

23° JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
21° JORNADAS PARA JÓVENES INVESTIGADORES
13° JORNADAS PARA ESTUDIANTES INTEGRANTES DE PROYECTOS.
29 DE AGOSTO 2024
ISSN: 1514-6898

DESARROLLO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE NEOPLASIAS BUCALES

DEVELOPMENT OF PRIMARY CULTURES OF ORAL NEOPLASMS.

**Mayocchi, K.; Merino, G.; Blasetti, N.; Arcuri, A.; Arcuri, M; Mayocchi, R. M.;
Levalle, M. J.; Domínguez, M.; Lazo, J; Serafino, B.; Molina, M.; Ferro, M.;
Krause, M.; Darrigran, L.; Sirimarco, K., Echeverria, N.**

LBMB (Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología) Facultad de
Odontología UNLP.

CRIT (Comité Regional de Investigación Tumoral) Facultad de Odontología
UNLP.

Calle 50, 1 y 115. La Plata CP 1900. La Plata Argentina.
karinamayocchi@gmail.com

Fuente de Apoyo Financiero: U.N.L.P.

“Sin conflicto de intereses”

Resumen

El desconocimiento de las bases moleculares que participan en el desarrollo de quistes y neoplasias de origen odontogénico, hacen indispensable el establecimiento de líneas celulares como modelos de estudio y la búsqueda en ellas de moléculas que podrían estar involucradas en cualquiera de las etapas del desarrollo y progresión de dichas patologías. En este proyecto se trabajó en establecer cultivos primarios de quistes y tumores odontogénicos como modelos de estudio. El desarrollo de líneas tumorales contribuyó tanto al diagnóstico como a blancos terapéuticos siendo coadyuvantes del tratamiento quirúrgico de estas patologías y evitar así su recidiva.

Palabras clave: neoplasias-modelo-cultivo

Summary

The lack of knowledge of the molecular bases that participate in the development of cysts and neoplasms of odontogenic origin makes it essential to establish cell lines as study models and search in them for molecules that could be involved in any of the stages of development and progression. of these pathologies. In this project we worked to establish primary cultures of odontogenic cysts and tumors as study models. The development of tumor lines contributed to both the diagnosis and therapeutic targets, being adjuvants to the surgical treatment of these pathologies and thus preventing their recurrence.

Keywords: neoplasms-model-culture

Introducción

Durante el desarrollo del presente proyecto se han consolidado varias líneas de Investigación desde el LBMB (Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología) de la Facultad de Odontología U.N.L.P. En una de esas líneas se dio a conocer la importancia de los mecanismos de la odontogénesis en el estudio y entendimiento de los quistes y tumores de origen odontogénicos, y que la presencia de Restos Epiteliales de Malassez (REM) presentes en el periodonto de sostén, podrían actuar como reservorio de Células Madre. Estas células pueden diferenciarse a linajes celulares acorde a las modificaciones del entorno,⁹. El desconocimiento de las bases moleculares que participan en el desarrollo de quistes y neoplasias de origen odontogénico, hicieron indispensable el establecimiento de líneas celulares como modelos de estudio y la búsqueda en ellas de moléculas que podrían estar involucradas en cualquiera de las etapas del desarrollo y progresión de dichas patologías. Las técnicas de cultivos celulares se han desarrollado desde principios de siglo y han demostrado su utilidad en diversos campos de la medicina.⁴⁻⁵⁻⁶. Son muchos los tipos celulares que se han intentado adaptar a condiciones de vida "in vitro", pero no todos ellos responden de la misma manera, existiendo una gran heterogeneidad en cuanto al rendimiento en cultivo, curvas de crecimiento, duración, etc. También son numerosos los tumores que se han conseguido mantener en cultivo «in vitro», pero tampoco muestran una respuesta común, puesto que mientras unas células tumorales crecen y se dividen con extrema facilidad e incluso sufren pérdida de la inhibición por contacto, otras lo hacen difícilmente y ni siquiera logran un crecimiento inicial satisfactorio. A partir de ello se pudo coadyuvar al diagnóstico y comportamiento de ciertos tumores, estudiando su proliferación y como blanco terapéutico en primera instancia al tratamiento quirúrgico de estas lesiones y evitar así su recidiva. La caracterización morfofuncional a partir de líneas celulares *in vitro* de quistes y tumores odontogénicos, permite contribuir al conocimiento sobre el desarrollo de patologías tumorales a partir de patologías existentes, como los trastornos potencialmente malignos, obtener nuevos resultados y/o confirmación de hallazgos ya existentes desde los ensayos celulares, generar conocimientos sobre fenotipos celulares y células madres de quistes odontogénicos en su diferenciación a tejidos patológicos neoplásicos y también permite identificar poblaciones tumorales y su traslación a la clínica odontológica.²⁻³

El estudio de las líneas celulares de quistes y tumores odontogénicos también otorga un amplio conocimiento del comportamiento de las células ectomesenquimáticas en relación a la conformación del mecanismo de Transición Epitelio - Mesenquima (TEM), y como se desarrollarían los precursores de patología quística y su posible transformación tumoral.²⁻³

Objetivo

23° JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
21° JORNADAS PARA JÓVENES INVESTIGADORES
13° JORNADAS PARA ESTUDIANTES INTEGRANTES DE PROYECTOS.
29 DE AGOSTO 2024
ISSN: 1514-6898

Establecer cultivos primarios de quistes y tumores odontogénicos como modelos de estudio.

Materiales y Método

Las muestras se obtuvieron del banco de tejidos creado para tal fin en el marco de la atención clínica del Hospital Odontológico Universitario de la Facultad de Odontología de la U.N.L.P., respetando en todos los casos las normas bioéticas y legales vigentes. El estado de salud de los donantes es un requisito que debe ser conocido, ya que éste podría alterar la viabilidad de las muestras. Los dientes se colocaron inmediatamente en frascos estériles con medio de transporte para muestras humanas para mantener condiciones de asepsia, a 4 °C para conservar la viabilidad celular y condiciones fisiológicas. Bajo estas condiciones se llevaron al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, correspondientes a la Unidad de Investigación en Ciencias Biológicas, Básicas, Aplicadas, Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Odontología U.N.L.P., donde radica el Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular. A partir de las biopsias obtenidas se desarrollaron 14 cultivos primarios. Inmediatamente al acto quirúrgico, se identificaron como Quistes o Tumores odontogénicos o CCE, se cortaron fragmentos de 1 cm³ aproximadamente, y se colocaron la mitad obtenida en 2 ml de medio DMEM-F12 (Gibco, BRL) a 4°C, y la otra mitad en formaldehído 10 % según protocolo de bioseguridad para su estudio histopatológico. Las muestras se transportaron al LBMB (Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la FOLP). Bajo cabina de seguridad biológica, se procedió a cortar las muestras para la conformación de explantos, con tijeras de encías y bisturí y se colocaron en cajas de 6 pozos con medio de cultivo. Se incubaron a 37°C en medio DMEMF-12 (Gibco, BRL) suplementados con 10 % de SFB. Finalmente, las células se incubaron a 37°C, 5% CO₂ hasta la formación del cultivo a 80% de confluencia para iniciar el subcultivo. Para el control de contaminación micótica se realizaron cultivos de hisopado de superficies de las lesiones neoplásicas, mediante pruebas fenotípicas MALDI-TOF, mediante secuenciación del ADN ribosomal en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Carlos G Malbran.

Subcultivo de líneas celulares

Para subcultivar las células, se desechó el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS, pH 7.0. Posteriormente se agregó PBS, pH 7.0 + EDTA 6.8 mM, y se añadió tripsina 0.25 % (Gibco, BRL) durante 5 min. Una vez observado el desprendimiento celular se colocaron en tubo cónico con agregado de PBS adicionado con SFB 1%. Se procedió al centrifugado y tras desechar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de DMEM-F12.

Congelamiento de las líneas celulares

Se colocaron 2 x 10⁶ aprox. células por criotubo. Se utilizó 1 ml de medio de congelamiento (500 µl de SFB, 400 µl de medio de cultivo completo y 100 µl de DMSO). Se criopreservaron en fase gaseosa de nitrógeno líquido.

Descongelamiento de las líneas celulares

Se colocaron en baño húmedo a 37°C hasta el descongelamiento del medio. Una vez que el medio se descongeló, se transfirió el contenido a un tubo falcón, se agregó gradualmente PBS frío y se centrifugó a 300 xg, durante 5 min a 4°C. Posteriormente se resuspendieron las células en medio suplementado fresco previamente templado a 37°C y se colocaron en cajas de cultivo.

Observación Microscópica

Se realizaron observaciones mediante microscopio invertido de contraste de fases Leica LD1000. Se realizó la observación diariamente del crecimiento de las células en cultivo hasta llegar a la confluencia del 80%. Se realizaron tinciones de las células en monocapa sobre caja de cultivo y se tiñeron con HE.

Resultados

Sobre este estudio experimental, se observó la necesidad de prevenir la contaminación inicial por microorganismos. Se han hallado sobre una n de 14 muestras, 9 aislamientos, y tipificaciones de *Candida* spp. En un caso con diagnóstico anatomopatológico de ameloblastoma folicular, se ha hallado la coexistencia de *Candida albicans* con *Cystobasidium slooffiae* (*Rhodotórula slooffiae*) y un caso de *Meyerozyma guillermondii* en una glositis romboidal media. Para ello la toma de muestras se realizó en medio de cultivo conteniendo penicilina, estreptomycin y gentamicina y después de realizar los explantes, se efectuaron varios lavados con solución salina y el agregado de Anfotericina B.⁸ (fig. 1). Respecto al método de cultivo, se ha logrado mejor resultado mediante la técnica de explante, utilizada también para el disgregado de tejido dentario, tanto pulpar como de saco y también utilizada anteriormente para quistes odontogénicos. El medio de cultivo utilizado fue DMEM-F12 (1 :1), suplementado con el SBF a concentración del 10 %, ya que en menor cantidad las células se quedan estabilizadas sin multiplicarse y cantidades superiores parecen inhibir el crecimiento celular obteniendo buen rendimiento del cultivo. (fig. 2) La elección del momento de fijación del cultivo depende de la observación directa del mismo para conocer el momento de mayor índice mitótico. En nuestra experiencia se ha realizado la fijación entre los 7 y 20 días, obteniéndose el mayor número de mitosis en los cultivos fijados entre los 7 a 10 días del cultivo. También se han conseguido mejores resultados al fijar los cultivos primarios antes de realizarse los subcultivos, ya que hemos observado diferenciaciones celulares. (fig. 3 y 4) Del total de las 14 muestras procesadas, en 10 hubo crecimiento de células tumorales. El estudio citomorfológico de cada cultivo primario obtenido nos permite estudiar las características celulares en cada tipo de tumor. La morfología de estas células ha sido muy heterogénea. Las células presentan forma epitelial con núcleos de tamaño variable (20x). de apariencia epitelial con crecimiento en placas o colonias que van aumentando en número de células, si bien éstas no llegan a confluir en monocapa. (fig. 5) En algunos cultivos, sin

23° JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
21° JORNADAS PARA JÓVENES INVESTIGADORES
13° JORNADAS PARA ESTUDIANTES INTEGRANTES DE PROYECTOS.
29 DE AGOSTO 2024
ISSN: 1514-6898

embargo, las células tenían formas redondeadas o alargadas con citoplasmas muy densos, que también crecían en forma de placa o colonia. Común a todos los cultivos fue la presencia de nucléolos prominentes y de células bi o multinucleadas, así como la gran variación en el tamaño de los núcleos. (fig.6)

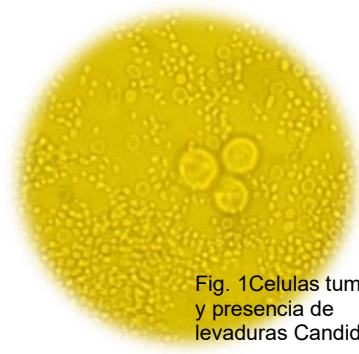


Fig. 1 Células tumorales y presencia de levaduras *Candida* sp.

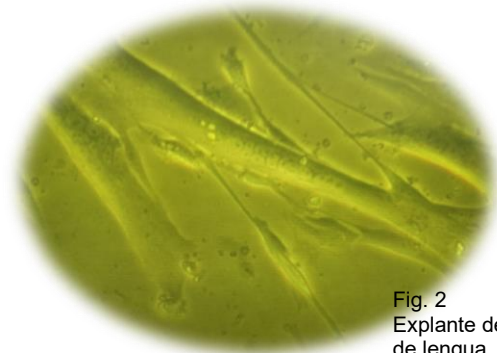


Fig. 2 Explante de Ca de lengua

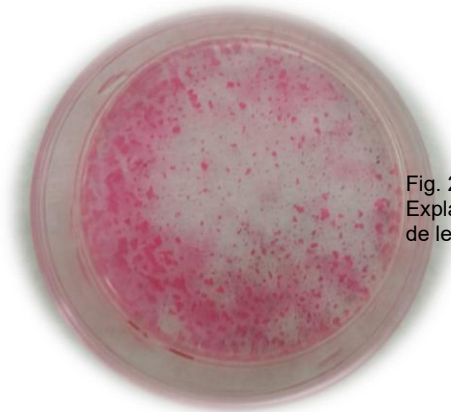


Fig. 2 Explante de Ca de lengua

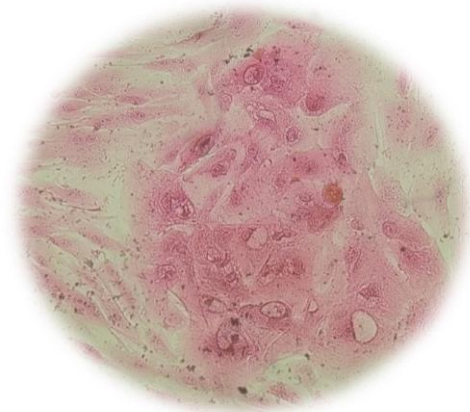
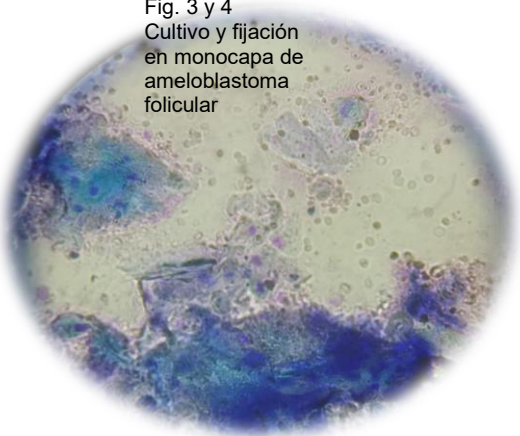


Fig. 3 y 4 Cultivo y fijación en monocapa de ameloblastoma folicular



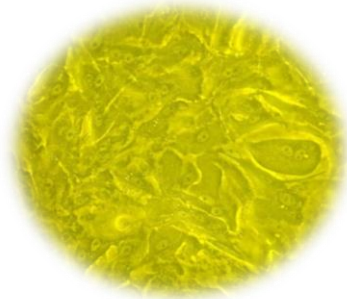


Fig. 5. Células tumorales
Ca de lengua

Fig. 6. Células tumorales
ameoblastoma folicular I

Discusión.

Respecto a la duración del tratamiento enzimático, se han probado distintos tiempos de incubación con colagenasa tipo II a concentración de 2 gr disueltos en 100 ml de medio de cultivo completo y trazas de DNAsa. ⁷En nuestra experiencia dependiendo la textura del tumor, la técnica con la que se consiguieron mayor número de células aisladas es la técnica del explante, ya que la disgregación enzimática se asocia a viabilidad menor en perjuicio del rendimiento posterior del cultivo. ⁴ También se obtuvieron mejores resultados utilizando para la incubación medio adicionado con SBF 10%.

Conclusión

Las aplicaciones de los cultivos primarios de tumores bucales, aportan datos fidedignos acerca del comportamiento del tumor y características morfofuncionales de sus células. Dichos cultivos están siendo encaminados principalmente a la obtención del cariotipo para estudios citogenéticos, por las dificultades de realizar cultivos directos debido a la gran complejidad de la técnica. Otro desarrollo importante es el estudio metabólico sobre el conocimiento del mecanismo hormonal de estas células tumorales, tanto parácrino como autócrino. También se aplican para estudios de biología molecular orientados a la localización de oncogenes o genes alterados. Se destaca su utilización para realizar ensayos terapéuticos tanto de las drogas actualmente utilizadas en el tratamiento del cáncer bucal como con un carácter prospectivo de drogas nuevas que puedan mostrar un efecto citotóxico menor. Estos datos serían de una gran importancia clínica traslacional. Desde este proyecto se mejoraron las condiciones para la obtención, cultivo y caracterización de acuerdo de las células madre tumorales con criterios morfológicos y de expresión de marcadores de superficie específicos y su diferenciación mediante la técnica del explante directo y cultivos 3D. Cabe destacar la innovación en la

23° JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
21° JORNADAS PARA JÓVENES INVESTIGADORES
13° JORNADAS PARA ESTUDIANTES INTEGRANTES DE PROYECTOS.
29 DE AGOSTO 2024
ISSN: 1514-6898

metodología empleada para la Facultad de Odontología, para un mejor diagnóstico, tratamiento y traslación clínica.

Referencias bibliográficas

1. Mayocchi,K; Giménez,J; Arcuri,M; Levalle,MJ; Blasetti,N; Arcuri,A; Sirimarco,K; Mayocchi,RM; Darrigran,L; Echeverría E; Molina,M; De Vita,L. Aspectos celulares del quiste dentígero. V Jornadas de Actualización en Prácticas Odontológicas Integradas PPS-SEPOI.2022
2. Mayocchi, K; Arcuri, M; Giménez, J; Arcuri, A; Mayocchi, RM; Blasetti, N; Levalle, M; Darrigran, L; Sirimarco, K; Echeverría, N; Molina, M; De Vita, L. Valor diagnóstico de la citología exfoliativa para el cáncer bucal. XXI Jornadas Científicas de la Facultad de Odontología, XIX Jornadas para Jóvenes Investigadores y XI Jornadas para Estudiantes Integrantes de Proyectos .2022. Institución de origen: Facultad de Odontología.ISSN: 1514-6898Pág: 49-52.<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/153986>
3. Mayocchi, K; Blasetti, N; Mayocchi, RM; Darrigran, L; Echeverría N; Sirimarco, K. Quiste folicular inflamatorio y quiste periapical como patologías reactivas. Revista de la Facultad de Odontología; año 2021. XX Jornadas Científicas de la Facultad de Odontología UNLP, XVIII Jornadas para Jóvenes Investigadores y X Jornadas para Estudiantes Integrantes de Proyectos.ISSN: 1514-6898. Pág. 44-46
4. Sanjay CJ, Chaya M David, Rachna Kaul, Ramnarayan BK, Prashanth Ramachandra. Intraosseous ameloblastoma masquerading as exophytic growth: a case report. Imaging Science in Dentistry 41; 89-93, 2011
5. Amm H.M, Rollins D.L, Ren C, Dong J, DeVilliers P, Rivera H, MacDougall M. Establishment and characterization of a primary calcifying epithelial odontogenic tumor cell population. J Oral Pathol and Med 43:3; 183-190, 2014.
6. Colavita,M; Rodriguez, J. P.; Stoyanoff, T; Espada, J; Todaro, J; et al.; Optimización de cultivos primarios de células de carcinoma renal de células claras como modelo "in vitro" para estudios metabólicos y determinantes de progresión neoplásica; Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina; Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste; 36; 2-2016; 6-17
7. Darrigran, L; De Vita,L; Mayocchi, RM; Serafino, B; Mayocchi, K; Blasetti, N; Arcuri, M. Efecto de la anfotericina B en cultivo de células

23° JORNADAS CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
21° JORNADAS PARA JÓVENES INVESTIGADORES
13° JORNADAS PARA ESTUDIANTES INTEGRANTES DE PROYECTOS.
29 DE AGOSTO 2024
ISSN: 1514-6898

madre mesenquimales de pulpa dental. Memorias de las Primeras Jornadas de Farmacología y Terapéutica 2023. 978-631-00-3402-7
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/165063>

8. Mayocchi, K; Mayocchi, RM; Blasetti, N; Arcuri, A; De Vita, L;| Sirimarco, K. Restos epiteliales de Malassez y su función en la reparación apical. V Jornada Internacional y IV Jornada Estudiantil de Endodoncia "A" Facultad de Odontología 2020. ISBN: 978-950-34-1934-2 Pág. 78-79
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/105811>