

# Aplicación del método de bloque celular para evaluar la población de fibroblastos de mucosa oral en ingeniería tisular

## APPLICATION OF THE CELL BLOCK METHOD TO EVALUATE THE POPULATION OF FIBROBLASTS OF ORAL MUCOSA IN TISSUE ENGINEERING

Víctor Carriel (1), Ingrid Garzón (1)

1) Grupo de Ingeniería Tisular, Departamento de Histología de la Universidad de Granada, España.

### Resumen

**Introducción:** En ingeniería tisular es fundamental evaluar la calidad de los cultivos confirmando el linaje celular, pureza, actividad biológica vinculada a proliferación y capacidad de diferenciación celular. Existen varias técnicas para evaluar estos parámetros. El bloque celular (BC) es una técnica utilizada en histopatología para el estudio de muestras citológicas. Nuestro objetivo es aplicar la técnica de BC en cultivo de fibroblastos de mucosa oral para evaluar el linaje y actividad biológica vinculada a proliferación celular.

**Metodología:** El BC se realizó en fibroblastos del pase IV. Fueron fijados en formalina e incluidos en parafina para la realización de los marcadores inmunohistoquímicos PCNA, Vimentina y la tinción de hematoxilina-eosina.

**Resultados:** El método del BC en fibroblastos de mucosa oral permite observar la inmunoreacción para los marcadores PCNA y Vimentina.

**Discusión:** La técnica de BC seguida por inmunohistoquímica confirma el linaje de los fibroblastos y actividad biológica vinculada a proliferación celular.

**Palabras claves:** ingeniería tisular, bloque celular, inmunohistoquímica, fibroblastos.

### Abstract

**Introduction:** Tissue engineering protocols requires the evaluation of the quality of the cultures by confirm the cellular lineage, purity of the culture and biological activity associated to cellular proliferation and cellular differentiation. Several techniques has been described to evaluate these parameters. The cell block (BC), is a technique used in histopathology for the study of cytological samples. Our objective is to apply the technique of BC in culture of fibroblasts of human oral mucosa to evaluate the lineage and biological activity close to cellular proliferation.

**Methodology:** To develop BC, fibroblast from IV passage were used and fixed in formalin and paraffin-embedded for histological and immunohistochemistry using PCNA, Vimentin markers.

**Results:** The method of the BC for fibroblasts of oral mucosa allowed us to observe the inmunoreacción for the PCNA and Vimentina markers.

**Discussion:** The technique of BC followed by immunohistochemistry confirms the lineage of the fibroblasts and biological activity associated to cellular proliferation.

**Key words:** tissue engineering, cell block, immunohistochemistry, fibroblasts.

## 1. Introducción

La ingeniería tisular es una emergente área en la investigación biomédica, cuyo objetivo es diseñar constructos tisulares orgánicos que puedan ser utilizados para la sustitución de tejidos y órganos dañados por lesión y/o enfermedad(1,2). Con el uso de técnicas de Ingeniería tisular (IT) investigadores han desarrollado eficientes constructos de diferentes órganos y tejidos para uso terapéutico, como por ejemplo córnea (3), piel humana (4), y mucosa oral (5). En relación a la mucosa oral, se han desarrollado diferentes modelos de tejidos artificiales, que eventualmente podrían ser utilizados como sustitutos organotípicos para la reconstrucción de tejidos orales y maxilofaciales (5, 6, 7). La mucosa oral diseñada por técnicas de IT debe tener las mismas funciones innatas que la mucosa oral natural, actuando como una barrera protectora (8). De ello se deriva la necesidad de evaluar el linaje celular, la actividad biológica vinculada a proliferación, la síntesis de componentes de la matriz extracelular (MEC) y la capacidad de diferenciación de las células en los constructos desarrollados por IT, antes de que puedan ser utilizados clínicamente (7,9). En estos constructos, los fibroblastos constituyen elementos fundamentales para la elaboración de estroma artificial. Los fibroblastos de mucosa oral sintetizan prostaglandinas PGE2 estimulando la proliferación, diferenciación epitelial, y son las células encargadas de sintetizar la MEC estromal (10). Existen diferentes técnicas para evaluar el linaje y viabilidad celular en los cultivos, siendo los métodos estándar la microscopía óptica, la citometría de flujo, la inmunohistoquímica, los ensayos basados en PCR, la microscopía electrónica por energía dispersa de rayos X y el microarrays (5, 11,12). Una estrategia utilizada rutinariamente en anatomía patológica para la evaluación y archivo de células procedentes de fluidos patológicos, es la elaboración de un bloque celular (BC), en que las células en suspensión son fijadas en formalina e incluidas en parafina (9,13). Posteriormente es posible realizar técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas, hibridación in situ, etc. a los BC para establecer el diagnóstico de una determinada patología en base a características nucleares y la utilización de marcadores específicos (13). Por lo tanto esta técnica podría ser utilizada para confirmar el linaje celular, actividad biológica vinculada a proliferación celular, capacidad de diferenciación celular y pureza de los cultivos desarrollados por IT.

El objetivo de este trabajo es aplicar la técnica de BC en cultivo de fibroblastos de mucosa oral humana para confirmar el linaje y la actividad biológica vinculada a la proliferación celular, utilizando los marcadores inmunohistoquímicos el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y Vimentina.

## 2. Materiales y métodos

Se utilizaron biopsias de mucosa oral obtenidas de donantes sanos a través de cirugía menor bajo anestesia local. El tamaño promedio de las muestras es de 3x3x2 mm. Inmediatamente después de la extracción, todos los tejidos son mantenidos en medio de transporte a 4°C (Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM; 100 U/ml de penicilina G, 100 ug/ml de estreptomina, y 0,25 ug/ml anfotericina B) y procesado en las siguientes 24 hrs. Las muestras fueron obtenidas bajo consentimiento informado.

### 2.1 Cultivo primario de fibroblastos orales

Las muestras una vez en el laboratorio, se realizaron dos lavados en buffer fosfato salino (PBS) y son incubados toda la noche a 37°C en una mezcla de DMEM y 2 mg/ml de colagenasa I de clostridium H. (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania). Este tratamiento enzimático digiere toda la MEC del estroma de la mucosa oral, liberando los fibroblastos inmersos en el.

Una vez que la muestra es digerida, se separan los componentes del tejido conectivo incluido los fibroblastos por centrifugación, y son depositados en frascos de cultivo que contienen DMEM suplementado con antibióticos (100 U/ml de penicilina G, 100 ug/ml de estreptomina, y 25 ug/ml de anfotericina B) y 10% de suero bovino fetal (SBF). Las células son incubadas a 37°C en 5% de dióxido de carbono. El medio es cambiado cada 3 días, y el subcultivo de las células se ha llevado a cabo usando solución de tripsina 0,5 g/l-EDTA 0,2 g/l a 37°C por 10 min. (5, 12). Los fibroblastos utilizados para la confección del bloque celular corresponden al IV pase.

## 2.2 Bloque celular

Las tripsinización es neutralizada con DMEM suplementado con 10% de SBF. La concentración celular se llevó a cabo centrifugando a 1000 rpm por 10 min, y se eliminó el sobrenadante. El pellet celular es resuspendido en DMEM por 15 min. Se centrifugó a 1000 rpm por 10 min. eliminando el sobrenadante. El pellet celular fue resuspendido y fijado en formalina al 10% en PBS 0,1 M por 1 hora a temperatura ambiente (13). Se centrifugó por 10 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en agua destilada y centrifugado a 1000 rpm por 10 min. La deshidratación se realizó resuspendiendo el pellet en alcoholes ascendentes hasta 99° por 15 min c/u, con ciclos de centrifugación a 1000 rpm por 10 min. eliminando el sobrenadante. El aclaramiento se realizó en dos cambios de xilol, se centrifugó a 1000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante. El pellet fue incluido en parafina a 60°C por 30 min. (13) El BC fue cortado a 5 µm para la realización de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica.

## 2.3 Inmunohistoquímica

Las secciones del BC son desparafinadas en xilol e hidratadas en alcoholes descendentes hasta el agua destilada. La recuperación antigénica se realizó con buffer citrato pH 6 a 95°C. Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% (v/v) en PBS 0,1 M por 10 min. Cada uno de los pasos sucesivos fue seguido por lavados en PBS. Todos los pasos fueron realizados en cámara húmeda, evitando la desecación de las secciones. Los sitios antigénicos inespecíficos fueron bloqueados con Suero de bloqueo (Vectastain Universal Quick Kit) por 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas en los anticuerpos primarios diluidos en Suero de Bloqueo (Vectastain Universal Quick Kit) PCNA 1:1000, Vimentina 1:200 (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim, Germany) durante 60 min a temperatura ambiente. Después de abundantes lavados en PBS, todas las secciones fueron incubadas en Biotynilated Panspecific Universal Secondary Antybody (Vectastain Universal Quick Kit) por 10 min a temperatura ambiente. Después de abundantes lavados en PBS las secciones fueron incubadas en complejo avidina-biotina (Vectastain Universal Quick Kit) por 5 min. La reacción de la peroxidasa fue visualizada con NovaRed Kit (Vector, Burlingame, CA, USA). El contraste fue

realizado con hematoxilina de Mayer´s (SIGMA-ALDRICH CHEMIE, Steinheim, Germany). Para cada reacción inmunohistoquímica el control negativo fue incubando las secciones en suero de bloqueo, omitiendo el anticuerpo primario. El control positivo externo para ambos marcadores fue mucosa oral humana.

Las secciones fueron examinadas en el microscopio Nikon Eclipse 90i, y las imágenes fueron capturadas usando la Cámara Digital Nikon DXM 1200c.

## 3. Resultados

### 3.1 Análisis morfológico

Los fibroblastos en cultivo presentan aspecto fusiforme, citoplasma abundante y núcleo central, en la medida que el cultivo se torna confluyente, el citoplasma es más escaso y su morfología más alargada.

Los fibroblastos del IV pase en las secciones del BC observados con la tinción de hematoxilina-eosina pierden las características fusiformes adoptando una morfología esférica. Se observan las características nucleares, las cuales varían de núcleos picnóticos, hiper cromáticos, pleomorfos con la cromatina adosada a la membrana, y algunos nucléolos prominentes.

Se observa un citoplasma abundante en la mayoría de las células. Algunas células presentan pérdida de la relación núcleo-citoplasma, y el núcleo adquiere polaridad desplazándose a un extremo (figura 1).

### 3.2 Análisis inmunohistoquímico

La inmunoreacción para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es positiva en un gran número de fibroblastos, presentando un patrón nuclear, con una intensidad que varía entre débil a intenso. (figura 2).

La totalidad de los fibroblastos presentaron inmunoreacción positiva para el filamento intermedio de Vimentina, observándose un patrón citoplasmático homogéneo, y un patrón moteado algunas células. La inmunoreacción es intensa en la mayoría de las células (figura 3).

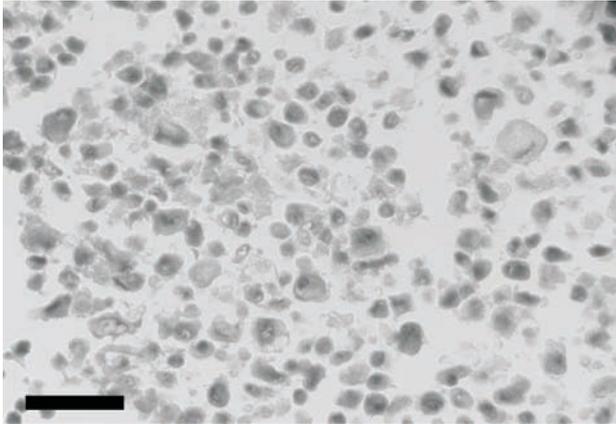


Fig 1. Corte histológico del bloque celular de fibroblastos de mucosa oral teñido con HE (40x). Se observan las características nucleares, nucléolos y pleomorfismo celular. La barra en la esquina inferior izquierda de cada imagen representa 50  $\mu$ m.

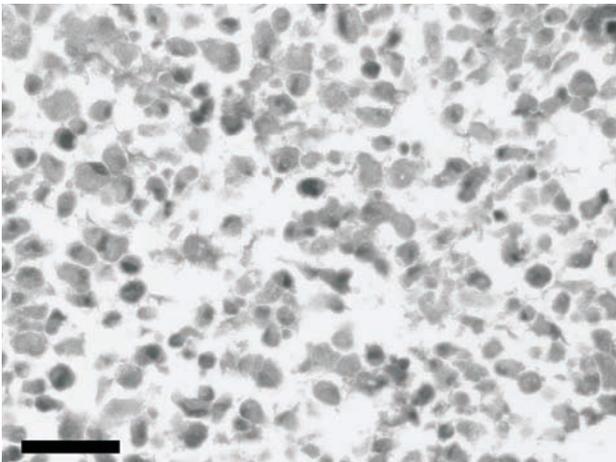


Fig 2. Inmunohistoquímica para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (40x). Se observa la inmunoreacción con patrón nuclear característico del marcador PCNA (color rojo). La barra en la esquina inferior izquierda de cada imagen representa 50  $\mu$ m.

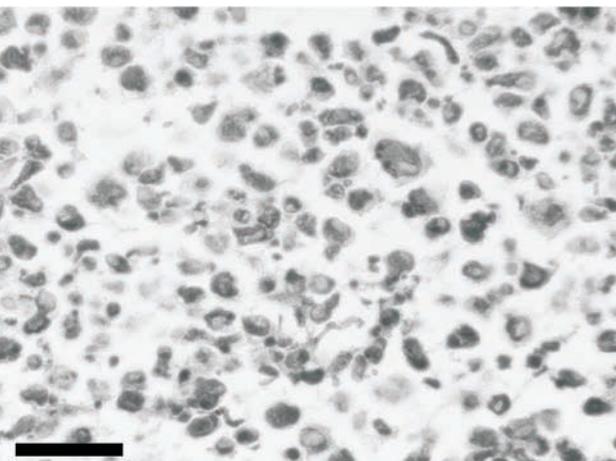


Fig 3. Inmunohistoquímica para el filamento intermedio Vimentina (40x). Se observa el patrón citoplasmático en los fibroblastos (color rojo). La barra en la esquina inferior izquierda de cada imagen representa 50  $\mu$ m.

## 4. Discusión

Para evaluar el linaje y estado proliferativo de los cultivos celulares los laboratorios de investigación utilizan técnicas morfológicas y moleculares complejas.

El BC es una técnica muy utilizada en citopatología para la evaluación de fluidos corporales con sospecha de una lesión neoplásica. En estos casos se realiza un diagnóstico presuntivo de la lesión, y se correlacionan los resultados con los hallazgos citológicos. La aplicación de técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de hibridación in situ permiten detectar factores diagnósticos y pronósticos en estas lesiones, siendo una ventaja considerable para los pacientes (13, 14).

La elaboración de un BC a partir de células procedente de cultivos, es un método simple y rápido. Como hemos indicado en la introducción, puede ser útil en la evaluación citológica de los constructos. Aunque la célula pierde sus contactos focales durante la tripsinización, adoptando una morfología esférica, es posible identificar con claridad sus características nucleares con este método. La principal ventaja de la utilización del BC en ingeniería tisular, radica en que permite la realización de una gran variedad de marcadores inmunohistoquímicos que se encuentran disponibles para tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. Es posible mejorar la calidad y reproducibilidad de los resultados automatizando el proceso (9, 14). La inmunohistoquímica es una técnica morfológica que nos permite observar la localización y distribución de proteínas específicas en diversos tejidos. Sin embargo, es una técnica básicamente cualitativa en la que es posible realizar una estimación porcentual de la inmunoreacción (14).

El marcador PCNA, reconoce un antígeno nuclear asociado a proliferación celular (15). La inmunoreacción para PCNA fue positiva, confirmando la actividad biológica vinculada a proliferación de los fibroblastos del IV pase. La elección del IV pase es debido a que otras estirpes celulares dicho pase es el que posee mayor grado de viabilidad (7).

El filamento intermedio Vimentina es considerado un marcador para células mesenquimáticas, pero no un marcador tipo celular específico. La inmunohistoquímica para Vimentina en los fibroblastos del BC, nos permite confirmar el origen mesenquimático de nuestros cultivos. Si a este hecho se une el fenotipo fusiforme observado en el cultivo, es posible establecer que las células son

compatibles con los fibroblastos.

Clásicamente se recomienda fijar las muestras 60 min. en formol al 10%, para obtener una fijación óptima de las muestras citológicas (13). Sin embargo, en el caso de los cultivos celulares destinados a la confección de un bloque celular es necesario prolongar este tiempo, ya que las características morfológicas observadas con hematoxilina-eosina, y el patrón de la inmunoreacción, denotan artefactos técnicos, como vacuolización citoplasmática, pérdida de polaridad nuclear y difusión de los antígenos, no otorgando un patrón homogéneo de inmunoreacción en la totalidad de las células.

En conclusión, la aplicación del BC en muestras provenientes de cultivos celulares seguidos por la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas es un método simple, rápido y de bajo coste, que permite confirmar el linaje celular, la pureza de los cultivos y estimar la actividad biológica vinculada a proliferación celular. Además, la técnica del BC, permite el almacenamiento de estas muestras por períodos prolongados de tiempo, en los cuales se podrán aplicar marcadores inmunohistoquímicos, sondas de hibridación e incluso técnicas de extracción de ADN.

## Referencias

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 14 260 (5110):920-926.
2. Flake G, Athala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch. Argent. Pediatr* 2000; 98 (2): 103.
3. Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, et al. Construction of complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Investigative ophthalmology & Visual Science* 2006; 47:3311-3317.
4. Meana A, Iglesias J, Del Río M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, et al. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* 1998; 24:621-630.
5. Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitán LM, Moreu G, Garzón I, Crespo PV et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol* 2007; 22: 631-640.
6. Lauer G, Schimming R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intra-oral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59: 169-175.
7. Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, García JM, Crespo PV, González-Andrades M, et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol* 2007; 211:692-698.
8. Feinberg SE, Aghaloo TL, Cunningham LL Jr. Role of tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction: findings of the 2005 AAOMS Research Summit. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1418-1425.
9. Forell S, Schmidt S, Porter-Gill P, Albertine K, Murphy K, Mckinney C, et al. Novel application of a fibrin cell block method to evaluate melanocytic cell populations. *Pigmente Cell Res.* 2003; 16:662-669.
10. Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A. *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental.* 3° Edición. Editorial Panamericana; 2009.
11. Parodi B, Aresu O, Bini D, Lorenzini R, Schena F, Visconti P, et al. Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method. *Biotechniques* 2002; 32: 432-434.
12. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernandez-Montoy A, et al. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J. Tissue Eng Regen Med.* 2007 1: 350-359.
13. Takahashi M. *Atlas en color de citología del cáncer.* Editorial científico médica; 1973.
14. Ganjei-Azar P, Nadji M. *Color Atlas of Immunocytochemistry in Diagnostic Cytology.* Springer Science Business Media LLC; 2007
15. Leong A, Cooper K, Leong F. *Manual of Diagnostic Antibodies for Immunohistology.* Greenwich Medical Media Ltd; 1999.