejido al paciente, es decir, crear una mucosa oral artificial. A estas y otras técnicas se les denomina ingeniería de tejidos (12-14).

La ingeniería de tejidos es la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y de las ciencias naturales para entender la relación estructura-función en los tejidos normales y patológicos de los mamíferos y desarrollar sustitutos biológicos para restaurar, mantener y mejorar sus funciones. Es decir, el uso de células vivas junto con componentes extracelulares para el desarrollo de partes o piezas que permitan restaurar o reemplazar la función del tejido (14).

Y es así como se han obtenido sustitutos de piel, cartílago, mucosa y otros tipos de tejidos, completos o parciales, y que al probarse en animales y humanos han producido resultados alentadores (15). A través de los años, los investigadores de esta disciplina han encontrado técnicas que permiten fabricar soportes o injertos con matrices poliméricas reabsorbibles y

9 Marco teórico
células vivas que al ser implantadas inducen la formación y la remodelación del tejido, para obtener así uno completamente natural e igual al que se ha perdido (12).

Para realizar un tejido artificial es necesario que se utilice un vehículo o matriz que cause una respuesta de inflamación mínima y que sea biodegradable, para evitar otro procedimiento quirúrgico para retirarla, pero que no se degrade antes de que se regenere el tejido, para que pueda servir como guía.

Usando esta aproximación se han desarrollado diferentes sustitutos de mucosa oral. Por ejemplo, están los basados en monocapas, que consisten en una única capa de queratinocitos que es injertada al paciente directamente sobre la herida (6). También, existen los sustitutos bicapa que pueden estar formados de colágeno y silicona; esta última debe ser removida pocos días después de realizado el injerto (6). Es por esto que surgieron después los sustitutos de células sobre matrices de colágeno, bien sea como gel o como malla, que se degradan y evitan al paciente someterse a una segunda cirugía para retirarlos. El gran inconveniente de estos sustitutos es que no han entrado aún al mercado y si entran podrían ser muy costosos, como ocurre con la piel artificial.

Aunque en nuestro país esta área de investigación apenas está surgiendo, algunos grupos de investigación, como el dirigido por la doctora Marta Fontanilla, ya son reconocidos por sus avances. En trabajos previos se estandarizaron los procedimientos para elaborar mallas de colágeno I y para sembrar fibroblastos humanos en dichas mallas. Los resultados obtenidos por el grupo muestran que el cultivo expresa proteínas de la matriz extracelular del tejido conectivo oral y tiene estructura semejante a la natural (16). Por otro lado, la evaluación de tejidos autólogos en lesiones mucosas de conejos, adelantada por nuestro grupo, indica que este tejido artificial carente de epitelio funciona in vivo (17).

Objetivos

El objetivo general de este estudio fue el de establecer el método de cultivo primario de queratinocitos orales y su co-cultivo con fibroblastos orales sembrados en mallas de colágeno I.

Para poder lograr éste objetivo se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

- Estandarizar la metodología de aislamiento y siembra de queratinocitos orales obtenidos a partir de humanos.
- Establecer el procedimiento a seguir para el co-cultivo de los queratinocitos orales con fibroblastos orales sembrados en mallas de colágeno I.

- Caracterizar el co-cultivo por medio de tinciones convencionales, como hematoxilina-eosina, azul de alciano y azul de toluidina, y determinar las características del componente epitelial (estratificación, queratinización y número de capas) y del tejido conectivo (distribución y síntesis de la matriz extracelular).

2. Materiales y métodos

2.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Algunas de las muestras de tejido humano se obtuvieron a partir de voluntarios sanos entre 18 y 30 años de edad, a quienes se les practicaron gingivectomías en procedimientos de alargamiento de coronas. A los pacientes se les informó que las muestras iban a ser utilizadas en un trabajo de investigación y se les solicitó consentimiento informado. Además se obtuvieron muestras de donante cadavérico, de no más de 1 día de fallecido, en el Instituto Nacional de Medicina Legal y por medio de la Red de Transplantes DAVIDA. Las muestras se tomaron de la mucosa oral queratinizada, especialmente de paladar duro y de la encía de la región retro molar. Todas fueron de espesor completo, es decir, epitelio y tejido conectivo.

Las muestras de tejido animal fueron tomadas de conejos de la raza Nueva Zelanda, provenientes del Bioterio Central de la Universidad Nacional de Colombia, de 6 semanas de edad y con un peso promedio de 1.5 Kg. Los tejidos correspondieron a mucosa oral queratinizada, mas específicamente del paladar duro, y todos fueron de espesor completo.

Una vez en el laboratorio se lavaron con buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4), para retirar grasa y tejidos contaminantes y se dejaron en PBS con hipoclorito durante 10 minutos, para eliminar la contaminación microbiana. Posteriormente se lavaron de nuevo con PBS y se dejaron en dispasa (Gibco®, Grand Island, NY, USA) al 0.5% por 16 horas a 4° C, con el

fin de separar el epitelio del tejido conectivo. Una vez transcurrido este tiempo, se separaron dichos tejidos con ayuda de pinzas de disección, bisturí y estereoscopio (zoom2000, Leico).

ASLAMIENTO Y CULTIVO DE QUERATINOCITOS ORALES

Para el aislamiento y cultivo de queratinocitos orales se realizó una disgregación enzimática del epitelio. Se procedió a dejar éste en una mezcla de tripsina (Gibco®,

Grand Island, NY, USA) y colagenasa (Gibco®, Grand Island, NY, USA) al 0.25% y 0.2% respectivamente, diluidas en PBS, durante 30 minutos a 37°C, con agitación.

Al cabo de este tiempo, se añadió medio DMEM suplementado (DMEMs) de la siguiente forma: aminoácidos no esenciales (Gibco®, Grand Island, NY, USA), vitaminas (Gibco®, Grand Island, NY, USA) y piruvato de sodio (Gibco®, Grand Island, NY, USA) todos al 1%, Anfotericina B 25 µg/mL, Penicilina/Estreptomicina 100 UI y 100 µg por 1 mL respectivamente y suero fetal bovino (Gibco®, Grand Island, NY, USA) al 10%. El suero se adiciona para inactivar la acción de las enzimas. Luego esta suspensión celular se centrifugó a 1200 g (Beckman, J2-MC) por 10 minutos, a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de medio DMEMs. Para realizar el conteo de células y la viabilidad se hizo una tinción con Eritrosina B y con ayuda del microscopio (Axiovert25, Zeiss). Una vez establecido el número de células y su viabilidad, estas se sembraron en frascos de cultivo Falcon® (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) con medio de Cultivo DMEMs y se dejaron incubando a 37°C en condiciones definidas hasta obtener monocapa. El medio se cambió por primera vez el día cuatro después de haber sido sembrado el inóculo y luego dos veces por semana.

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO DE QUERATINOCITOS.

Para esto se probó el efecto de la densidad de siembra, el del medio de cultivo y el de la adición de promotores del crecimiento, con el fin de optimizar el cultivo de las células.

- Efecto de la densidad de siembra. La primera variable evaluada fue la densidad de siembra y para esto se ensayaron 22 densidades de siembra comprendidas en el rango de 1440 hasta 137.600 células por cm^2 . Se utilizó como medio de cultivo el DMEMs y fue cambiado dos veces por semana; las observaciones se hicieron en los días 0, 4 y 8, con ayuda del microscopio.
- Efecto de la adición de promotores de crecimiento. Por otra parte se evaluó el efecto que tiene sobre el crecimiento celular la adición de Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) a 10 ng/mL, toxina colérica (TC) a 8,5 ng/L e hidrocortisona (HC) a 0,2 mg/L. Estos se agregaron al cuarto día de haber iniciado el cultivo de los queratinocitos en medio DMEMs y luego con cada cambio de medio, según lo descrito por Lauer et al.,

(21). Para estas comparaciones se llevaron a cabo observaciones de tres semanas y cada ensayo se hizo de forma independiente, es decir, cada una de estas sustancias por separado y comparándolas frente a un blanco, que consistió en el cultivo de las mismas células en el mismo medio. Las observaciones se hicieron cada 2 días.

- Efecto del medio de cultivo. Finalmente se compararon tres medios de cultivo, DMEMs, DMEMs bajo en calcio (Gibco®, Grand Island, NY, USA) y Medio para Queratinocitos (Gibco®, Grand Island, NY, USA), a dos concentraciones de suero fetal bovino diferentes, a 10 y 20 %, cada uno. Las células obtenidas se sembraron en frascos de cultivo Falcon de 12.5 cm² (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) con 3 mL de cada uno de los medios ensayados, a una concentración aproximada de 1'250.000 células por frasco, es decir a una densidad de 100.000 células/ cm². Cada ensayo se realizó por duplicado y se hicieron las observaciones en los días 0, 4 y 8, con ayuda del microscopio. El medio se cambió dos veces por semana. Todo lo anterior se hizo para ver en qué condiciones las células se diferencian menos, forman monocapa más rápido y hay menor desprendimiento. La característica que permite afirmar que las células están diferenciadas o no es el aspecto (como escamas u ovoideas) que presentan al observarlas bajo el microscopio.
- Subcultivos o pasajes. Para obtener subcultivos o pasajes de los queratinocitos orales se probó su disgregación con dos concentraciones diferentes de una mezcla de tripsina y EDTA. Una vez obtenido los cultivos confluentes, se retiró el medio y se lavaron las cajas 3 veces con PBS. Luego se adicionó en el frasco de cultivo 1 mL de la mezcla de tripsina al 0.25% y EDTA (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) al 0.02 % y en la otra 1 mL de la mezcla de tripsina al 0.025% y EDTA 0.002 %, es decir, en una dilución uno en diez de la primera mezcla. Las mezclas se dejaron actuar hasta desprendimiento celular (aproximadamente 30 minutos), y luego se inactivó su acción con 1 mL de DMEMs. Posteriormente se sometieron a centrifugación y los pellets obtenidos se resuspendieron independientemente en 1 mL de DMEMs, para ser distribuidos en 2 nuevos frascos de cultivos (31).

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS ORALES

Método de explantes. Se hicieron cortes del tejido conectivo aislado, de aproximadamente 1 mm^2 , se colocaron en el frasco de cultivo de 25 cm^2 a una distancia de 0.5 cm entre ellos, se dejaron secar por 30 minutos y una vez adheridos al plato se añadieron 5mL de medio DMEMs. Se incubó a 37°C en las condiciones establecidas hasta obtener una monocapa de células. El medio se cambió dos veces por semana.

Subcultivos o pasajes. Con el fin de aumentar la población de los fibroblastos, se realizaron dos subcultivos o pasajes de dichas célula, antes de sembrarlas en las matrices de colágeno. Para los subcultivos se realizó el mismo procedimiento que para los queratinocitos (sección 5.3) utilizando la mezcla de tripsina y EDTA, 0.25% y 0.02%, respectivamente; esta se dejó actuar por solo 10 minutos.

MATRICES DE COLÁGENO I

Aislamiento y purificación del colágeno I. La obtención del colágeno a partir de colas de rata, procedentes del Bioterio Central de la Universidad Nacional de Colombia, se hizo siguiendo el procedimiento descrito por Pérez *et al.*, (22). Las colas de rata se preservaron a -20°C hasta el día de su utilización. Luego se descongelaron con etanol al 70%, se despojaron de la piel, se retiraron los tendones y se cortaron en pedazos pequeños. Después estos se sumergieron en ácido acético 0.01M y se mantuvieron a 4°C por 14 días.

Una vez transcurrido este tiempo se procedió a centrifugar a 12000 g por 15 minutos a temperatura ambiente, y a separar el sobrenadante. Éste fue tratado con NaOH 0.1 N en cantidad suficiente para ajustar el pH a 9, sometido a agitación fuerte y centrifugado a 12000 g durante 10 minutos y a temperatura ambiente. El precipitado se disolvió en la mínima cantidad de ácido acético 0.01 N y a dicha solución se le midió la concentración de colágeno por medio de la espectroscopia de absorción al ultravioleta. Una vez conocida la concentración del colágeno extraído se ajustó a 2 mg/mL. Luego se homogenizó (homogenizador Ultraturrax T-25 basic S1, IKA WORKS, INC.) y se vertió en cajas de cultivo de 60 mm (Becton, Dickinson Labware, NJ, USA) cubiertas con papel parafinado. Inmediatamente después fueron llevadas a -20°C , para luego ser liofilizadas (Virtis Gardiner, N.Y., 12525, Modelo 10-145 MR-BA) por 48 horas.

A continuación, las mallas se secaron por 24 horas en estufa a 105°C , se sumergieron en una solución de glutaraldehído al 0.02% en ácido acético 0.05 M por 24 horas, se retiraron, se lavaron con etanol al 15% y luego con agua y se llevaron a -20°C . Luego de

estar congeladas se liofilizaron de nuevo por 16 horas. Para poder garantizar un ambiente estéril y adecuado para el cultivo, las mallas se esterilizaron con óxido de etileno y se dejaron airear por 24 horas.

CULTIVO TRIDIMENSIONAL

Una vez obtenidas las mallas de colágeno I, estas se pusieron en cajas de 12 pozos ((Becton Dickinson Labware NJ, USA) y se procedió a sembrar en ellas los fibroblastos orales del segundo subcultivo. Para llevar a cabo esto, fue necesario dejar las mallas con medio (DMEM) suplementado con 50 % de suero fetal bovino por 24 horas a 37° C y luego cambiarlo por medio DMEMs en el momento de la siembra de los fibroblastos (16). Dichas células se disgregaron con tripsina 0.25% y EDTA 0.025 % por 10 minutos a 37°C y se adicionó medio suplementado con suero, para inhibir la acción de la enzima.

Luego se centrifugó a 1200 rpm, por 10 minutos, a temperatura ambiente y se resuspendió el precipitado en 1 mL de medio DMEMs fresco. Después, las células resuspendidas se sembraron en las mallas, con una densidad de siembra de 1. 000.000 cel/cm² y se dejaron por 4 horas a 37° C con agitación. Al cabo de las 4 horas se suspendió la agitación y se continuó con la incubación a 37°C con las condiciones establecidas (Anexo 2). El medio DMEMs se cambió 4 veces por semana.

Para la siembra de los queratinocitos se esperó a que transcurrieran dos semanas después de la siembra de los fibroblastos. Para esto se lavaron también las cajas con PBS y se adicionó Dispasa 0.5% por 40 minutos. Luego se levantó la lámina de queratinocitos con ayuda de pinzas y se puso sobre la malla sembrada con fibroblastos. Además en uno de los ensayos se utilizó fibrina, obtenida de sangre humana, para pegar la lámina de queratinocitos a la malla de colágeno sembrada con fibroblastos. Se esperó 1 semana para hacer la tinción histológica de dichos cultivos.

Además, se tuvo presente que el medio de cultivo (DMEMs) llegase hasta el borde de la malla, esto es, al mismo nivel donde estaban sembrados los queratinocitos para que estos estuvieran en la interfase aire-liquido, de acuerdo con lo sugerido por varios autores (27) (32).

Resultados

Cuando el epitelio oral se sometió a disgregación enzimática con tripsina y colagenasa a 37 °C por 30 min se obtuvo una alta viabilidad celular, en promedio 80 % y un alto número

de células. Al sembrar los queratinocitos disgregados en las cajas, se encontró que se adherían fácilmente al plato, pero que su proliferación dependía de la densidad celular. Al sembrar menos de 80.000 cel/cm^2 no se observó proliferación celular. Por este método se obtuvieron cultivos confluentes a los 8 días y las células presentaron una morfología característica de los queratinocitos.

Después de 20 días de cultivadas las células, se encontró que estas comenzaban a estratificarse en la caja de cultivo y que al adicionar dispasa 0.5% se desprendía una lámina de las células. Al cabo de 25 días de haber sembrado las células se observó cómo las células comenzaron a desprenderse del plato de cultivo. Todo lo anterior se vio tanto para queratinocitos orales humanos como para los de conejo.

Escogencia del medio de cultivo. El primer día de cultivo se observó que se adherían más células en los cultivos en los que se utilizó el suero al 20%, y medio para queratinocitos. En todos los cultivos se observaron múltiples aglomerados de células redondeadas, como pequeñas islas, distribuidas sobre todo el sustrato. Al cuarto día, se observan las mismas islas o aglomerados pero de un tamaño mayor y vio una mayor diferenciación celular en los cultivos con 20% de suero. Al octavo día se encontró que el crecimiento era más rápido con el Medio para Queratinocitos y con suero fetal bovino al 10%, que con los demás medios. Además que no había tanta diferenciación celular como con el medio al 20 % de suero fetal bovino. Con ninguno de estos medios se observó desprendimiento celular en el lapso de tiempo de este experimento.

Determinación de la densidad de siembra. Se encontró que la densidad óptima de cultivo de los queratinocitos está alrededor de $90.000 \text{ células por cm}^2$. Por debajo de $75.000 \text{ células por cm}^2$ no se observó crecimiento celular, pero por encima de 110.000 se obtuvieron cultivos subconfluentes. Efecto de la adición de diferentes promotores de crecimiento. Se encontró que no había diferencia en el aspecto de los cultivos de queratinocitos, al adicionarles toxina cólica o hidrocortisona. Pero que si había mejores resultados, es decir un mayor crecimiento y menor desprendimiento celular si se les adicionaba EFG (factor de crecimiento epidermal).

Subcultivos o pasajes. Al probar las mezclas de tripsina y EDTA se encontró que la mezcla más diluida de ambas sustancias, la de tripsina 0.025% y EDTA 0.002 %, era la mejor, debido a que las células sobrevivían y formaban de nuevo una monocapa.

2.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS

Se obtuvieron cultivos primarios que adquirieron confluencia entre los 20 y 30 días. Las células mostraron una morfología característica de los fibroblastos y no presentaron signos típicos de estrés o muerte celular.

ELABORACIÓN DE LAS MATRICES DE COLÁGENO

Se obtuvieron mallas de colágeno con características muy similares a las obtenidas en trabajos previos a éste. Eran mallas firmes, porosas, blancas y suaves al tacto.

CO-CULTIVO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS ORALES.

A los pocos días de sembrar los fibroblastos en las mallas, se empieza a ver cómo estas metabolizan rápidamente el medio. Al observar las mallas al microscopio es muy difícil ver las células, por lo que fue necesario evaluar el tejido por cortes y tinciones. Dos semanas después de sembrados los fibroblastos se siembran los queratinocitos. Al despegar la lámina y ponerla sobre la malla se tuvo en cuenta que la cara basal de las células epiteliales, es decir, la cara de la lámina que estaba en contacto con el sustrato, quedara unida a la malla. Se vio que las mallas seguían metabolizando el medio, lo cual es un síntoma de que hay actividad celular.

En las fotografías capturadas a partir del co-cultivo, se puede afirmar que el componente epitelial está formado por varias capas de queratinocitos, que están en la parte superior de la malla y que no tiene queratina en su superficie. Por lo tanto, se puede decir que es un epitelio estratificado y no queratinizado. También se pudo notar como el componente epitelial está íntimamente unido a las fibras del colágeno. El objetivo principal de este estudio fue estandarizar la metodología a seguir para la elaboración de un sustituto artificial de mucosa oral, ya que se reconoce la importancia que tienen estos sustitutos en el tratamiento de lesiones de gran tamaño de dicha mucosa. Se debe recalcar que el sustituto elaborado se asemeja al tejido original, porque está compuesto de los dos tipos de células que predominan en la mucosa oral, células epiteliales y fibroblastos, y porque estas células están organizadas de una forma similar a la de dicho tejido.

Aunque se llevó a cabo la estandarización del cultivo de queratinocitos con muestras obtenidas de humanos, el co-cultivo debió realizarse con muestras de conejo por escasez de aquel tipo de muestra. Se escogieron estos animales como la fuente de obtención de las muestras gracias a que en trabajos previos se demostró que la mucosa oral de dicha

especie es similar a la humana (4), y, además, por la facilidad que ofrece el laboratorio para obtener este tipo de muestras.

Como la mayoría de las lesiones de la mucosa oral se presentan en el tejido gingival y en el paladar (33), las muestras de tejido se tomaron de estos sitios para obtener así un sustituto con características similares a las del receptor. Es importante explicar que se tomaron muestras de espesor completo, compuestas de tejido epitelial y tejido conectivo para aislar y cultivar ambos tipos de células. Al trabajar con cadáveres, tanto humanos como animales, es importante que no tengan más de un día; de lo contrario el tejido estaría descompuesto y sería difícil de cultivar. Por otro lado, debe tenerse en cuenta el estado sanitario del tejido del cual se extrae la muestra, ya que si está excesivamente inflamado o deteriorado las células a aislar no proliferarán.

Análisis y discusión

El objetivo principal de este estudio fue estandarizar la metodología a seguir para la elaboración de un sustituto artificial de mucosa oral, ya que se reconoce la importancia que tienen estos sustitutos en el tratamiento de lesiones de gran tamaño de dicha mucosa. Se debe recalcar que el sustituto elaborado se asemeja al tejido original, porque está compuesto de los dos tipos de células que predominan en la mucosa oral, células epiteliales y fibroblastos, y porque estas células están organizadas de una forma similar a la de dicho tejido. Aunque se llevó a cabo la estandarización del cultivo de queratinocitos con muestras obtenidas de humanos, el co-cultivo debió realizarse con muestras de conejo por escasez de aquel tipo de muestra. Se escogieron estos animales como la fuente de obtención de las muestras gracias a que en trabajos previos se demostró que la mucosa oral de dicha especie es similar a la humana (4), y, además, por la facilidad que ofrece el laboratorio para obtener este tipo de muestras. Como la mayoría de las lesiones de la mucosa oral se presentan en el tejido gingival y en el paladar (33), las muestras de tejido se tomaron de estos sitios para obtener así un sustituto con características similares a las del receptor. Es importante explicar que se tomaron muestras de espesor completo, compuestas de tejido epitelial y tejido conectivo para aislar y cultivar ambos tipos de células. Al trabajar con cadáveres, tanto humanos como animales, es importante que no tengan más de un día; de lo contrario el tejido estaría descompuesto y sería difícil de cultivar. Por otro lado, debe tenerse en cuenta el estado sanitario del tejido del cual se extrae la muestra, ya que si está excesivamente inflamado o deteriorado las células a aislar no proliferarán.

En vista del resultado anterior se dedujo que lo primero que se debe hacer para obtener el sustituto de mucosa oral de espesor completo es separar el tejido epitelial del tejido conectivo, para cultivarlos por separado y poder aumentar así su población, obteniendo de esta forma cultivos celulares independientes y puros. Para esto se utilizó dispasa (32), que es una metaloproteinasa capaz de cortar la mucosa oral por su membrana basal, sin disgregar ninguno de los dos tejidos. Aprovechando la capacidad de esta enzima de no disociar las células epiteliales se utilizó para separar la lámina de queratinocitos de la caja de cultivo en el momento de realizar el co-cultivo.

Al sembrar los queratinocitos a menos de 75.000 células por cm^2 no hubo proliferación celular, porque los queratinocitos requieren una alta densidad celular para poder proliferar.

Es importante subrayar que la densidad de siembra del inóculo es crítica en el momento de realizar el cultivo. Según los resultados que arroja este trabajo, las densidades de siembra del inóculo deben encontrarse entre 75.000 y 110.000 células por cm^2 , ya que al superar este valor las células no se esparcen de manera apropiada sobre el sustrato y tampoco llegan al estado confluyente.

Para la optimización del cultivo de queratinocitos se probaron tres medios: el DMEM, DMEM bajo en calcio y Medio para queratinocitos. Se probó el primero, porque es el más utilizado en nuestro laboratorio y permite el crecimiento de diferentes tipos de células. El medio DMEM bajo en calcio, ya que este último es un ión que, a bajas concentraciones, evita la diferenciación de las células epiteliales. Y por último, el Medio para queratinocitos, porque es especializado para este tipo de células.

Las células cultivadas en medio DMEM bajo en calcio no llegaron a confluencia tan rápido como las cultivadas en los otros dos medios. Esto podría explicarse por la influencia que tiene el ión calcio sobre la adhesión de los queratinocitos al sustrato, ya que muchas de las proteínas de unión entre las células y el sustrato y entre las mismas células son dependientes de calcio. El medio que presentó los mejores resultados fue el Medio para queratinocitos, luego el DMEM y luego el DMEM bajo en calcio.

Para la comparación de medios y concentraciones de suero, se realizaron las observaciones en los días 1, 4 y 8, porque es en el día 1 cuando se determina si las

células se adhieren o no al sustrato; en el día cuatro se cambia por primera vez el medio y se puede apreciar el

49 Análisis de Resultados

progreso del cultivo y si las células se adhirieron al plato; ya en el día 8 se observa el área del sustrato ocupado por las células y si llegan o no a la confluencia.

Los otros experimentos que se realizaron en este trabajo consistieron en agregar sustancias que promueven el crecimiento de los queratinocitos, como la toxina colérica, la hidrocortisona y el factor de crecimiento epidermal (EGF), y comparar los resultados con blancos, a fin de establecer si estas sustancias permiten obtener monocapas en un menor tiempo. Esto se hizo porque, según lo reportado en la literatura, estas sustancias facilitan la obtención de cultivos confluentes de queratinocitos en un menor tiempo. Los resultados que arroja la adición de toxina colérica e hidrocortisona no permitieron ver ninguna diferencia con los blancos, lo que podría explicarse con dos hipótesis. De acuerdo con la primera, el suero aporta la mayoría de factores promotores del crecimiento, como ya se mencionó, y adicionar las mencionadas sustancias, además del suero, no produce un cambio notable en el crecimiento. Es por esto que se recomienda hacer estas comparaciones en medios libres de suero. Y según la segunda hipótesis, este efecto solo puede medirse si se hace un análisis cuantitativo, y no cualitativo como el de este caso.

Con el factor de crecimiento epidermal se observó una mayor proliferación celular. Este efecto puede deberse a 1) la baja concentración de este factor en el suero fetal bovino y 2) a que como este efecto es tan pronunciado se percibe a simple vista, a diferencia del efecto de la Toxina Colérica e Hidrocortisona.

Los subcultivos permiten obtener células puras y una mayor población celular, lo que es una ventaja cuando se quiere obtener un sustituto del tejido. Esto permite obtener una gran extensión de tejido cultivado, a partir de una muestra pequeña.

Cuando se hacen los pasajes de las células epiteliales, es necesario tener en cuenta varios aspectos. El primero de ellos es despegar las células del plato en el momento de la disgregación; el segundo es permitir que se adhieran de nuevo a éste y, finalmente, que sobrevivan después de terminarse este proceso. Usar una alta concentración de enzima o EDTA no permite que las células se adhieran de nuevo, ya que se mueren o sus proteínas de unión se deterioran.

Dentro del procedimiento es necesario tener puntos de control para garantizar que las células correspondan al linaje deseado. Es por esto que se realizó la inmunohistoquímica del cultivo de queratinocitos. Tal y como se muestra en los resultados estas células sí corresponden al tejido epitelial. Esto puede explicarse gracias a que los anticuerpos utilizados reaccionan con un gran grupo de queratinas, tanto básicas ($pI > 6.0$), como ácidas ($pI < 5.7$), características del citoesqueleto de las células epiteliales.

Para poder poblar rápidamente las mallas de colágeno es necesario sembrar los fibroblastos en altas concentraciones, lo cual implica generar un número significativo de fibroblastos mediante subcultivos. Para este trabajo se realizaron dos pasajes de dichas células.

El colágeno es una proteína que se encuentra de forma abundante en los tejidos conectivos, como la dermis, el tendón y el cartílago, entre otros. Para la elaboración de las mallas de colágeno I se utilizaron las colas de rata porque tienen un alto porcentaje de tejido tendinoso y porque son desechadas normalmente, cuando se experimenta con estos animales (36).

En la caracterización histológica del co-cultivo se pudo observar que el tejido epitelial se estratificó pero no formó lámina basal. Esto se debe a que no se propiciaron las condiciones adecuadas que permiten esta transformación. En cuanto a las condiciones se puede afirmar que: 1) el tiempo de co-cultivo fue muy corto, por lo tanto no se le permitió a las células epiteliales formar las uniones desmosómicas, es decir las uniones entre las células y la matriz extracelular (32).

3. Conclusiones

- a. Con algunas modificaciones realizadas a los procedimientos encontrados en la literatura, se pudo estandarizar la metodología a seguir para el cultivo de queratinocitos orales aislados no solo de humanos sino también de conejos.
- b. Se pudo estandarizar la metodología a seguir para el subcultivo de queratinocitos orales hasta el segundo pasaje.
- c. Con algunas modificaciones hechas a los procedimientos encontrados en la bibliografía, se pudo estandarizar la técnica a seguir para la detección de citoqueratinas en el epitelio oral cultivado por medio de la técnica de inmunohistoquímica.
- d. Se pudo establecer la metodología a seguir para la obtención de co-cultivos de queratinocitos orales con fibroblastos orales sembrados en mallas de colágeno I.

Bibliografía

1. Berkovitz B.K.B., Holand G.R., Moxham B.J. Atlas en color y texto de Anatomía Oral, Histología y Embriología, Moví/Doyma Libros, Madrid, 1992, pg 199-210.
2. Gorlin Robert J., Goldman Henry M. THOMA, Patología Oral, SALVAT Editores, 1a edición 1975, Barcelona, pg 438-452, 849-60.
3. Squier C.A., Finkelstein M.W., ORAL MUCOSA In: Oral Histology, Development, Structure and Function. 6th edition. 2003. Edited by: Strassburg, M Quintessence Books, pg: 20-27.
4. Bello S.A., Fontanilla M.R. Desarrollo y caracterización de tejido conectivo artificial de mucosa oral. Biomédica. (2002); 22 (1): 77. (Memorias II Congreso Nacional de Investigación y Salud).
5. REPÚBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. III Estudio Nacional de Salud Bucal-ENSAB III. Tomo VII. 1999. pg 153.
6. Bello S. A., Peña J, Estrada L. E., Fontanilla M. R. Sustitutos de la mucosa oral, creados mediante ingeniería tisular: una alternativa para la reconstrucción de defectos de mucosa oral. Revista CES Odontología. Volumen 14 (1), 2001. Pg 55-64.
7. Hillerup S. Grafting of Skin and Oral Mucosa In the Oral And Maxillofacial Regions. Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America. 1993. 5 (4):557- 77.
8. Jones T, Lee G, Emami B, Strasberg S. Free colon transfer for resurfacing large oral cavity defects. Plast Reconstr Surg 1995; 96: 1092- 99.
9. Hillerup S. Preprosthetic mandibular vestibuloplasty with split-skin graft. Int J Oral Maxillofac Surg 1987; 16: 270-78.
10. Ophof R, Van Rheden REM, Von den Hoff JW, Schalkwijk J, Kuijpers-Jagtman AM. Oral keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue. Biomaterials 2002; 23: 3741-48.
11. Fujioka M, Fujii T. Maxillary growth following atelocollagen implantation on mucoperiosteal denudation of the palatal process in young rabbits: implication for clinical cleft palate repair. Cleft Palate-Craniofac J 1997; 34(4): 297- 308.

12. Kaigler D, Money D. Tissue Engineering`s Impact on Dentistry. Journal of Dental Education 2001; 65 (5): 456-62.
13. Kaihara S, Vacanti J. Tissue engineering: Toward New Solution for Transplantation and Reconstructive Surgery. Arch Surg 1999; 134: 1184 -88.
14. Nerem R. Cellular Engineering. Annals of Biomedical Engineering 1991; 19: 529-545.
15. Miller, MJ., Patrick, CW., Tissue engineering . Clinics in Plastic Surgery. 2003, 30 (1): 99-106.
16. Bello S. A. 2002. Desarrollo y caracterización de tejido conectivo artificial de mucosa oral. Bogotá D.C., 76 p. Trabajo de grado (Magister en Ciencias - Microbiología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
17. Fontanilla M.R., Bello S.A., Pereira R., Cortés J. Evaluation of autologous artificial connective tissue as grafting material on rabbit oral mucosa lesions. Manuscrito enviado a la revista Biomaterials.
18. Garner, Warren L. Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. Plastic and reconstructive Surgery.1998, 102, (1):135-139.
19. Jepsen A, MacCallum D, Lilie J, Fine Structure of Subcultivated Stratified Squamous Epithelium. Experimental Cell Research. 1980, 125: 141-152.
20. Kedjanure, U., Pongprerachok, S., Arpornmaeklong, P., Ungkusonmongkhon, K., Culturing Primary Human Gingival epithelial Cells: Comparison of Two Isolation Techniques. Journal of Cranio –Maxillofacial Surgery. 2001, 29: 224-231.
21. Lauer G, Siegmund C, Hubner U, Influence of Donor Age and Culture Conditions on Tissue engineering of mucosa autografts. Int. J. Oral Maxillofacial Surg. 2003; 32: 305-312.
22. Pérez S., Doncel A., Roa C. L., Fontanilla M.R., Estandarización de un método para la elaboración de un análogo de dermis humana. Revista colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 30 (1):9-15.
23. Balaguera H. Estandarización de un método de cultivo tridimensional de condrocitos aislados de cartílago hialino.
24. Kalb V, Bernlohr R. A New Spectrophotometric Assay for Protein in Cell Extracts. Analytical Biochemistry. 1997, 82: 362-371.
25. Stoscheck C. Quantitation of Protein. General Methods for Handling Proteins and Enzymes. Methods in Enzymology. 1990,182, 50-68.

26. Martínez M. "Caracterización morfológica y bioquímica de subpoblaciones neuronales que se infectan preferencialmente con el virus de rabia en cultivos primarios de ganglio de la raíz dorsal". Laboratorio de Neurociencias. Instituto nacional de salud. Tesis de grado. M.Sc. Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Diciembre de 2002.
27. Freshney I. Culture of Animal Cells. 2000 John Wiley & Sons; 4th edition.
28. Izumi, K. , Tackacs G., Terashi H., Feinberg S. 1999. Ex vivo development of a composite human oral equivalent. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 57: 571-577.
29. Rheinwald, J.C., and Green, H., 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes. The formation of keratinizing colonies from single cells. Cell. 6; 331-344.
30. Reid. C., Cloos J., Braakhuis, B., Snow, G., 1997. A simple and reliable technique for culturing of human oral keratinocytes and fibroblasts. Acta Otolaryngol. 117: 628-633.
31. Watt, F., 1998. Cultivation of Human Epidermal Keratinocytes with 3T3 Feeder Layer. Cell Biology: A laboratory handbook. Cell and Tissue Culture and Associated Technique. Second Edition. Vol 1. Academic Press. 113-118.
32. Tomakidi. P., Fusenig, N., Kohl, A., Komposch, G., 1997. Histomorphological and biochemical differentiation capacity in organotypic co-cultures of primary gingival cells. J. Periodont Res; 32: 388-400.
33. Bascones, A., Atlas de patología de la mucosa bucal. 1999. Madrid. Ediciones Avances.
34. Liébana, J., Microbiología Oral. 1997. Mc Graw Hill. N.Y. pg 11-30.
35. Gibco Cell Culture Catalog. 2004. Invitrogen life technologies. Carlsbad California. Pg R-13.
36. Daamen, W.F., van Moerke, H., Hafmans, T., Buttafoco, L., Poot, A., Veerkamp J., van Kuppevelt, J. 2003. Preparation and evaluation of molecular-

defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue Engineering. Biomaterials; 24: 4001-4009.

37. Hrapchak, S., Theory and Practice of Histotechnology. Second edition. Mosby. London.