

EXPRESIÓN DE P53 EN CULTIVO DE CÉLULAS MADRE AISLADAS A PARTIR DE QUISTE RADICULAR INFLAMATORIO

EXPRESSION OF P53 IN CULTURE OF ISOLATED STEM CELLS FROM INFLAMMATORY RADICULAR CYST

Francis Wendell Jácobo Valdivia¹, Julio Cesar Bernabé Ortiz², Javier Valero Quispé², Ivo Palomino Valverde², Jhony R. Rodríguez Mamani³, Toia Agueda Rossangella Muñoz Del Carpio²

(1) Universidad Continental, Arequipa - Perú.

(2) Universidad Católica de Santa María, Arequipa - Perú.

(3) Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú.

RESUMEN: El quiste radicular inflamatorio es definido como una de las lesiones inflamatorias más frecuentes en la cavidad oral donde compromete normalmente el ápice de las raíces dentarias dando características clínicas y radiológicas patognomónicas frecuentes. El objetivo de esta investigación fue determinar la expresión de p53 en el cultivo de células madre aisladas a partir del quiste radicular inflamatorio. En su metodología se presentó el reporte de un caso de un paciente de 69 años el cual se sometió a la intervención quirúrgica para la extracción de las piezas 11 y 12 del cual se obtuvo la muestra para el aislamiento y cultivo de las células madre del quiste periapical inflamatorio, obteniendo células alargadas, planas de apariencia fibroblástica a partir del día 4 y la tinción con marcadores para p53 dando una respuesta positiva en la evidencia del gen p53 tanto en el citoplasma como en el núcleo de estas células madre. Por último, las células se pueden obtener a partir del quiste radicular inflamatorio de 4 a 25 días con el uso de un protocolo modificado, al final como aporte para este artículo se brinda la evidencia del gen p53 tanto en el núcleo como en el citoplasma celular.

Palabras clave: Quiste radicular, gen p53, células madre, aislamiento y cultivo.

ABSTRACT: The inflammatory root cyst is defined as one of the most frequent inflammatory lesions in the oral cavity where it normally involves the apex of the dental roots, giving frequent pathognomonic clinical and radiological characteristics. The objective of this investigation was to determine the expression of p53 in the culture of isolated stem cells from the inflammatory root cyst. In its methodology, the report of a case of a 69-year-old patient was presented, who underwent surgical intervention to extract pieces 11 and 12, from which the sample was obtained for the isolation and culture of the cyst stem cells. periapical inflammatory, obtaining elongated, flat cells with fibroblastic appearance from day 4 and staining with markers for p53 giving a positive response in the evidence of the p53 gene both in the cytoplasm and in the nucleus of these stem cells. Finally, cells can be obtained from the inflammatory root cyst from 4 to 25 days with the use of a modified protocol, in the end, as a contribution to this article, the evidence of the p53 gene is provided both in the nucleus and in the cell cytoplasm.

Keywords: Root cyst, p53 gene, stem cells, isolation and culture.

INTRODUCCIÓN

Una de las lesiones predominantes de la cavidad oral es el quiste radicular inflamatorio, secuela directa de un granuloma periapical. Este quiste en la actualidad representa entre el 52 – 75% de los casos de quistes odontogénicos^(1,4).

Se desarrolla casi totalmente en la dentición permanente, en los dientes temporales son muy infrecuentes ya que suponen solamente del 0.5 al 3.3% del total de los quistes radiculares⁽⁵⁾.

El quiste radicular pertenece a los quistes odontogénicos de origen inflamatorio junto con el quiste residual y el quiste paradental.

Este es una inflamación crónica, cerrada, limitada parcial o completamente por un epitelio escamoso estratificado no queratinizado.

El tejido conectivo fibroso subyacente se encuentra inflamado con distintos grados de infiltrado celular y pequeños vasos sanguíneos, radiográficamente se observa un área radiolúcida periapical, de límites definidos y corticalizados, con forma redondeada

El origen de los quistes radiculares inflamatorios son residuos epiteliales de los restos de Malassez, en el ligamento periodontal, periodontitis apical, necrosis pulpar, epitelio crevicular, epitelio sinusal o epitelial de un tracto fistuloso.^(7,9) Pueden presentarse a cualquier edad sin predominio de sexo, desde la infancia hasta la senectud, pero para la mayoría de los autores es entre la 3ª y 4ª década cuando es más habitual diagnosticarlos. Su lugar de mayor porcentaje el maxilar superior (60%), siendo el sector anterior la zona más frecuente.⁽⁶⁾

Hablar de aislamiento y cultivo del quiste periapical inflamatorio no es muy recurrente, normalmente podemos encontrar otras descripciones como los casos de ameloblastoma o el queratoquiste y su relación con la p53⁽¹⁰⁾,

Por lo tanto, esta investigación ayudará con un aporte orientado a determinar el aislamiento y cultivo de las células madre del quiste periapical inflamatorio.

Correspondencia:

Francis Wendell Jacobo Valdivia
E-mail: frawe_18@hotmail.com

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestra y selección de la muestra.

Se seleccionó un paciente del sexo masculino, 69 años de edad que acudió a la clínica odontológica de la Universidad Católica de Santa María (Arequipa Perú) por un tratamiento de prótesis. El paciente aceptó participar en el estudio firmando el consentimiento; del mismo modo el protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la UCSM. Conforme a sus hábitos consume té, café, no bebidas alcohólicas, ni drogas tampoco fuma, referente a su higiene bucal es deficiente.

Evidencias Radiográficas.

Se realizó el estudio por imágenes con las técnicas extraoral panorámica e intraoral periapical. En la radiografía panorámica se observó una imagen radiolúcida periapical a las piezas 11 y 12 como se aprecia en la figura 1a. En la radiografía periapical observamos una imagen radiolúcida periapical a piezas 11 y 12, de forma redondeada y límites definidos, signos radiográficos sugerentes de quiste apical. Pieza 11, obturación de conducto, espigó intraradicular y restauración coronaria. Pieza 12, remanente radicular con obliteración parcial de conducto que se puede apreciar en la figura 1b.

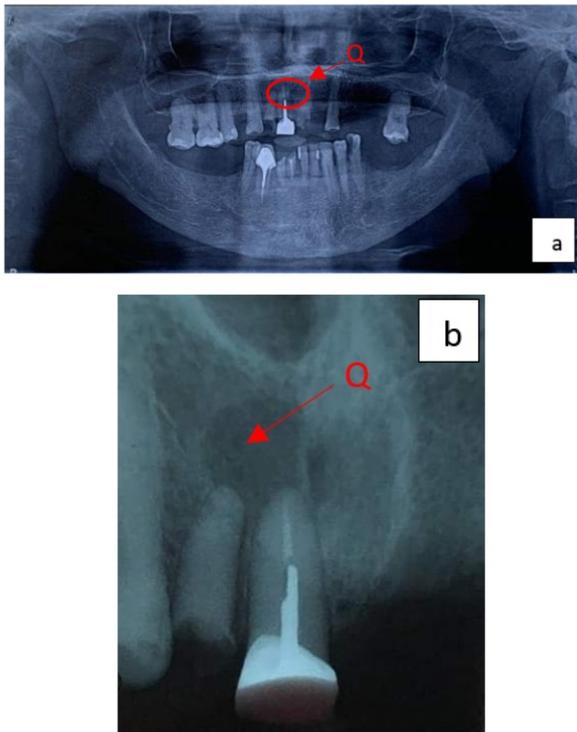


Fig. 1 Radiografía panorámica y periapical
(a) Ubicación del quiste radicular en el sector anterior del maxilar superior

(b) Características radiológicas del quiste radicular.

QR: quiste radicular

Durante la cirugía se tomaron las consideraciones antisépticas, se aplicó un enjuague en la cavidad oral con Clorhexidina al 0.12%, luego se colocaron en tubos estériles de 5ml (GIBCO by life technologies) DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (1X) con dosis de antibiótico (Meropenem), se mantuvieron a 4°C con el objeto de conservar la viabilidad de las células.⁽¹¹⁻¹³⁾

Obtención de la Muestra

En la campana de flujo laminar la muestra se lavó tres veces con solución buffer de fosfato PBS 10% (phosphate buffered solution) frío, luego sobre una placa Petri se realizaron los cortes y limpieza de exceso de tejido eliminando las caras externas y se separó el centro interno de la parte externa de la muestra con bisturí hoja 11 para luego ser lavado nuevamente tres veces con PBS al 10%. Luego se colocó en tubos eppendorf de 18ml donde con una tijera quirúrgica esterilizada se llegó a trozar la muestra.⁽¹⁴⁾

Aislamiento y cultivo

Para el aislamiento de las células del quiste radicular inflamatorio la muestra fue dividida en 2 eppendorf una que fue colocada en la placa de cultivo, se añadió 15ml de medio nutritivo compuesto por medio GIBCO completado con suero fetal al 10% mas Meropenem 10ul, se introdujo a la incubadora a 37°C en atmósfera húmeda a un 95% de aire y un 5% de CO₂ y la otra muestra se sometió para el recuento celular y viabilidad celular.⁽¹⁴⁾

Utilizando el microscopio se enfocó en las líneas de la cuadrícula de la cámara de New Bauer con el objetivo 10X. Se contó el número de células no teñidas en un conjunto de 16 cuadrados.

Al cuarto día se cambió el medio de cultivo para eliminar los restos de celulares no adherentes lavándose 3 veces con solución buffer de fosfato PBS (Phosphate buffered solution) frío 10ml. Las células se mantuvieron hasta alcanzar la proliferación celular y conformación de colonias a partir del sexto día, con cambios periódicos del medio en días variados.

Inmunofluorescencia P53

Previamente para realizar la inmunofluorescencia se sembraron las células en los "pozos de cultivo". En la preparación se empezó sumergiendo el cubre objetos en alcohol sujetado por una pinza para ser secados con la llama del mechero para ser colocados en cada fondo del pozo. Por otro lado, luego de realizar un split de las placas de cultivo se procedió retirar 15ml de muestra para ser centrifugadas a 15000 rpm X 5 min, se eliminó el sobrenadante de cada tubo y esta muestra se combinó con el medio de cultivo, Este contenido fue distribuido a cada uno de los pozos cubriendo en su totalidad a cada uno de los cubreobjetos de los 6 pozos que se encontraban en el fondo. A los seis días se verificó su crecimiento y proliferación celular con el inicio para la fijación de cada muestra. Se succionó el contenido de cada pozo y se administró paraformalaldehído (PFA 4%).⁽¹²⁾

Posteriormente se creó una cámara húmeda usando una placa Petri y dentro de ella papel humedecido con agua destilada y a cada lado dos cánulas. Luego se procedió a colocar un trozo de parafil en la cámara húmeda retirando el PBS de los cultivos.

Las láminas cubre objetos fueron colocados encima del parafil, se procedió a colocar 3 gotas de Cloruro de Amonio (5min) para que previamente se prepare la solución de bloqueo (630 PBS + 70 BSA + 3.5 Triton al 20%), una vez preparado la solución de bloqueo succionamos el cloruro de amonio y se lavó con PBS 10%, se colocó en el centro la solución de bloqueo hasta que cubra la lámina por 30min 70µl (primer anticuerpo 400µl de bloqueoanti p53 rabbit 3µl), aspirar nuevamente la solución de bloqueo, procedemos a hacer 3µl + 400µl de bloqueo sin tritón y debe reposó durante 1 hora (PBS + BSA + ANTIRABBIT).

Después de pasar el tiempo indicado debemos de succionar y lavar con PBS 10% y que cubra la placa por un tiempo de 3 minutos y repetirlo 3 veces. Se fue preparando durante ese tiempo al segundo anticuerpo (Rgreen 1µl + solución de bloqueo (sin triton) + Hoeschst (1µl). Pasamos a volver a succionar el PBS y se coloca la segunda solución sobre la lámina 100µl por 30 min, pasamos a succionar luego de transcurrido el tiempo y volvemos a lavar con PBS 10% por 3 minutos, succionamos el PBS y colocamos el aceite de medio de montaje (5µl) cubriendo toda la lámina para luego colocarlo encima del portaobjetos, se recomienda sellar los bordes con acetona, se esperó a que seque y se procedió a observarlo en nuestro microscopio invertido con luz apagada programándolo para la fluorescencia.

RESULTADOS

Las células fueron evaluadas en el microscopio invertido con una magnificación de 10X, se observó, en el día 1 en la figura 2a la presencia de células circulares redondeadas aisladas, con bordes irregulares de pequeño tamaño. Luego en el día 4 en la figura 2b, se encontraron células alargadas y planas mononucleadas fibroblásticas y otras en división celular, así como algunas células mitóticas alrededor del tejido fusiforme y algunas células en apoptosis. Luego el día 10 en la figura 2c, se cambió el medio de cultivo eliminando las células no adheridas con el lavado de PBS 10% observándose una placa limpia de células fibroblásticas adheridas. Para el día 17 en la figura 2d se observó el aumento de células alargadas y aplanadas por varios sectores de la placa de cultivo acompañados de otros restos celulares. Del día 20 al 25 en la figura 2e y 2f se observó la proliferación celular inclusive capas celulares sobrepuestas cubriendo casi un 90% de toda la placa de cultivo. El uso de este nuevo protocolo modificado para el aislamiento y cultivo de células fue de forma rápida y replicable obteniendo siete cultivos de la misma muestra, disminución de células en apoptosis y rompiendo el desafío de la contaminación de las placas.

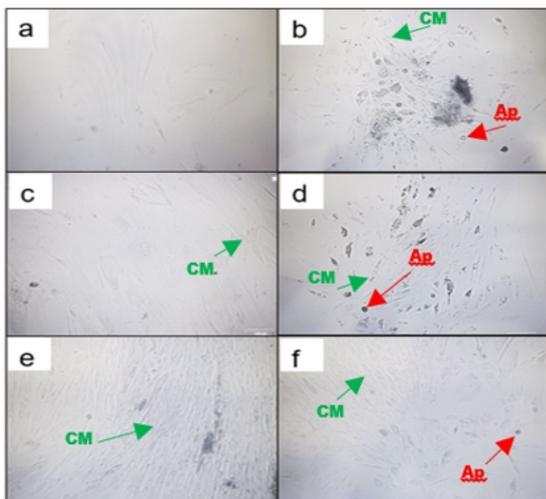


Fig. 2

- a. Aparición de células alargadas y aplanadas día 4
 - b. y c. Crecimiento y proliferación celular 10mo y 14vo día
 - d. Células alargadas y aplanadas por varios sectores de la placa de cultivo acompañados de otros restos celulares
 - e. y f. Crecimiento de células con cambios periódicos
- CM: Células madre fibroblásticas de quiste radicular inflamatorio.
Ap: Célula apoptótica.

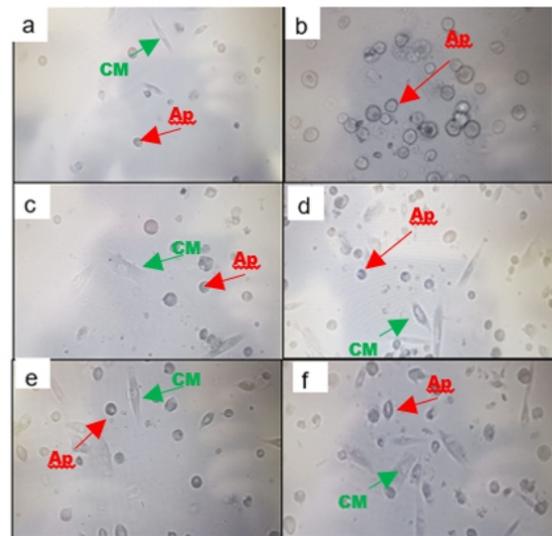


Fig. 3

Crecimiento y proliferación de células alargadas con apoptosis

- a. Pozo uno de cultivo celular con gran número de apoptosis y presencia de dos células madre fibroblásticas
 - b. Pozo dos solo encontramos la presencia de células apoptóticas
 - c. Pozo tres presencia de dos células con varias células apoptóticas
 - d. Pozo cuatro presencia de varias células alargadas y aplanadas y células apoptóticas
 - e. Pozo 5 presencia de cinco células alargadas y aplanadas con células apoptóticas
 - f. Pozo 6 presencia de doce células aplanadas y alargadas con células apoptóticas.
- CM: Células madre fibroblásticas
Ap: Célula apoptótica

En el día 35 se realizó el procesado y fijación de células con los marcadores p53 en los portaobjetos, que fueron llevados al microscopio invertido observándose la tinción de los receptores p53 a nivel del citoplasma y con mayor intensidad a nivel del núcleo como se muestra en la figura 3 a una magnitud de 10X con luz fluorescente.

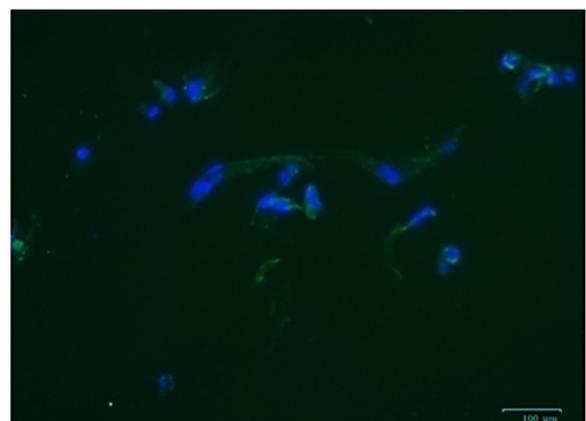


Fig. 4 Gen P53 en células de quiste radicular inflamatorio

DISCUSIÓN

Durante el aislamiento y cultivo de las células madre del quiste radicular inflamatorio la principal dificultad fue el manejo de las muestras al tratar de preservarlas y/o evitar su contaminación. Se probaron diferentes protocolos como el de Camejo y Marelli^(13,15) con el uso de la colagenasa tipo I pero, a pesar de ello no se logró el efecto deseado del crecimiento celular en todos los intentos. Se procedió a disminuir la concentración de la colagenasa tipo I y al cabo de 6 días las pocas células comenzaban a morir. Por otra parte Oláñez⁽¹¹⁾ utiliza en su estudio la Tripsina/EDTA pero tampoco se obtuvieron resultados positivos tomando la decisión de no usarlas en el cultivo celular. Se obtuvieron células del quiste radicular inflamatorio después del día 4. Sin embargo para Trejo⁽¹²⁾ la proliferación celular fue a partir del día 3 con presencia de células fibroblásticas si bien, no pretendemos decir que es una mejor técnica de aislar y cultivar células, podemos generar un protocolo modificado más adaptado a nuestro manejo de aislamiento de células.

La importancia del reporte del caso al encontrar una nueva forma modificada del aislamiento y cultivo de células a partir del quiste radicular inflamatorio y a la vez permite conocer el manejo del cultivo del tejido. Sin embargo en el estudio de Marelli⁽¹³⁾ también podemos encontrar el aislamiento de células del quiste radicular usando métodos diferentes y con el uso de colagenasa tipo I como se mencionó anteriormente en el reporte.

Por otro lado, los ensayos de inmune fluorescencia muestran que las células presentes en nuestros cultivos del quiste radicular inflamatorio son positivas a los marcadores de p53 no encontrando una literatura específica y comparable, pero si con otros ensayos previos de aislamiento y caracterización de Ameloblastomas o queratoquiste siendo positivas las colonias celulares a los marcadores de p53 por Maturana⁽¹⁰⁾ o como en los estudios de expresión de marcadores ki-67, p53, p16 y bcl-2 en ameloblastomas encontrados por Fleischmacher y Mendes^(16,17) siendo estas de comportamiento neoplásico a comparación del quiste radicular inflamatorio.

CONCLUSION

Este estudio mostró que a partir del tejido del quiste radicular inflamatorio utilizando métodos enzimáticos, es posible obtener células o colonias individuales después de un periodo de cultivo de 4 a 25 días. También comprendimos que no necesariamente debemos estandarizarnos en un protocolo ya establecido para obtener el aislamiento y cultivo de células, pudimos adaptar nuestros propios protocolos ofreciendo a la vez un mejor manejo y replicación para obtenerlas. Y por último se encontró al gen p53 con el marcador para p53 tanto en el núcleo como en el citoplasma de células del quiste radicular inflamatorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Ruiz PÁ. Mecanismos inmunológicos involucrados en la patogénesis de los quistes periapicales: Una revisión de los aspectos actuales. Revista ADM. :6.

- [2] Álvarez JDP. Quiste radicular de origen odontogénico. Revista Nacional de Odontología. 30 de diciembre de 2014;10(19):91-100.
- [3] Taylor AM, Irigoyen ME, Franco MAD, Tejero AT. Quistes odontogénicos. Análisis de 856 casos. MEDICINA ORAL. 2002;7:8.
- [4] Rojas Jimenez DDS D, Zamora Arce D, Vargas Monge N, Guillén Colombari DDS, MSc D. Quiste radicular infectado. Revisión de conceptos básicos y reporte de un caso clínico. Odovtos - Int J Dent Sc. 1 de diciembre de 2015;17(2):23.
- [5] Wer Rivera. Quiste Periapical [Internet]. calameo.com. 2013 [citado 20 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.calameo.com/read/0059607541daa9ab9e7c8>
- [6] Carrillo García C, Vera Sempere F, Peñarrocha Diago M, Martí Bowen E. The post-endodontic periapical lesion: Histologic and etiopathogenic aspects. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet). diciembre de 2007;12(8):585-90.
- [7] Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 1 de noviembre de 2004;15(6):348-81.
- [8] Lin LM, Huang GT-J, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. J Endod. agosto de 2007;33(8):908-16.
- [9] Brad Neville Douglas D. Damm Carl Allen Jerry Bouquot. Oral and Maxillofacial Pathology - 3rd Edition [Internet]. 2008 [citado 6 de junio de 2020]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/oral-and-maxillofacial-pathology/neville/978-1-4160-3435-3>
- [10] Maturana Ramírez A, Aitken Saavedra J, Reyes Rojas M, Rojas-Alcayaga G. Expresión inmunohistoquímica de ki-67 y p53 en tumor odontogénico queratoquístico en comparación con ameloblastoma multiquístico. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral. abril de 2014;7(1):12-6.
- [11] Oláñez D, Salmen S, Padrón K, Lobo C, Díaz N, Berrueta L, et al. Aislamiento y cultivo de células madre posnatales de dientes primarios. Universitas Odontologica [Internet]. 30 de junio de 2014 [citado 29 de mayo de 2020];33(70). Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/5870>
- [12] Trejo Iriarte CG, Ramírez OR, García AM, Verdín Terán SL, Gómez Clavel JF. Aislamiento de células mesenquimales del ligamento periodontal de premolares extraídos. Método simplificado. Revista Odontológica Mexicana. 1 de enero de 2017;21(1):13-21.
- [13] Marrelli M, Paduano F, Tatullo M. Cells Isolated from Human Periapical Cysts Express Mesenchymal Stem Cell-like Properties. Int J Biol Sci. 16 de noviembre de 2013;9(10):1070-8.
- [14] Camejo Suárez, MaV; MD E; Payares Trujillo, G; Márquez, MaL; Espinoza Aliso, M. Aislamiento, cultivo y diferenciación in vitro de células madre mesenquimales adultas de pulpa dentaria humana [Internet]. 2015 [citado 31 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2015/1/art-1/>
- [15] Camejo Suárez, MaV; MD E; Payares Trujillo, G; Márquez, MaL; Espinoza Aliso, M. Aislamiento, cultivo y diferenciación in vitro de células madre mesenquimales adultas de pulpa dentaria humana [Internet]. 2015 [citado 31 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2015/1/art-1/>
- [16] Fleischmacher Abrahamz N, Rivera H. Expresión del ki-67, p53, p16 y bcl-2 en Ameloblastomas. Revista Científica Medicina. 2015;18(2):18-23.
- [17] Ra M, Jf C, I van der W. A comparative immunohistochemical analysis of COX-2, p53, and Ki-67 expression in keratocystic odontogenic tumors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 7 de enero de 2011;111(3):333-9.

FONDOS: el presente artículo fue financiado por fondos internos para la Investigación Universidad Católica de Santa María, RESOLUCION 27144-R-2020

Recibido el 21 de mayo del 2020 y aceptado para su publicación el 30 de junio del 2020