

IDENTIFICACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE CITOQUERATINAS 8, 13, 19, DESMOPLAQUINA Y DESMOGLEÍNA EN CÉLULAS MADRE DE LA PAPILA APICAL. *EX VIVO*. PRUEBA PILOTO.

Identification by immunofluorescence of markers in mesenchymal cells of the apical papilla cytokeratins 8, 13 and 19, desmoplakin, desmogleína.

Diego Rodriguez Reyes¹, Christian Huertas Torres², Julian Vera³, Camilo Alfonso Rodriguez⁴, Gustavo Jaimes Monroy⁵.

¹Estudiante Quinto Semestre Posgrado Periodoncia Universidad Antonio Nariño, dierodriguez71@uan.edu.co, carrera 1 # 47^a - 15, Bogotá, Colombia.

²Estudiante Quinto Semestre Posgrado Periodoncia Universidad Antonio Nariño, chuertas79@uan.edu.co, carrera 1 # 47^a - 15, Bogotá, Colombia.

³Estudiante Quinto Semestre Posgrado Periodoncia Universidad Antonio Nariño, juliavera@uan.edu.co, carrera 1 # 47^a - 15, Bogotá, Colombia.

⁴PhD Ingeniería Tisular, Director de Posgrado Especialización de Periodoncia Universidad Antonio Nariño, kamiloalfonso@uan.edu.co, carrera 1 # 47^a - 15, Bogotá, Colombia.

⁵MsC, Profesor área de Investigación Universidad Antonio Nariño, tavojaimes@uan.edu.co, carrera 1 # 47^a - 15, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Las células madre de la papila apical tienen excelentes propiedades de diferenciación y gran potencial de uso en protocolos de ingeniería tisular, sin embargo, el potencial de diferenciación epitelial no ha sido explorado con este tipo de células. El objetivo es analizar la expresión de citoqueratinas 8, 13, y 19, desmoplaquina y desmogleína mediante inmunofluorescencia. **Materiales y Métodos:** Se realizaron cultivos celulares de tejido de papila apical mediante técnica de explante de pacientes donadores sanos. Se realizó caracterización celular mediante citometría de flujo, se analizó por medio de inmunofluorescencia la expresión de citoqueratinas 8, 13 y 19, desmoplaquina y desmogleína. **Resultados:** Las células de la papila apical expresaron citoqueratina 8, 13 y 19 desmoplaquina y desmogleína, observado a través de la técnica inmunofluorescencia, la cual se le aplicó a las células del cuarto pase que demostraron una viabilidad celular del 86.76% por medio de citometría de flujo y azul de tripano. **Conclusiones:** Las células madre de la papila apical expresan marcadores epiteliales y soportan la idea que podrían ser usadas como una fuente alternativa para desarrollar protocolos de mucosa oral artificial.

INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos se define como "la reconstitución de tejidos y órganos, *in vitro*, para usar como sistemas modelo en investigación básica y aplicada o para usar como injertos para reemplazar partes o funciones corporales dañadas o enfermas". En el campo de la cirugía oral y maxilofacial, esto se aplica a través de los esfuerzos reconstructivos necesarios para el tratamiento de traumatismos, resección tumoral y para reparar deformidades congénitas (1). En el área odontológica es de gran interés al ir encaminada a construir tejidos de la cavidad bucal dentro de los cuales se puede resaltar la mucosa oral (2).

La mucosa oral puede verse afectada generalmente por enfermedad periodontal, afectaciones sistémicas o trastornos médicos (7). Actualmente las diferentes necesidades de materiales de regeneración de tejidos se suple con: autoinjertos, xenoinjertos y sintéticos (3), pero en algunos casos por extensiones en los defectos resultan escasos estos materiales de primera elección. La mucosa oral elaborada por ingeniería tisular podría contribuir a resolver estos problemas (8).

Se han publicado estudios de elaboración de mucosa artificial donde se utilizaron células tipo fibroblastos y queratinocitos (8), sin embargo, no se ha logrado obtener un tejido idéntico al nativo. Se ha encontrado que los queratinocitos presentan dificultades en su cultivo, obtención y proliferación (9), siendo necesario buscar otras alternativas celulares para utilizarlas en estos andamios para la creación de órganos y tejidos. Con respecto a este proceso hay pocos estudios que involucren dichas alternativas. Garzón y Cols (10), realizaron un estudio con células heterogéneas de cordón umbilical encontrando gran capacidad de proliferación, diferenciación y expresión de marcadores epiteliales que corresponden a citoqueratinas 7, 8, 19, 4, 13 y 3 al igual que desmoplaquina y zona ocludens. En otro estudio de Garzón y colaboradores (11), estudiaron la diferenciación de las células de la gelatina de Wharton (HWJSC) a células epiteliales de la mucosa oral y piel *in vivo* e *in vitro*, encontrando que solo se diferenciaban *in vivo* expresando los siguientes marcadores: citoqueratinas 1, 4, 8 y 13, placoglobina, filagrina e involucrina. Otra investigación clave de Dogan y Cols (21), abarca estrictamente el estudio de células madre dentales como fuente de células madre primarias para diferenciarse en tejido epitelial y endotelial arrojando expresión de citoqueratinas 18 y 19 (21).

Revisando los estudios existentes y buscando alternativas que permitan obtener diferentes fuentes de células madre que tengan la capacidad de diferenciarse a

células epiteliales no hay evidencia que se haya realizado a partir de células de la papila apical (4). Se ha demostrado que las células madre de papila dental (hPD-SC) se han diferenciado en linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico, demostrando su gran capacidad de diferenciación y a la vez demostrando la facilidad de su cultivo (5).

Las citoqueratinas son proteínas intracelulares del citoesqueleto presentes en el epitelio, al igual que la desmogleína y la desmoplaquina (6). Por lo tanto al ser característicos de este tejido se deben identificar para demostrar la diferenciación a células epiteliales y posterior viabilidad de su estratificación en andamios (scaffold) creados mediante ingeniería tisular.

El objetivo del presente trabajo fue identificar la expresión de marcadores epiteliales: citoqueratinas 8, 13 y 19, desmoplaquina y desmogleína en células mesenquimales de la papila apical mediante inmunofluorescencia y caracterizar mediante la aplicación de técnicas de citometría de flujo.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PAPILA APICAL HUMANA

Previo consentimiento informado y asentimiento por parte de los responsables de los pacientes y por pacientes, se realizaron exodoncias de cuatro terceros molares inferiores indicados para tal fin, de dos pacientes sistémicamente sanos de 14 de años, una vez realizada las exodoncias se extrajo el tejido de la papila apical. Este estudio fue avalado por el comité de Bioética de la investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Antonio Nariño. Es importante resaltar que se realizó explicación a los pacientes y/ o sus responsables frente al procedimiento a realizar, el objetivo del estudio y se aclaró que estos podrían retirarse de la investigación en el momento que lo consideraran.

1.2 CULTIVO CELULAR

Se utilizó la técnica de explante, previamente estandarizada por el grupo de investigación, las muestras fueron lavadas con Solución Salina Buffer Fosfato (PBS) (BG&M®), estas se cortaron en trozos de 2 mm con un bisturí Bard Parker y se colocaron en frascos de 25 cm³, adicionalmente, se agregó Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza®) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Biowest®), L-glutamina 2mm, 5% de antibiótico (Gibco®). Posteriormente las

muestras fueron incubadas a 37°C con 5% (v/v) de CO₂, luego se realizaron controles de crecimiento en un microscopio invertido marca zeiss y se cambió el medio de cultivo cada 72 horas.

1.2 ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Las células fueron cultivadas y atravesaron por cuatro pases, luego de este último, se realiza un ensayo de inmunofluorescencia en el cual se recuperan las células cuando logran una confluencia del 70% sobre la caja de cultivo y se efectúa análisis microscópico para determinar la morfología celular y su capacidad de adherencia a la superficie de cultivo celular.

1.2.2 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar la caracterización celular se utilizó el cuarto pase para identificar marcadores específicos de células madre mesenquimales (14) y se utilizaron los siguientes anticuerpos: CD90 (Affymetrix), CD45 (Affymetrix), CD105 (Affymetrix) y CD34 (LSBio) (utilizando el servicio de Citometría de la Universidad Nacional de Colombia). El citómetro utilizado fue Citómetro de Flujo FACSCanto II - Configuración 4-2-2. Para este ensayo se utilizaron 600.000 células y un microlitro de anticuerpo diluido en 100 µl de PBS.

1.3 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE AZUL DE TRIPANO

Para el conteo celular se tomaron 10µl de células en suspensión obtenidas en cada pase y se colocaron en una cámara de Neubauer para hacer el conteo, para verificar la viabilidad celular se utilizó la tinción de azul de tripano (Lonza) la cual consiste en tomar 10µl de las células tripsinizadas adicionando 10µl de azul de tripano durante 5 minutos. Pasado este tiempo se procedió al análisis bajo microscopía; se tomaron células como vivas aquellas que conservaban su integridad de membrana y como muertas aquellas que estuvieron teñidas de color azul. Se aplicó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de células viables (12) (13).

Fórmula 1. Viabilidad celular

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número Total de células}} * 100$$

1.4 IDENTIFICACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA

Para el ensayo de inmunofluorescencia se seleccionó un cultivo del pase 4 para determinar la expresión de citoqueratinas, desmogleína y desmoplaquina, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia directamente sobre 20.000 células del pase 4 cultivadas en placas de 4 pozos (chamber), para identificar marcadores epiteliales citoqueratinas CK19, CK13, CK8, desmoplaquina y desmogleína, además, se impermeabilizaron las muestras con 0.1% tritón x-100 y posteriormente, se hace un bloqueo con 100µl de suero de cabra (Sigma-Aldrich®).

Las muestras se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios a una concentración de 1:500 (Novus biologicals Cytokeratin® 8, 13 y 19 Desmoplakin, Desmoglein). Después de tres lavados en PBS se incubaron las muestras durante 1 hora en cámara húmeda con anticuerpo secundario FITC anti-mouse a una concentración 1:500. Finalmente, las muestras fueron lavadas y contrastadas con 25µl de solución de montaje fluorescente DAPI (Novus biologicals®). Por último los pozos se cubrieron con cubreobjetos y se realizó el análisis en microscopio de fluorescencia invertido a 20 X (Vanguard 1400FL series).

La expresión de las proteínas se analizó semicuantitativamente y se procesó de la siguiente manera:

1. (+++): alta expresión
2. (++): media expresión
3. (+): leve expresión
4. (+/-): muy baja expresión
5. (-): expresión negativa

Fuerte expresión cuando la población celular evidencia alta intensidad de señal determinado en color verde.

Media expresión cuando la población celular evidencia menor intensidad de señal en color verde.

Baja expresión cuando la población celular evidencia débil señal en color verde.

2. RESULTADOS

2.1 ANÁLISIS CELULAR MICROSCÓPICO

Se analizaron los cuatro pases para evaluar la adherencia a la superficie celular, la morfología y la proliferación, los resultados encontrados en este estudio demostraron que los cultivos de células de la papila apical presentaron adherencia a la superficie del frasco de cultivo. Se observó morfología fibroblastoide con prolongaciones e interconexiones celulares (**Imagen 1**).

Además, se observó incremento en la proliferación celular en los diferentes pases. A partir del 5^{to} día se observó proliferación en el primer pase, el segundo pase se realizó a los 12 días, el tercer y cuarto pase se realizó a los 19 y 26 días respectivamente. El pase cuatro fue utilizado para todas las pruebas propuestas en el apartado metodológico (**imagen 1**).

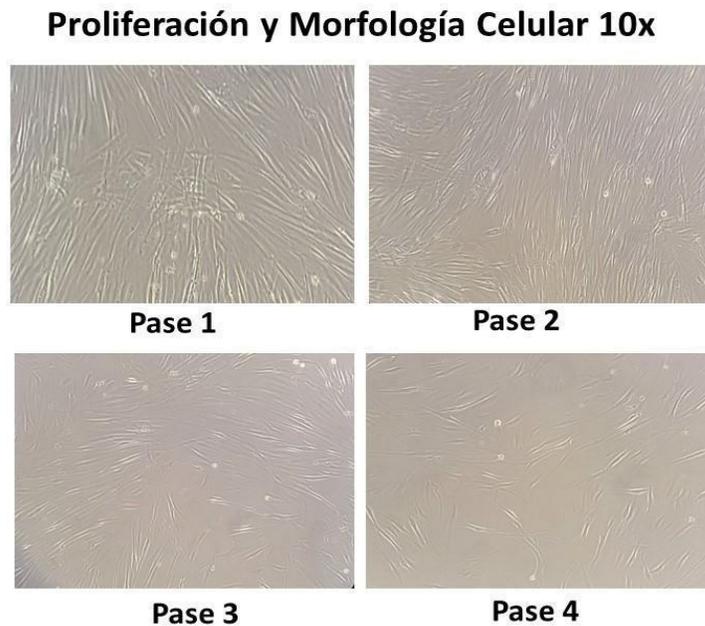
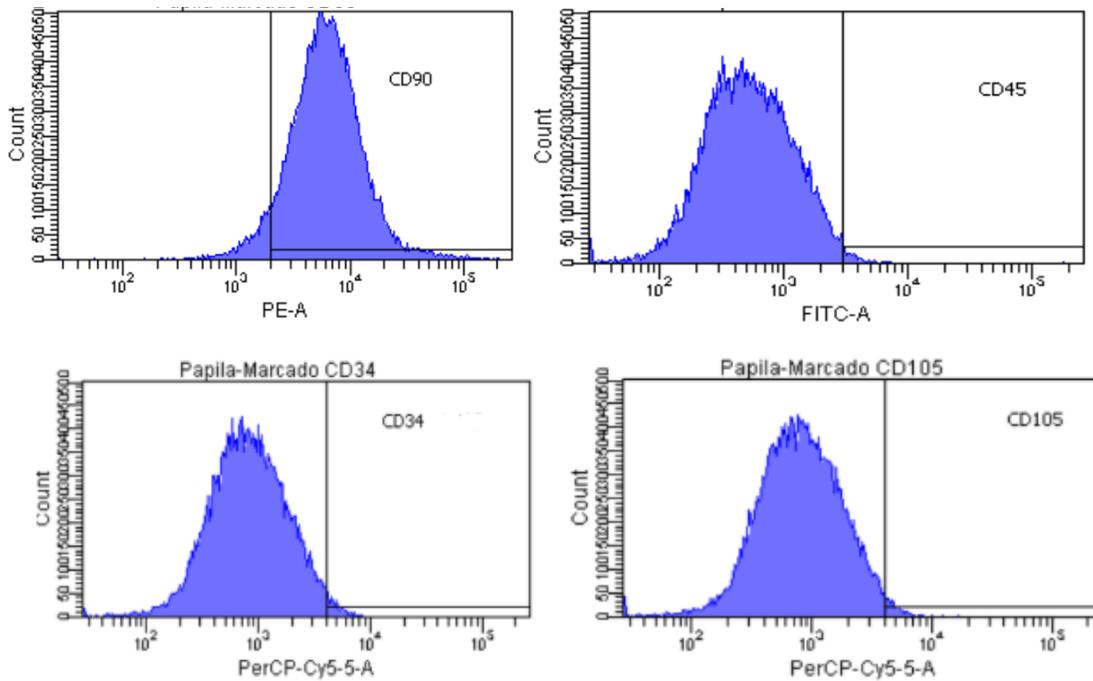


Imagen 1. Cultivo celular: se observa secuencia de proliferación celular del pase 1 al pase 4 y en cada pase una morfología celular típica fibroblastoide; pase 1 al quinto día, pase 2 a los 12 días, pase 3 a los 19 días, pase 4 a los 26 días.

2.2 Caracterización por citometría de flujo

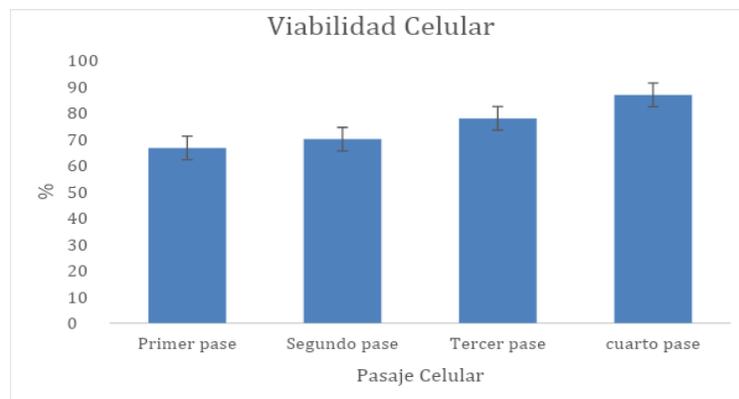
Los resultados de citometría de flujo encontrados en esta investigación reportan que las células mesenquimales de la papila apical presentaron marcadores CD90⁺ en una población del 87,1%, CD45⁻81,0%, CD34⁻86,4% y CD105 83,7% (**Gráfica 1**).



Gráfica 1. Representación gráfica en el que se demuestra la citometría de flujo donde se observan marcadores: CD90 positivo, CD45, CD34, CD15 negativos respectivamente

2.3 Viabilidad celular mediante azul de Tripano

En cuanto a viabilidad celular con ensayo de azul de tripano, se encontró que las células de la papila apical presentaron en el pase 1 un 66,61% de viabilidad, el pase 2 un 69,93%, el tercer pase 77,87% y el pase 4 un 86,78% (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. Análisis de viabilidad celular por medio de azul de tripano, donde se puede observar el incremento porcentual por cada pase.

2.4 ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA

El análisis por inmunofluorescencia de CK8, CK13, CK19, desmogleína y desmoplaquina en el cultivo celular demostró expresión positiva. Los resultados arrojados es este estudio ponen en evidencia una media expresión de citoqueratina 8, 13, desmoplaquina y desmogleína. Por otro lado, se pudo observar alta expresión de citoqueratina 19 (**Tabla 1**) (**Imagen 2**).

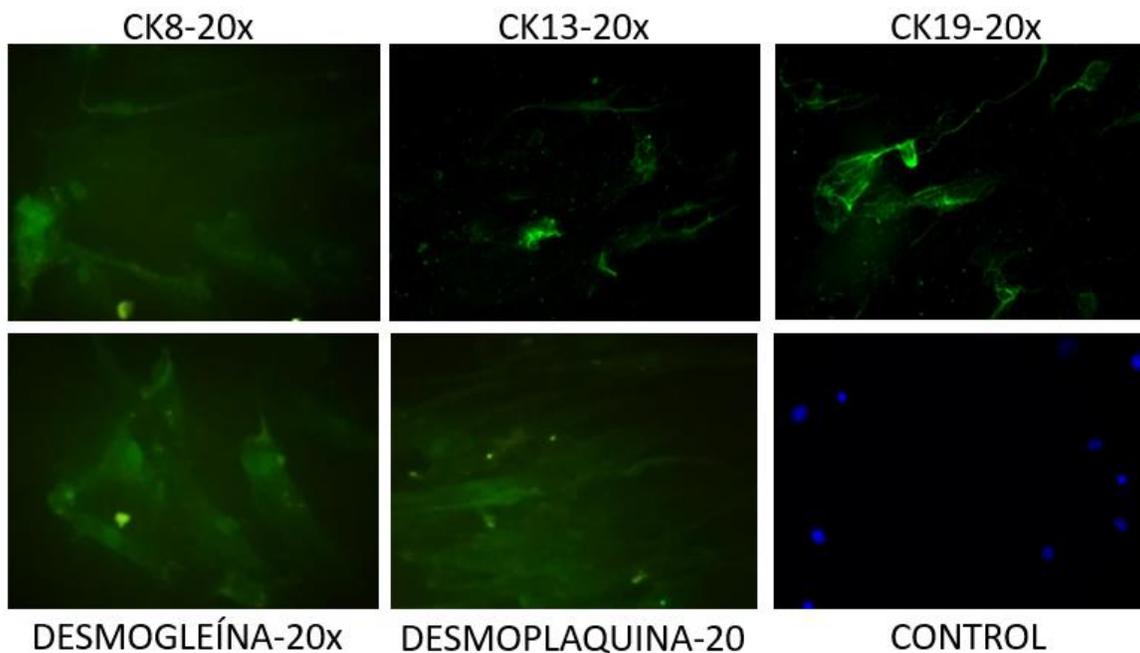


Imagen 2. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de citoqueratinas 8, 13, 19, desmogleína y desmoplaquina en células de papila apical a 20x y grupo control con pigmento celular azul.

Nivel de expresión				
CK8	CK13	CK19	Desmogleína	Desmoplaquina
++	++	+++	++	++

Tabla 1. Expresión citoqueratinas, desmogleína y desmoplaquina analizadas en este trabajo según lo determinado por inmunofluorescencia a 20x en células de papila apical. Todas las células mostraron una media expresión (++) a excepción de la CK19 que tuvo alta expresión (+++).

3. DISCUSIÓN

Las células de la papila apical permiten aislarse fácilmente, con pocas consideraciones éticas y con gran potencial multipotente, cumpliendo así con los criterios mínimos de la sociedad internacional de terapia celular para ser utilizadas en el área de la ingeniería tisular y ofreciendo nuevas perspectivas para las terapias basadas en células (16).

Los resultados encontrados en este estudio frente a proliferación demostraron que las células de la papila apical presentan un gran potencial para células mesenquimales, proliferando más rápido con mayores duplicaciones de población en comparación con otras poblaciones celulares como por ejemplo las de pulpa dental (15), además presentaron buena morfología y adherencia a la superficie plástica, expresión de CD90 y no expresión de CD45, CD34 y CD105, criterios que concuerdan con lo descrito por Dominici (14).

Los resultados obtenidos de caracterización de las células por medio de la técnica de citometría de flujo están en concordancia con lo reportado en otros estudios como el de Xiyao Pang, en donde hubo expresión negativa de CD45 y CD34 y expresión positiva de CD90 y CD105, además Pang y Cols, también observaron las características morfológicas de las células de la papila apical descritas, con una disposición típica fibroblastoide o en forma de huso similar a la descripción que obtuvimos en nuestro estudio (17).

La viabilidad celular que se realizó con azul de tripano permitió obtener un resultado del 86.78% en el cuarto pase; este fue seleccionado para el estudio y se le realizó el análisis por inmunofluorescencia, esto podría ser concordante con lo reportado por Martin-Piedra y Cols, que documentaron resultados que demostraron una viabilidad superior al 85% promedio en células mesenquimales de pulpa dental desde el primer pase (13).

En cuanto a los resultados obtenidos por medio de la técnica de inmunofluorescencia, se pudo observar la expresión de marcadores epiteliales CK8, CK13, CK19, desmogleína y desmoplaquina, este nivel de expresión se consignó de manera semicuantitativa por medio de una escala visual, siendo la CK19 la de mayor expresión, seguidas por las CK8, CK13, desmogleína y desmoplaquina, este es un hallazgo importante ya que no se han estudiado estas proteínas en células mesenquimales de papila apical, estudios similares como el de Garzón y cols, encontraron la expresión de estos marcadores epiteliales, aunque

sin desmogleína, con las mismas técnicas pero en distinta población celular de cordón umbilical (10).

Las desmogleínas son glicoproteínas transmembrana del desmosoma, una estructura fundamental y prominente en los tejidos epiteliales los cuales son fundamentales para una adecuada adhesión celular, esto la hace fundamental en la identificación como marcador típico de las células epiteliales. En el presente estudio se observó una (++) media expresión al análisis por inmunofluorescencia (19).

También se pudo evidenciar la presencia de desmoplaquina bajo la misma técnica de inmunofluorescencia, la cual tuvo una (++) media expresión en este estudio, lo que nos reitera la utilidad de estas células en el campo de la ingeniería tisular en busca de un tejido artificial, ya que esta proteína está presente en los desmosomas, descritas como uniones adhesivas del epitelio simple y estratificado, siendo vitales para la integridad y estabilidad de los tejidos (20).

En este contexto podemos afirmar que esta población celular podría llegar a comportarse como células típicas del epitelio, debido a que estas citoqueratinas las podemos encontrar de forma abundante en epitelio de cavidad oral como lo menciona Roopa S Rao (6). Dados estos resultados en la investigación, se sugiere que estas células se podrían utilizar para la elaboración de mucosa oral artificial, junto con biomateriales utilizados en ingeniería tisular como los descritos por Marañés Gálvez C (18), donde utilizaron fibrina agarosa para la elaboración de una mucosa oral artificial con fibroblastos y queratinocitos.

Las limitaciones del presente estudio, es que el análisis de la inmunofluorescencia no fue realizado de una forma cuantitativa, para futuros trabajos de la línea de investigación surge una oportunidad para analizar cuantitativamente los resultados incorporando las técnicas de microarreglos, adicionalmente, se podrían analizar más citoqueratinas en células de papila apical dado que es posible identificar más expresiones de estas que favorezcan su viabilidad.

CONCLUSIÓN

Los resultados reportados en este trabajo confirman la expresión de marcadores epiteliales citoqueratinas 8, 13 y 19, desmoplaquina y desmogleína en células mesenquimales de papila dental, las cuales presentaron una buena viabilidad y una fuente accesible con alto potencial de proliferación y diferenciación. Por tanto, las células madre de la papila apical emergen como una fuente alternativa para desarrollar protocolos de ingeniería tisular reemplazando las células nativas

epiteliales. Futuros trabajos deben confirmar estos resultados ampliando la variedad de citoqueratinas epiteliales complementando con otras técnicas de análisis celular.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Kim R, Fasi A, Feinberg S. Soft tissue engineering in craniomaxillofacial surgery. *Ann Maxillofac Surg.* 2014; 4 (1): 4-8.
- 2- Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008; 16:1-9.
- 3- Tonetti MS, Cortellini P, Pellegrini G1, Nieri M, Bonaccini D, Allegri M, et al. Xenogenic collagen matrix or autologous connective tissue graft as adjunct to coronally advanced flaps for coverage of multiple adjacent gingival recession: Randomized trial assessing non-inferiority in root coverage and superiority in oral health-related quality of life. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(1):78-88
- 4- Alfonso Rodríguez Camilo, Generación de Mucosa Oral Artificial Por Ingeniería Tisular, Granada España, Universidad de Granada, 2014.
- 5- Karaöz E, Demircan PC, Sağlam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2011; 136(4): 455-473.
- 6- Rao RS, Patil S, Ganavi BS. Oral Cytokeratins in Health and Disease. *J Contemp Dent Pract.* 2014; 15(1):127-36.
- 7- Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Periodontol.* 2018; 89(1):28-45.
- 8- Sanchez-Quevedo M, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 2007; 22(6):631-40.
- 9- Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008; 16:1-9.
- 10- Garzon I, Alfonso-Rodríguez CA, Martínez-Gómez C, Carriel V, Martín-Piedra MA, Fernández-Valadés R, et al. Expression of epithelial markers by human

- umbilical cord stem cells. A topographical analysis. *Placenta*. 2014; 35(12):994-1000.
- 11-Garzón I, Miyake J, González-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sánchez-Quevedo Mdel C, et al. Wharton's Jelly Stem Cells: A Novel Cell Source for Oral Mucosa and Skin Epithelia Regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2(8):625-32.
 - 12-Martin-Piedra M, Garzon I, Oliveira A, Alfonso-Rodriguez CA, Carriel V, Scionti G, et al. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*. 2014; 16(2):266-77.
 - 13-Martin-Piedra M, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodríguez CA, Sánchez-Quevedo M, Campos A, et al. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy*. 2013; 15(4):507-18.
 - 14-Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-17.
 - 15-Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008; 34(2):166-71.
 - 16-Bakopoulou A, About I. Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and Key Milestones towards Clinical Application. *Stem Cells Int*. 2016; 2016:1-20.
 - 17-Pang X, Zhuang Y, Li Z, Jing S, Cai Q, Zhang F, et al. Intermittent Administration of Parathyroid Hormone Enhances Odonto/Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla via JNK and P38 MAPK Pathways. *Stem Cells Int*. 2020; 2020:1-13.
 - 18-Marañés C, Licerias E, Alaminos M, Fernández R, Ruiz A, Garzon I, et al. Generación de un sustituto de mucosa oral humana y comprobación de su viabilidad mediante ingeniería tisular. *Cir Pediatr* 2011; 24: 13-18.
 - 19-Elias P, Matsuyoshi N, Wu H, Lin C, Wang Z, Brown B, et al. Desmoglein Isoform Distribution Affects Stratum Corneum Structure and Function. *J Cell Biol*. 2001; 153(2): 243-50.
 - 20-Mahoney M, Sadowski S, Brennan D, Pikander P, Saukko P, Wahl J, et al. Compound heterozygous desmoplakin mutations result in a phenotype with a combination of myocardial, skin, hair, and enamel abnormalities. *J Invest Dermatol*. 2010; 130(4):968-78.
 - 21-Doğan A, Demirci S, Şahin F. In vitro differentiation of human tooth germ stem cells into endothelial- and epithelial-like cells. *Cell Biol Int*. 2015; 39(1):94-103.

