

Cultivo y caracterización in vitro de una línea celular de fibroblastos gingivales humanos

Jorge Enrique Soto Franco*

Bertha Parra**

Adolfo Contreras Rengifo***

OBJETIVO GENERAL

Establecer una línea celular de fibroblastos, provenientes de tejido gingival humano.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Identificar por sus características morfológicas una línea de fibroblastos gingivales realizando además cariotipificación e inhibición del crecimiento con geneticina y tinción de Leucina-aminopeptidasa.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

El fibroblasto es una célula del tejido conectivo que tiene un papel esencial en el desarrollo, estructura y sostén de los dientes; una de sus funciones principales es la formación de las fibras extracelulares del tejido conectivo, las cuales son fibras colágenas, elásticas, reticulares y oxitalánicas, cuyas funciones de contractibilidad y motilidad contribuyen a la organización estructural de los tejidos durante su desarrollo y regeneración.¹

Esta célula produce también la sustancia fundamental o matriz extracelular en la cual se hallan inmersas las fibras y provee la resistencia necesaria

para el movimiento de los dientes, mediante una estructura especializada, el ligamento periodontal.

El fibroblasto es la célula predominante en el tejido conectivo periodontal y juega consecuentemente un papel central tanto en el funcionamiento normal como en las alteraciones patológicas de los tejidos periodontales.²

ESTRUCTURA DEL FIBROBLASTO

El fibroblasto en reposo (tendón) posee un núcleo pequeño, achatado, teñido, con un citoplasma escaso, mientras un fibroblasto activo posee un complemento usual de organelas citoplasmáticas en mayor cantidad, con varios complejos de Golgi y muchos perfiles de retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y vesículas secretorias³, indicando esto la función activa del fibroblasto de tipo secretorio y sintetizador. Existe un sistema tubular y filamentoso dentro del citoplasma cuya función se asocia al mantenimiento de la forma de la célula, al transporte de metabolitos celulares, al posicionamiento de sus estructuras intracelulares y al contacto con células adyacentes.⁴

* Profesor Titular Escuela de Odontología Universidad del Valle.

** Técnica Especializada IV Departamento de Microbiología Universidad del Valle.

*** Profesor Asociado Escuela de Odontología Universidad del Valle.

Este citoesqueleto se halla normalmente organizado en haces largos y rectos de microfilamentos laxamente unidos, y filamentos individuales que forman una red tridimensional entrecruzada. Los microtúbulos son estructuras protéicas, largas, cilíndricas, con ligeras curvaturas, la proteína principal se llama tubulina y posee estrechas similitudes con la proteína muscular actina; se pueden distinguir dos tipos de filamentos sobre la base de su diámetro: microfilamentos y microtúbulos compuestos por actina, miosina y vimentina.⁵

Se cree que en las encías existen varias poblaciones de fibroblastos fenotípicamente diferentes.⁶

El colágeno se observa como fibras de grosor y orientación variables que ocupan el comportamiento extracelular que existe entre las células del tejido conectivo. Recientemente se ha conocido que en el tejido conectivo en remodelación, el fibroblasto no sólo puede sintetizar colágeno sino degradarlo simultáneamente de manera controlada y ordenada; ésta secuencia de hechos se observó por primera vez en los fibroblastos del ligamento periodontal, principalmente por que éste, posee una velocidad de recambio de colágeno muy alta para poder acomodar los diversos movimientos menores de los dientes.^{7,8}

Cualquier disminución en la velocidad de formación o degradación de colágeno por parte de los fibroblastos origina una pérdida o una ganancia de colágeno tisular, con la consecuente alteración de su arquitectura y función.⁹

Estas células que son regularmente identificadas por su morfología alargada o estrellada son propagadas fácilmente in vitro.¹⁰

Utilizando fibroblastos de tejido gingival y ligamento periodontal cultivados in vitro, se han adelantado estudios acerca de la heterogeneidad de subpoblaciones de fibroblastos y su importancia en la regulación de funciones del tejido conectivo en salud y enfermedad.¹

Una línea de fibroblastos gingivales humanos, L929, demostró ser un buen modelo para medir el efecto biológico tóxico de material unido al cemento y endotoxinas de periodontopatógenos,

inhibiendo la proliferación celular y evitando la unión de los fibroblastos a la superficie radicular.^{11,12}

Phillipis et al 1990 (13), utilizaron fibroblastos cultivados in vitro tratando de dilucidar el papel de los microorganismos y sus productos en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

Elementos celulares se han utilizado con éxito en la identificación aislamiento de virus, específicamente el diagnóstico virológico utiliza líneas de fibroblastos humanos como MRC5 y pulmón embrionario, etc., para aislar virus de muestras clínicas.^{14,15}

En la actualidad en la sección de cultivos celulares del laboratorio de virología de la Universidad del Valle y en la sección de Periodoncia de la Escuela de Odontología no se posee para fines de investigación una línea proveniente de tejido gingival humano.

En dichas células resulta probable que se cultiven eficientemente los virus que hacen una fase oral o perioral, se excretan en la saliva o aparezcan en el fluido crevicular gingival.

Este trabajo pretende establecer y caracterizar una línea de fibroblastos gingivales humanos susceptibles de ser infectados por virus de excreción oral; ésta línea celular podría ser utilizada en estudios de investigación de ciencia básica en periodoncia tales como pruebas de toxicidad bacteriana, evaluación de la biocompatibilidad de materiales dentales o en procedimientos in vitro de regeneración tisular guiada.

La línea celular de fibroblastos gingivales humanos (FGH) después de su caracterización formará parte del banco de células existente en el laboratorio de virología del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle.

JUSTIFICACION

Uno de los principales avances en el área de investigación biomédica del presente siglo, lo representa el establecimiento de los cultivos celulares que le han permitido al hombre la simulación in vitro de innumerables problemas en las ciencias de la Salud. Los cultivos celulares permiten

avanzar en el conocimiento de la fisiología celular, la genética, los procesos de reparación tisular, y estudiar mecanismos de invasión y patogénesis por diversos microorganismos como hongos, bacterias, parásitos y virus.

Con éste trabajo se pretende hacer un aporte al banco de células de la sección de virología de la Universidad del Valle e iniciar el apoyo del área básica al programa de especialización en Periodoncia que ofrece la Escuela de Odontología de la misma universidad.

El establecimiento de una línea celular de fibroblastos gingivales humanos, permitirá desarrollar una serie de trabajos en las áreas de diagnóstico virológico y en ciencia básica en las áreas de operatoria para estudios de toxicidad de los materiales utilizados en restauración y en periodoncia en el entendimiento de algunos mecanismos de patogénesis de la enfermedad periodontal en nuestro medio.

METODOS Y MATERIALES

1.1 Cultivo Primario de Fibroblastos Gingivales

1.1.1. Obtención de las muestras de Encía

Se obtuvieron muestras de encía de pacientes sanos, sin antecedentes médicos de diabetes o enfermedad endocrina manifiesta, también se excluyeron pacientes con enfermedad neoplásica, antecedentes de hepatitis o seropositivos para el virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIU+), o pacientes con clínica o antecedentes de infección herpética al momento de la cirugía.

La muestra se obtuvo de especímenes de encía que requerían Cirugía Periodontal. Se seleccionaron tres pacientes de sexo femenino y masculino con edades entre los 16 y 30 años.

Se obtuvo una muestra aproximadamente de 0.5 cm. cuadrados de encía, se suspendió en medio de crecimiento celular (medio mínimo esencial con sales de Hank's, Hmemcon con suero fetal bovino al 10% y antibióticos penicilina 200u, estreptomycin 200 mg/ml, tetraciclina 5ug/ml y 10mlug de anfotericina B).

Se obtuvieron muestras de encía de pacientes sanos que requirieron cirugía periodontal, se seleccionaron tres pacientes de sexo femenino y masculino. Aproximadamente 0,5 cm cuadrados de encía se resuspendió en medio de crecimiento.

(Medio Mínimo Esencial con sales de Hank's HMEM con suero fetal Bovino al 10% y antibióticos penicilina 200U, estreptomycin 200 mg/ml, tetraciclina 5ug/ml y 10 mlug de Anfotericina B.

1.1.2 Procesamiento de la Muestra

La disociación del tejido se realizó según la metodología previamente establecida en el laboratorio de virología del Departamento de Microbiología y según lo descrito para fibroblastos gingivales por Aleo, et al 1974 y 1975 ^{(10) (11)}.

El tejido se lavó con solución buffer fosfatos (PBS) pH 7.2 y se separó el epitelio del tejido conectivo, con bisturí. El conectivo se fraccionó en pedazos de 0.5 mm cúbicos y se incubó en tripsina al 0,25% (Sigma 1:250) durante 2 horas a 37°C. El tejido tripsinizado se disoció mediante pipeteo suave, extensivo y se filtró por malla metálica. Las células disociadas se centrifugaron con medio de crecimiento durante 15 a 20 minutos a 1.500 r.p.m. en centrifuga refrigerada Nitachi. El botón celular se resuspendió en 5 cc de medio de crecimiento y se sembró en una botella de poliestireno para cultivo de tejidos de 25 cm cuadrados. El cultivo se incubó a 37 C, en atmósfera de CO₂ al 5% por diez (10) días (16) (17). Los cultivos se observaron diariamente al microscopio invertido de Luz Olympus II, hasta visualizar el crecimiento y multiplicación de células fusiformes con características morfológicas compatibles con fibroblastos.

1.1.3 Cultivo Primario de Fibroblastos Gingivales

A las 72 horas de la siembra se removió el sobrenadante del cultivo y se reemplazó por nuevo medio de crecimiento. Este cambio de medio se repitió cada dos días.

Aproximadamente al sexto día de la siembra inicial se observó crecimiento de células de apariencia fusiforme, cuya morfología coincidía con

la de fibroblasto. La figura 1 muestra el aspecto del cultivo al octavo día.

1.2 Caracterización de la línea celular.

1.2.1 Obtención de la línea celular.

A los 12 días de iniciado el cultivo, el número celular aumentó hasta alcanzar aproximadamente un 30% de la monocapa Fig.2 a éste tiempo se realizó el primer subcultivo, mediante desprendimiento de los fibroblastos con EDTA 50 mM y tripsina 0.25%.

Cinco días posteriores a la tripsinización el crecimiento celular alcanzó el 70%-80% de confluencia, Figura 3.

La Figura 4 muestra una manocapa confluyente con el 100% de pureza, según criterios morfológicos, correspondiente al cuarto subcultivo el cual fue utilizado para cariotipificación, tinción con giemsa y Papanicolau para su descripción morfológica por el Laboratorio de Histología y Citogenética de la Universidad del Valle, Fig. 5.

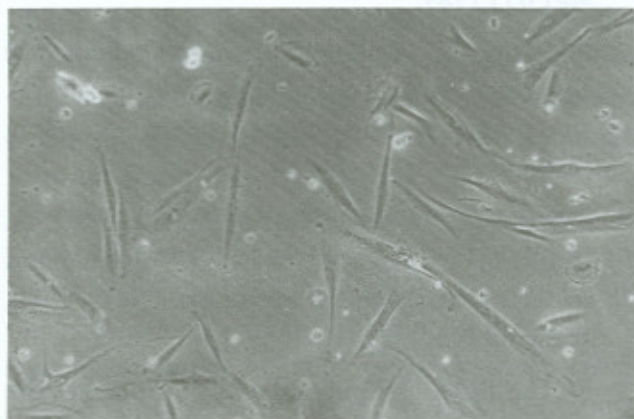


Figura 1

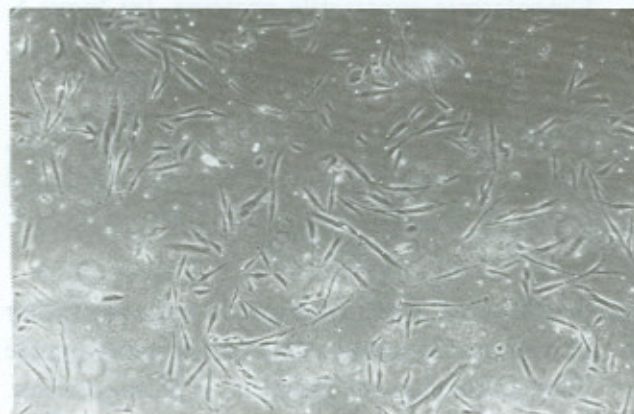


Figura 2

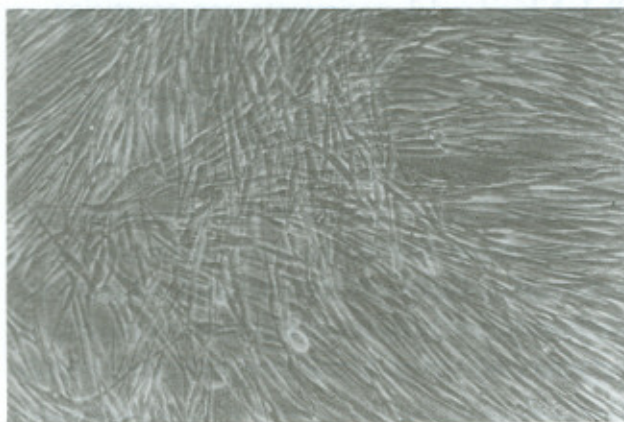


Figura 3

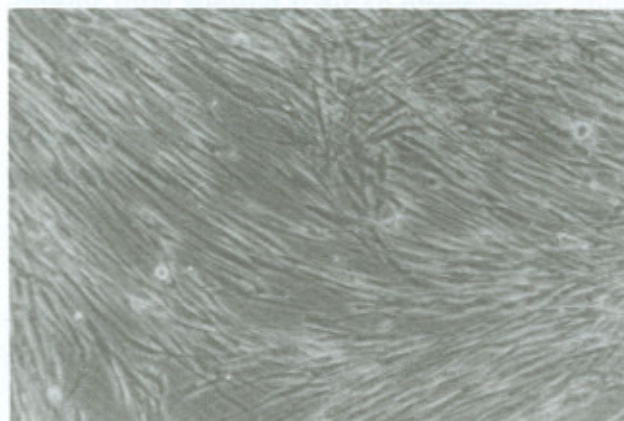


Figura 4



Figura 5

- 1) Análisis citomorfológico de las monocapas de fibroblastos gingivales.
- 2) Cariotipificación

3) Inhibición del crecimiento con genética

1.2.3 Pruebas de esterilidad.

A la línea celular en subcultivo No. 10 se le ensayó para detección de microorganismos contaminantes.

Para ello se inoculó aproximadamente 1 cc de suspensión celular en caldo de tioglicolato, medio de Saubouroud y caldo PPLO para aislamiento de bacterias, hongos y Micoplasma respectivamente.

Adicionalmente se sembró la suspensión celular de fibroblastos en un cultivo primario de Riñón Embrionario Humano y Fibroblastos de Pulmón con el objeto de aislar posibles virus adventicios o contaminantes tales como Herpes, CMV u otros.

Todas las pruebas de esterilidad ensayadas fueron negativas para microorganismos contaminantes (bacterias, hongos virus).

1.2.4 Mantenimiento.

La línea celular se preservó y almacenó por congelación en nitrógeno líquida. Se utilizó medio de crecimiento con 10% de DMSO (Dimetil sulfóxido), aproximadamente dos millones de células por cc se congelaron durante 18 horas a -70 C y posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido (-190°C).

DISCUSION

Los fibroblastos gingivales pueden ser cultivados, caracterizados y mantenidos relativamente fácil y económicamente en el laboratorio.

El establecimiento de líneas celulares orales, permitirá la investigación de ciencia básica en periodoncia en nuestra facultad y la colaboración e interrelación entre las ciencias básicas y los clínicos.

SUMMARY

The main goal is to establish a cellular line of fibroblast which come from human gingival tissue, identifying its morphologic features.

Samples were taken from gum of healthy patients without medical antecedents.

Three females and three male were selected. Ages were between 16 and 30 years old. A sample of 0,5 cm² of gum was obtained to take it to a cellular growth environment. Cultures were incubated at 37°C, CO₂ atmosphere at 5% for ten (10) days. Samples were observed daily with inverted light Microscope Olympus II. At 6th day growth of fusiform cells was observed; their morphology was in coincidence with that of the fibroblasts. At 18th day a monolayer of 100% purity was observed. The cellular line was preserved and stored by freezing in liquid nitrogen.

BIBLIOGRAFIA

1. MCCULLOCH C.A. and BORDIN S. Role of fibroblast subpopulations in Periodontal physiology and pathology. 4. Perio. Res. 26: 144-1540 1991.
2. TEN CATE AR. The fibroblasts and its products, In: Ten Cate Ar, Ed Oral histology: development, structure and function Toronto: C.V. Mosby. 90-1 053 1989.
3. EASTOE J.E. Collagen chemistry and tissue organization. In Poole D.F.G. and Stack M.V. eds. The eruption and occlusion of teeth. London, Butterworths, 1976.
4. AUBIN J.E., ZIMMERMAN A.M. FORER A. Immunofluorescence studies of cytoskeletal proteins during cell division. New York, academy Press., 1981.
5. POLLARD T.D. Functional implications of the of the Biochemical and structural properties of Cytoplasmic contractile proteins. In: Inove S. Stevens RE Eds. Molecules and Cells Movement. New York: Raven Press. 259-2861 1975.
6. SOMMERMANN MJ, RICHES SY, GIMMEN, et al. Comparative study of human Periodontal ligament cells and gingival fibroblast in vitro. J. Dent Res. 67: 66-70 1988.
7. FRIEDLINT P.R. Collagen resorption by fibroblasts: a theory of fibroblastic maintenance of the Periodontal ligament. J. Periodon Res. 47: 388-398s 1976.

8. MELENER R.N., CHHN J. Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in uiuo: a studg of seria§ sections. J. Ultrastruc Res. 77: 1-363 1981.
9. DTSUKR K., PITRRU 5, OUEHLL CM, et al. Biochemical comparison of fibroblast populations from different Periodontal tissues: characterization of matrix protein and collagenolgtic enzyme sgnthesis. Biochem Celi Rioj. 66: 167-1763 1988.
10. LRYMRN U.L., DIEDRIEN B.L. Growth inhíbitorg effects of éndotoxin s from hacteroides gingiualisand intermedius an human fibroblasts in uitra. J. Periodantol. 58: 387-392l. 1987.
11. ALEO, J.J. et al. the presence and biologic actiuitg of cementum-bound endotoxin. J. Periodontol 45: 6726759 1974.
12. RLEO J.J., De RENZIS F.fl. FORREN P.R. In uitro attachment of human gingiual fibroblasts to root surface. J. Periodantol. 46: 639-645, 1975.
13. PHILLIPS J.R., NHBIM N.S. and LRYMRN U.L. Riterations in celi morphology and cgtoskeletal proteins in gingiual fibroblasts expossed tú a bacteriodes gingiualis extrac. J. Periadant. Res. 25: 339-3465 1998.
14. GLENUES C.R. HURSH D.fl. and MEYENS J.B. detectan of human cgtomegolouirus in clínica; specimens by clin microbioj.-39: 1845-1948.1 1992.
15. SURBELLO OF., ELMENBDRF S.L. MCSHRRRY J.J., et al. Hapid detectian of cgtomegalouirus by fluarecent monacional antibodg staining and In situ BNO hgbridization in a dram uial celi culture system. J. Elin Microbioj. 26: 1111-111411 1988.
16. RRNOLB L.F. BflflfM P. In uitro culture of Periodontal Lígame-nt. Celis. J. gent Research. 51:953959. 1972.
17. YRJIMR T. HOSE 6.S. MRHHN C.J. Numan gingiual fibroblast cell lines in uitro li. Electron micruscapic studies of fibrogenesis J. Periodant. Research. 15:267287. 1989.