



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
CÁTEDRA DE BIOQUÍMICA

Tesina de Grado
Licenciatura en Bioquímica

Estudio de los efectos de un microambiente hipóxico en queratinocitos humanos *in vitro* y correlato con alteraciones del microambiente en la patología de liquen plano oral

Natali D’Aiuto Villalba

Tutor: Dr. Miguel Arocena Sutz

Co-tutor: Dr. Ronell Bologna

Montevideo, Uruguay
2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis tutores, los Dres. Miguel Arocena y Ronell Bologna por ser mi guía en este trabajo, principalmente a Miguel, por su gran dedicación, por su paciencia y por toda su enseñanza, que continúa al día de hoy. A Ronell y todo el equipo de la cátedra de Patología Molecular de la Facultad de Odontología, especialmente a Celeste, por su dedicación y paciencia.

A los Dptos. de Genómica y de Proteínas y Ácidos nucleicos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable por prestarme sus instalaciones y equipos para llevar a cabo gran parte de este trabajo.

A la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Odontología, especialmente a todos mis compañeros por su apoyo.

A toda mi familia, padres, hermana, abuela, tíos y primos, gracias por su amor y su apoyo, por siempre estar presentes en mis logros y también en las derrotas.

Muy especialmente a mi madre y a mi padre, por todo su esfuerzo, dedicación y apoyo desde siempre para realizar mi carrera y alentarme a seguir siempre adelante, por su paciencia y amor incondicional.

A Gabriel, por su gran amor y su apoyo para no bajar los brazos y continuar, por hacer que todo sea más fácil y más lindo, y por su gran paciencia, sobre todo en este último tramo.

A Marta, Fernando, cuñados y cuñadas, por su cariño y estar siempre atentos a mis estudios alentándome a seguir adelante.

A mis amigas y amigos de siempre, por acompañarme en cada momento y darme su apoyo siempre.

A mis amigas que me dejó la querida Facultad de Ciencias, por todas las horas y días que hemos pasado festejando y sufriendo juntas (y comiendo, por supuesto). Por su amistad, por siempre alentarnos a seguir y no bajar los brazos, por todos los momentos compartidos, y por hacer todo esto mucho más lindo y divertido.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	5
1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	8
2.1. Hipoxia.....	8
2.2. Mucosa Oral.....	9
2.3. Liquen Plano Oral.....	11
2.4. Cáncer Oral.....	12
2.5. Línea celular HaCaT.....	14
2.6. Variante del modelo Hipoxia.....	14
2.7. Marcadores de Hipoxia.....	15
2.7.1. Hypoxyprobe.....	15
2.7.2. GLUT-1.....	16
3. Objetivos.....	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. Materiales y métodos.....	19
4.1. Línea celular y cultivo celular.....	19
4.2. Método de inducción de un microambiente hipóxico <i>in vitro</i>	19
4.3. Observación del comportamiento de las células por microscopía de contraste de fases.....	20
4.4. Observación de cambios morfológicos de las células por microscopía confocal.....	20
4.5. Inmunocitoquímica con Hypoxyprobe <i>in vitro</i>	21
4.6. Inmunocitoquímica con GLUT1 <i>in vitro</i>	21
4.7. Marcaje con la sonda fluorescente Nile Red <i>in vitro</i>	22
4.8. Inmunohistoquímica con GLUT1 <i>in vivo</i>	23

5. Resultados y Discusión.....	26
5.1. Observación de cambios morfológicos de las células HaCaT sometidas a hipoxia inducida por cubreobjetos.....	26
5.2. Detección de hipoxia mediante el marcador pimonidazol <i>in vitro</i> en células HaCaT sometidas a hipoxia inducida por cubreobjetos.....	30
5.3. Detección de GLUT1 <i>in vitro</i> en células HaCaT sometidas a hipoxia inducida por cubreobjetos.....	33
5.4. Detección de lípidos con el marcador Nile Red <i>in vitro</i> en células HaCaT sometidas a hipoxia inducida por cubreobjetos.....	34
5.5. Detección de GLUT1 <i>in vivo</i> en preparados de Liquen Plano Oral.....	36
6. Conclusiones.....	41
7. Perspectivas a futuro.....	43
8. Bibliografía.....	44

ABREVIATURAS

°C – grados Celsius

µg – microgramo

µL – microlitro

µM – micromolar

mL – mililitro

mM - milimolar

mmHg – milímetro de Mercurio

nm - nanometro

Ac - Anticuerpo

BSA - Bovine Serum Albumin

CO₂ – Dióxido de carbono

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA - Ácido Etilendiaminotetraacético

GLUT-1 – Transportador de Glucosa 1

HIF-1 – Factor inducido por hipoxia-1

LPO – Liquen Plano Oral

PBS – Buffer salino de fosfato

PAF – Paraformaldehído

pO₂ – presión de oxígeno

OMS – Organización Mundial de la Salud

OSCC – Carcinoma oral de células escamosas

SFA – Suero Fetal Bovino

1. RESUMEN

El nivel de oxígeno es uno de los parámetros fundamentales del microambiente que rodea a las células, tanto *in vitro* como a nivel tisular. Una disminución de dicho nivel lleva a condiciones hipóxicas que impactan profundamente en la fisiología celular y en la homeostasis tisular. En particular, se ha visto que la hipoxia es un factor fundamental en el proceso de génesis tumoral, así como en patologías precursoras de cáncer, como es el Liquen Plano Oral. Ésta es una patología inflamatoria que afecta al epitelio oral y que tiene una gran relevancia clínica ya que afecta a casi un 4% de la población, y ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud como una condición precursora del carcinoma oral. Existen evidencias de que presenta un microambiente alterado, eventualmente hipóxico; sin embargo, la presencia de marcadores de hipoxia en Liquen Plano Oral no ha sido estudiada en profundidad. Por lo tanto, este trabajo consistió en determinar si es posible establecer un correlato entre las alteraciones que sufren queratinocitos normales en un microambiente hipóxico *in vitro* y aquellas que aparecen en los queratinocitos en el epitelio de la mucosa oral en el contexto de la patología Liquen Plano Oral. Para ello se estudió el comportamiento *in vitro* de queratinocitos humanos, utilizando la línea celular HaCaT como modelo de queratinocitos orales, en un microambiente hipóxico generado por una variante del método “hipoxia inducida por cubreobjetos”, evaluando cambios morfológicos, así como la detección de marcadores asociados a hipoxia. A partir de inmunocitoquímica y microscopía confocal se pudo detectar la presencia de los marcadores de hipoxia GLUT-1 e Hypoxyprobe en los cultivos celulares de queratinocitos humanos expuestos a un microambiente hipóxico. A su vez, la presencia del marcador hipóxico GLUT-1 se observó mediante inmunohistoquímica en tejido epitelial humano derivado de biopsias de la patología Liquen Plano Oral. En el marco de este proyecto, se plantea continuar con el estudio de marcadores de hipoxia en Liquen Plano Oral, para en un futuro evaluar la presencia del marcador Hypoxyprobe *in vivo*, en pacientes diagnosticados con esta patología.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Hipoxia

La hipoxia es un estado de deficiencia del oxígeno necesario para llevar a cabo los procesos metabólicos requeridos por las células. El nivel de oxígeno es uno de los parámetros fundamentales del microambiente que rodea a las células, tanto *in vitro* como a nivel tisular, por lo que una disminución de éste puede llevar a condiciones que impactan profundamente tanto en la fisiología celular como en la homeostasis tisular.

A nivel molecular, una disminución de la disponibilidad de oxígeno necesario para las células lleva a la activación de factores de transcripción conocidos como “Factores inducidos por Hipoxia” (HIFs - Hypoxia-inducible factors). Particularmente, HIF-1 es un complejo proteico compuesto por dos subunidades, HIF-1 α y HIF-1 β (Peng et al., 2017). Este heterodímero se encuentra inactivo cuando hay abundante oxígeno y, por el contrario, es activado en condiciones de hipoxia (Eltzschig & Carmeliet, 2011). Su función como factor de transcripción es la de aumentar la transcripción de determinados genes que codifican para proteínas que participan en diferentes procesos celulares como la proliferación celular y el metabolismo energético. De esta forma HIF-1 permite a las células adaptarse a condiciones tan adversas, como es el caso de las células alteradas por patologías inflamatorias y por formación de tumores (Marín-Hernández, 2009). A su vez, se ha visto que la hipoxia, particularmente por la expresión de los factores de transcripción HIFs, tiene un rol muy importante en la diferenciación terminal de los queratinocitos, regulando la queratinización de las células epiteliales de la epidermis (Wong et al., 2015).

A nivel tisular, el estado de hipoxia se encuentra frecuentemente asociado a procesos inflamatorios, pudiendo ser tanto un desencadenante de la inflamación como una consecuencia de ésta (Eltzschig & Carmeliet, 2011). Se ha visto que es un factor fundamental en el proceso de génesis tumoral y en el

desarrollo de los tumores. En diversos tipos de cáncer, como por ejemplo el cáncer oral, se ha observado que los marcadores de hipoxia aumentan a medida que se incrementa el grado de displasia de la mucosa oral hasta llegar a la formación de un carcinoma oral (Kujan et al., 2017). Por otra parte, la hipoxia también conduce a la reprogramación metabólica de las células tumorales, que adquieren un fenotipo más glucolítico, secretando lactato y produciendo por ende una marcada acidificación del medio extracelular, que ha sido detectada asimismo en cáncer oral (Becelli et al., 2007).

2.2. Mucosa oral

La mucosa oral, constituida por tejido epitelial y tejido conjuntivo, constituye el recubrimiento interno de la cavidad bucal. Dentro de la misma, se diferencia y clasifica a la mucosa oral de acuerdo a las funciones que cumple. Es así que en la cavidad oral existen tres tipos de mucosa: la mucosa oral masticatoria, la mucosa oral especializada y la mucosa oral de revestimiento. La primera recubre al paladar y las encías, la segunda es la que recubre la superficie dorsal de la lengua, y la mucosa de revestimiento es la que recubre la superficie interna de las mejillas, la superficie ventral de la lengua, el piso de la boca y la superficie interna de los labios.

El tejido epitelial de los tres tipos de mucosa oral es, al igual que la epidermis, un epitelio escamoso estratificado con una capa basal, una capa espinosa y una granular (figura 1), y las células que lo componen son los queratinocitos (Jones & Klein, 2013). En humanos, los epitelios de la mucosa oral masticatoria y especializada poseen además, de la misma forma que la epidermis, un estrato córneo en su superficie, en el cual los queratinocitos culminan su diferenciación, perdiendo sus organelos, volviéndose más aplanados y acumulando en su citoplasma gran cantidad de citoqueratinas, proteínas accesorias a estas y lípidos. Este proceso de diferenciación celular terminal de los queratinocitos formando la capa córnea se denomina queratinización. En la mucosa oral de revestimiento no ocurre dicho proceso.

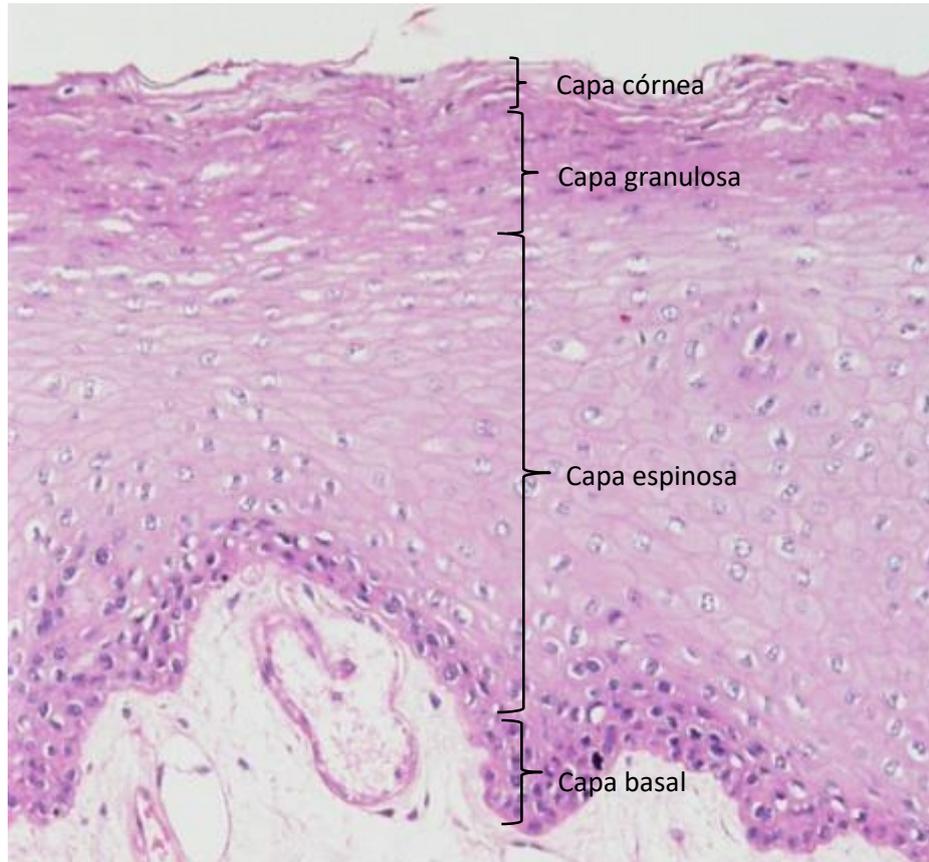


Figura 1. Tejido epitelial de mucosa oral normal, indicándose las cuatro capas que lo componen. Tomada de <https://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/> (imagen libre de copyright).

El tejido conjuntivo de la mucosa oral, al igual que los tejidos conjuntivos de otras mucosas, se conoce como lámina propia, y tiene una presencia abundante de fibroblastos y fibras de colágeno, en particular en la mucosa oral masticatoria (Winning & Townsend, 2000). En el epitelio de la mucosa oral ocurre un recambio continuo de células, empezando por la división celular en la capa basal, continuando en la diferenciación progresiva de los queratinocitos en las capas espinosa y granular y culminando en la descamación en la región superficial, en un proceso similar al de la epidermis, si bien el recambio en la mucosa oral es más rápido: entre 1 y 3 semanas, comparado con entre 4 y 10 semanas en la epidermis (Winning & Townsend, 2000).

En humanos, las regiones de la mucosa oral con mayores tasas de proliferación en la capa basal del epitelio (superficie ventral de la lengua y piso de la boca) también son aquellas en las que se forman más frecuentemente tumores orales, mientras que estos tumores aparecen raramente en las regiones de la mucosa oral con menores tasas de proliferación (superficie dorsal de la lengua y paladar (Thomson et al., 1999).

2.3. Liquen Plano Oral

El Liquen Plano Oral (LPO) es una patología inflamatoria, autoinmune, que afecta el tejido epitelial de la mucosa oral. Se trata de una patología crónica con una gran relevancia clínica. Se estima que el liquen plano oral afecta hasta un 4% de la población mundial (Peng et al., 2017).

De etiología aún no bien definida, hay evidencias de que en el LPO se podría producir un ataque autoinmunológico por parte de linfocitos T citotóxicos a las células epiteliales de la mucosa oral (Fenoll et al., 2004).

Clínicamente se caracteriza por la presencia de lesiones a nivel de la mucosa oral como manchas blancas reticuladas y elevadas, manchas rojas con edemas, así como llagas abiertas, que pueden causar ardor o dolor. Estas lesiones pueden aparecer en la mucosa que comprende el interior de las mejillas, siendo ésta la ubicación más frecuente, así como en el tejido interno de los labios, las encías, el paladar y la lengua (Fenoll et al., 2004).

Desde el punto de vista histológico, el LPO se caracteriza por un denso infiltrado de linfocitos T a nivel del epitelio oral, un aumento de las capas superficiales de queratinocitos terminalmente diferenciados y degeneración de los queratinocitos de la capa basal del epitelio oral (Cheng et al., 2016).

Existen evidencias de su asociación con el desarrollo de cáncer, específicamente de carcinoma oral de células escamosas (OSCC - Oral squamous cell carcinoma). Se ha demostrado a través de varios estudios que pacientes diagnosticados de LPO han desarrollado OSCC. Incluso, pacientes

con carcinoma oral desarrollado a partir de OLP presentan un mayor riesgo frente a los que no presentan un diagnóstico proveniente de LPO, debido a que se ha visto un mayor aumento de la metástasis. Por estos motivos es que la OMS ha clasificado a esta patología como una condición precursora del carcinoma oral y se la ha reconocido como una patología oral potencialmente maligna (OPMD - Oral potentially malignant disorder) (Peng et al., 2017).

De acuerdo a investigaciones realizadas sobre el mecanismo de transformación, se ha visto que la inflamación crónica en LPO estaría involucrada en la tumorigénesis y en el desarrollo de los tumores. A su vez, otra característica del microambiente tumoral de la que hay evidencia de su existencia en LPO, es un microambiente hipóxico (Peng et al., 2017). Sin embargo, la presencia de marcadores de hipoxia en esta patología aún no ha sido estudiada en profundidad.

2.4. Cáncer oral

Los tumores orales malignos abarcan lesiones neoplásicas que afectan cualquier región de la cavidad oral, las glándulas salivales y las regiones faríngeas, presentando una prevalencia entre 2 y 4% de todos los tipos de cáncer a nivel mundial (Markopoulos, 2012). Sin embargo, la neoplasia epitelial más común que afecta la cavidad oral es el carcinoma oral de células escamosas (OSCC), constituyendo más de un 90% de todos los neoplasmas orales (Markopoulos, 2012), y representando un 95% de todos los tipos de cáncer de cabeza y cuello, siendo éstos uno de los 10 tipos de cáncer más comunes en todo el mundo (Rivera & Venegas, 2014).

El carcinoma oral de células escamosas particularmente, deriva del tejido epitelial escamoso estratificado de la mucosa oral. Puede producirse en varios sitios de la cavidad oral pero los más frecuentes son los labios, la lengua y el piso de boca (Rivera & Venegas, 2014).

A nivel histológico, este tumor comienza con un estadio pre-invasivo en el que las células tumorales aún están confinadas al epitelio, sin llegar a atravesar la lámina basal que lo separa del tejido conjuntivo subyacente, progresando frecuentemente desde una displasia hasta la formación del carcinoma. En una etapa posterior, las células tumorales atraviesan la lámina basal y se infiltran en el tejido conjuntivo subyacente, dando lugar a un carcinoma de células escamosas invasivo. En esta etapa es que se puede subdividir al carcinoma oral en dos grandes regiones, una región central y el frente de invasión, que refiere a la zona del carcinoma con mayor profundidad de invasión, donde el tumor establece interacciones con los tejidos subyacentes (Rivera & Venegas, 2014), por lo que el patrón morfológico del frente de invasión en el carcinoma oral es un buen predictor del grado de agresividad del tumor.

Suele ser un cáncer agresivo, con altas tasas de recurrencia y de metástasis, que generalmente es detectado en estadios avanzados (fases III o IV), disminuyendo las probabilidades de recuperación (Rivera & Venegas, 2014).

La génesis tumoral en cáncer oral, así como en otros tipos de cáncer, está sumamente vinculada a la aparición de hipoxia y otros tipos de estrés a nivel tisular (Eltzschig & Carmeliet, 2011). Como se ha mencionado anteriormente, en cáncer oral particularmente se ha observado un aumento de los marcadores de hipoxia a medida que se incrementa el grado de displasia de la mucosa oral, hasta la formación del carcinoma oral (Kujan et al., 2017).

Una combinación de hipoxia, acidificación y otras fuentes de estrés vinculadas, como la falta de nutrientes y el estrés oxidativo, cooperan para imponer presiones selectivas muy fuertes en las etapas tempranas del crecimiento tumoral, lo que genera la aparición de subpoblaciones tumorales más capaces de adaptarse, sobrevivir y eventualmente invadir otros tejidos (metástasis), por lo cual dichas subpoblaciones pueden constituir la base del comportamiento agresivo de un tumor (Gillies et al., 2002; Gillies & Gatenby, 2007; Ibrahim-Hashim et al., 2017).

2.5. Línea celular HaCaT

La línea celular HaCaT consiste en queratinocitos humanos inmortalizados no transformados derivados del tejido epitelial de la epidermis. Es ampliamente utilizada en investigaciones sobre tejido epitelial por su alto potencial para diferenciarse y proliferar en cultivos celulares, *in vitro* (Seo et al., 2012).

La epidermis es un tejido muy similar al epitelio de la mucosa oral, por lo que la línea celular HaCaT ha sido utilizada frecuentemente como modelo de queratinocitos orales en estudios *in vitro* de biología celular oral (Ge et al., 2012).

2.6. Variante del modelo “Hipoxia inducida por cubreobjetos”

El modelo “Hipoxia inducida por cubreobjetos” (Coverslip Hypoxia) es utilizado para inducir un microambiente hipóxico a los cultivos celulares. Consiste en cubrir con un cubreobjetos las placas de Petri utilizadas para el cultivo de las células. De esta forma se induce a todas las células de la placa a un estado de hipoxia, debido a que la única entrada de oxígeno se podría dar por el estrecho espacio entre las células y el cubreobjetos (Pitts & Toombs, 2004).

Existe una variante de dicho método, que ha sido diseñada por mi tutor Dr. Miguel Arocena y colaboradores, para la visualización de las alteraciones de las células a medida que se va incrementando la distancia de éstas a la entrada de oxígeno (Arocena et al., 2019). Dicha variante consiste en cubrir una pequeña placa de Petri con un cubreobjetos de acrílico con un pocillo en el centro, al igual que el método original, pero con un cubreobjetos perforado en el centro (figura 2), de forma que la difusión de oxígeno a todas las células presentes en el pocillo de la placa solo ocurre a través de dicha perforación, en el centro de la misma. De esta manera, se puede observar las diferencias entre las células que se encuentran en el centro de la placa, que es la zona donde se encuentra la única entrada de oxígeno, con respecto a las que se encuentran alejadas de la entrada de oxígeno, hacia las zonas periféricas de

la placa (Arocena et al., 2019). Una de las características que se pudo observar a partir de este método es la acumulación de gotitas lipídicas en células transformadas de cáncer de próstata (LNCap) que se encuentran alejadas de la entrada de oxígeno (Arocena et al., 2019).

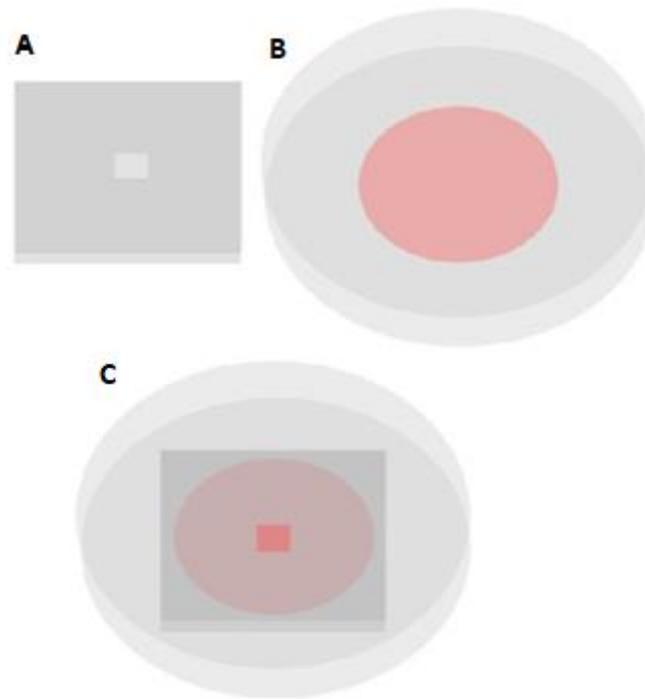


Figura 2. Esquema de la variante del método “Hipoxia inducida por cubreobjetos” tomado de Arocena et al., 2019. **A)** Cubreobjetos con perforación en el centro. **B)** Placa de Petri con pocillo en el centro, representado en color rojo. **C)** Placa de Petri con pocillo en el centro cubierto por el cubreobjetos perforado en el centro.

2.7. Marcadores de Hipoxia

2.7.1. Hypoxyprobe™

Hypoxyprobe™ es una sonda de detección de hipoxia que consiste en el compuesto Clorhidrato de pimonidazol, quien en condiciones de hipoxia forma

aductos proteicos estables, mediante grupos tioles, formando epítopes que son detectados por anticuerpos monoclonales específicos (Aguilera & Brekken, 2014).

La intensidad de la señal de pimonidazol que se detecta está directamente relacionada con el nivel de hipoxia de forma proporcional. Cuanto más intensa es la señal de pimonidazol detectado, mayores son los niveles de hipoxia. (Aguilera & Brekken, 2014).

Se ha demostrado que la detección de pimonidazol es una muy buena indicación de la hipoxia a nivel celular y tisular, por lo que Hypoxyprobe™ es un marcador de hipoxia muy específico y confiable. De hecho, detecta niveles de hipoxia extremadamente altos, formando los mencionados aductos proteicos en condiciones de niveles de oxígeno muy bajos ($pO_2 < 10$ mmHg) (Arocena et al., 2019; Cousins et al., 2016). Es decir, a niveles de oxígeno intercelular mayor de 10 mmHg no se ve favorecida la formación de los aductos de pimonidazol y proteínas, y por lo tanto este método no permite detectar niveles moderados del descenso de oxígeno, si no que funciona para detectar niveles de hipoxia altos.

2.7.2. GLUT-1

El transportador de Glucosa 1, GLUT-1, es el primer transportador de Glucosa en ser caracterizado. Se trata de una proteína integral de membrana, uniportadora, que se ubica en la membrana plasmática de los eritrocitos y de células endoteliales. Es codificada en los seres humanos por el gen SLC2A1. Tiene la función de facilitar la difusión de Glucosa a través de la membrana plasmática de las células que lo expresan (Rademakers et al., 2011).

El nivel de expresión de GLUT1 en las membranas de las células depende de los niveles de Glucosa en la sangre. Cuando hay una alta concentración de Glucosa en sangre, la expresión de GLUT1 en las membranas celulares se ve

disminuida, y por el contrario, cuando la concentración de Glucosa en sangre es baja, aumenta la expresión de GLUT1 en las membranas.

En condiciones de hipoxia, se ha visto que hay bajas concentraciones de glucosa en sangre debido a que es consumida por las células para su oxidación por la vía glucolítica, con un aumento en la velocidad de la misma. Por lo tanto, hay una mayor expresión de GLUT 1 en las membranas celulares para que pueda ingresar más glucosa y así se pueda llevar a cabo la glucólisis. El factor de transcripción HIF-1, que se activa en condiciones de hipoxia, es el que induce la transcripción de los genes que codifican para la mayor parte de las enzimas que actúan en la vía glucolítica, incluyendo GLUT 1 (Robin et al., 1984).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Determinar si es posible establecer un correlato entre las alteraciones que sufren queratinocitos normales en un microambiente hipóxico *in vitro* y aquellas que aparecen en los queratinocitos en el epitelio de la mucosa oral en el contexto de la patología Liquen Plano Oral.

3.2. Objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de un microambiente hipóxico *in vitro* sobre queratinocitos normales, evaluando si se detectan marcadores asociados a hipoxia y cambios morfológicos en las células.
- Evaluar si existe o no expresión de uno de los marcadores de hipoxia altamente utilizado, GLUT 1, a nivel del epitelio oral en la patología de liquen plano oral.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Línea celular y cultivo celular

La técnica de cultivo celular se llevó a cabo utilizando la línea celular HaCaT, que corresponde a queratinocitos humanos inmortalizados, no transformados.

Éstos, fueron mantenidos en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con 10% de SFB y antibióticos (Penicilina, Estreptomina y Anfoteicina), e incubados a 37°C y 5% de CO₂.

Se realizaron pasajes de las células por tripsinización cada vez que las mismas alcanzaron la confluencia. Para despegar las células adheridas mediante tripsinización, se retiró el medio de cultivo, se añadió Tripsina-EDTA al 0.05% en PBS, y luego fueron incubadas durante 5 minutos a 37°C. Pasados los 5 minutos de incubación, se adicionó el medio de cultivo, para inactivar a la Tripsina, y se transfirió la dilución adecuada a una nueva botella de cultivo.

4.2. Método de inducción de un microambiente hipóxico *in vitro*

El método utilizado para inducir a los queratinocitos a un microambiente hipóxico es una variante del modelo "Coverslip Hypoxia" o "Hipoxia inducida por cubreobjetos", que consiste en cubrir las placas de cultivo celular con cubreobjetos de acrílico perforados en el centro.

A las 24 horas de haber realizado el pasaje de las células a las placas, se agregó el cubreobjetos de acrílico perforado en el centro. Una placa se utilizó como control, por lo que no se le agregó un cubreobjetos para no inducirles a las células un microambiente hipóxico.

Estas placas conteniendo los cultivos celulares, con el cubreobjetos y sin cubreobjetos, fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂, por un tiempo de 48 horas.

4.3. Observación del comportamiento de las células por microscopía de contraste de fases

Pasadas las 48 horas de incubación de las placas con y sin cubreobjetos, se observó a las células progresivamente por microscopía de contraste de fases.

Para ello se utilizó un microscopio invertido Nikon Diaphot, y objetivos de contraste de fase de 10X y 20X, perteneciente al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

4.4. Observación de cambios morfológicos de las células por microscopía confocal

Para la visualización de cambios morfológicos a nivel del citoesqueleto de las células, se realizó un marcado con la sonda fluorescente de detección de filamentos de actina, faloidina conjugada a Alexa Fluor 488.

Se fijó las células HaCaT con cubreobjetos con PAF 4% y se las incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, y pasados los 10 minutos se las lavó con PBS 1X.

Luego del último lavado, se realizó la tinción de las células con faloidina a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Waltham, MA) y se las dejó incubando por 30 minutos.

Se realizó tres lavados con 500 μ L de PBS 1X, de 5 minutos cada uno. Luego de descartar el PBS del último lavado, se agregó DAPI (Invitrogen) 1/1000 para teñir los núcleos, y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se retira el DAPI y se realizan dos lavados con PBS 1X.

Finalmente las células fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia por el microscopio confocal Zeiss LSM 800 del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

4.5. Inmunocitoquímica con Hypoxyprobe *in vitro*

Para evaluar la presencia de hipoxia *in vitro*, se empleó la técnica de inmunocitoquímica utilizando un kit de detección de hipoxia, Hypoxyprobe (Hypoxyprobe, Burlington, MA).

Para esto se incubó a las células HaCaT con cubreobjetos, con 1,2 μL de Pimonidazol 50 mM, con una concentración final de pimonidazol en la placa de 200 μM , durante 2 horas. Luego se fijó las células con PAF 4% y se las incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, y pasados los 10 minutos se las lavó con PBS 1X.

Se permeabilizó las placas con 200 μL de Tritón al 0,1% durante 5 minutos. Luego, se agregó 200 μL de BSA como bloqueante y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó 2 μL de un anticuerpo, que reconoce los aductos proteicos de pimonidazol, conjugado a un fluoróforo (Hypoxyprobe Red Mab Dylight 549 Mab), y se dejó incubando la placa toda la noche a 4°C. Como el anticuerpo presenta un fluoróforo ya incorporado, no es necesario agregar un anticuerpo secundario.

Pasada la incubación con el anticuerpo, luego de descartar el anticuerpo, se realizó tres lavados con 500 μL de PBS 1X, de 5 minutos cada uno. Luego de descartar el PBS del último lavado, se agregó DAPI (Invitrogen) 1/1000 para teñir los núcleos, y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se retira el DAPI y se realizan dos lavados con PBS 1X.

Finalmente las células fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia por el microscopio confocal Zeiss LSM 800.

4.6. Inmunocitoquímica con GLUT1 *in vitro*

Aplicando nuevamente la técnica de inmunocitoquímica, se evaluó la presencia del marcador de hipoxia GLUT1 *in vitro*.

Se fijó las células HaCaT con cubreobjetos con PAF 4% y se las incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, y pasados los 10 minutos se las lavó con PBS 1X.

Se permeabilizó las placas con 200 μ L de Tritón al 0,1% durante 5 minutos. Luego, se agregó 200 μ L de BSA como bloqueante y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó el anticuerpo primario anti-Glut1 (anticuerpo monoclonal de ratón, Santa Cruz) y se dejó incubando la placa toda la noche a 4°C.

Se descartó el anticuerpo primario, se realizó tres lavados con PBS, y luego del último lavado se agregó 200 μ L del anticuerpo secundario (anticuerpo anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 488, de Invitrogen) diluido en BSA (dilución 1:1000 – 0,5 μ L de anticuerpo secundario en 450 μ L de BSA) y se las dejó incubando durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad.

Luego de descartar el anticuerpo, se realizó tres lavados con 500 μ L de PBS 1X, de 5 minutos cada uno. Luego de descartar el PBS del último lavado, se agregó DAPI (Invitrogen) 1/1000 para teñir los núcleos, y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se retira el DAPI y se realizan dos lavados con PBS 1X.

Finalmente las células fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia por el microscopio confocal Zeiss LSM 800.

4.7. Marcado con la sonda fluorescente Nile Red *in vitro*

Para la detección de lípidos se realizó un marcado con la sonda fluorescente Nile Red.

Se fijó las células HaCaT con cubreobjetos con PAF 4% y se las incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, y pasados los 10 minutos se las lavó con PBS 1X.

Luego del último lavado, se realizó la tinción de las células con Nile Red (Invitrogen, Waltham, MA) a una concentración de 0,1 µg/ml y se las dejó incubando por 15 min.

Se realizó tres lavados con 500 µL de PBS 1X, de 5 minutos cada uno. Luego de descartar el PBS del último lavado, se agregó DAPI (Invitrogen) 1/1000 para teñir los núcleos, y se incubó durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente se retira el DAPI y se realizan dos lavados con PBS 1X.

Finalmente las células fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia por el microscopio confocal Zeiss LSM 800.

Esta sonda de detección de lípidos, Nile Red, tiene distintos picos de emisión/excitación, según si se une a lípidos neutros o a fosfolípidos, emitiendo en verde para lípidos neutros y en naranja/rojo para fosfolípidos. La fluorescencia de Nile red se detectó con excitación/emisión de 510/582 nm para detectar lípidos neutros, y de 540/624 nm para detectar fosfolípidos (Arocena et al., 2019; Greenspan & Fowler, 1985).

4.8. Inmunohistoquímica con GLUT1 *in vivo*

Se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión del marcador de hipoxia GLUT1 en epitelio oral, utilizando cortes histológicos provenientes de biopsias de pacientes con Liquen Plano Oral y de Hiperplasia fibrosa, a modo de control positivo, dispuestas por la Cátedra de Patología Molecular de la Facultad de Odontología.

Se utilizó 6 láminas en total, de las cuales tres corresponden a biopsias de liquen plano oral, y las tres restantes a biopsias de Hiperplasia Fibrosa.

Se comenzó por desparafinar los preparados en horno a 60°C durante 60 minutos, y luego en Xilol durante 5 minutos. Seguidamente se realizó la hidratación de los preparados en el tren de hidratación, realizando 15 baños para cada uno desde Xilol al 100% hasta agua destilada.

Luego se realizó el desenmascaramiento de los preparados en una olla a presión. Se los dejó enfriar durante 8 minutos después de la salida de presión, y luego se los dejó reposando durante 10 minutos más en agua corriente.

Pasado ese tiempo se realizó tres lavados con agua destilada, se dejó los preparados en peróxido de hidrógeno al 0.9% durante 5 minutos, y pasado este tiempo se realizó tres lavados más con agua destilada.

Se montó las láminas en los racks y coverplates correspondientes, se realizó un lavado con PBS 1X durante 5 minutos y pasado ese tiempo se agregó 2 gotas a cada lámina de bloqueador de peroxidasa (Mouse/Rabbit Immuno detector Peroxidase Blocker, Kit de BioSb) y se lo dejó actuar durante 5 minutos.

Luego de un lavado con agua destilada por 5 minutos y otro lavado con PBS 1X durante 5 minutos, se agregó a cada lámina 100 μ L del Ac primario Glut-1, el mismo que fue utilizado para la inmunofluorescencia *in vitro*, (dilución 1:100 con diluyente Da Vinci Green Diluent – 80 μ L de Ac en 800 μ L de diluyente) y se dejó incubando durante 1 hora.

Pasada la hora de incubación, se realizó un lavado con PBS durante 5 minutos, y luego se añadió 2 gotas a cada lámina del Ac secundario anti-ratón con Biotina, y se lo dejó incubando por media hora a temperatura ambiente.

Pasada la media hora se realizó otro lavado con PBS 1X durante 5 minutos y luego se agregó 2 gotas a cada lámina del detector inmunológico Mouse/Rabbit ImmunoDetector HRP Brown y se dejó las láminas incubando durante media hora.

Se realizó un nuevo lavado con PBS 1X durante 5 minutos, se sacó las láminas de los coverplates y se agregó aproximadamente 5 mL del revelador DAB (diaminobencidina) y se las dejó incubando durante 5 minutos.

Luego se enjuagaron las láminas con agua destilada. Se colocaron en un recipiente con agua destilada y se les agrega agua corriente durante 5 minutos. Pasados los 5 minutos se coloca las láminas en Hematoxilina por 1,5 minutos.

Luego se enjuagan nuevamente en agua destilada y agua corriente por aproximadamente 3 minutos, y se realiza la deshidratación (15 baños desde agua destilada hasta alcohol Xilol al 100 %).

Se deja secar las láminas y luego se montan con una gota de Entellan en cada lámina y un cubreobjetos.

Finalmente se observaron las láminas al microscopio Nikon Eclipse Ci de la cátedra de Patología molecular de la Facultad de Odontología de la UdelaR, equipado con una cámara digital Nikon Ds-Fi2.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Observación de cambios morfológicos de las células HaCaT sometidas a hipoxia inducida por cubreobjetos

Para visualizar la respuesta al cambio del microambiente de las células una vez aplicada la variante del método hipoxia inducida por cubreobjetos, se las observó inicialmente mediante microscopía de contraste de fases. Se observó también a las células control, que no contenían cubreobjetos, comparando su morfología con respecto a las que se encuentran en estado de hipoxia inducida por cubreobjetos. A su vez, se comparó el comportamiento de las células a las que se indujo a un microambiente hipóxico, observando si había diferencias entre ellas teniendo en cuenta su ubicación en la placa.

Al observar las células por microscopía de contraste de fases para detectar posibles cambios en respuesta al microambiente hipóxico al que se las indujo, se visualizó diferencias en cuanto a la morfología con respecto a sus ubicaciones en la placa (figura 3). Las células que se encuentran en las regiones periféricas (figuras 3C y 3D) presentan una forma más alargada y estirada, con respecto a las observadas en el centro de la placa donde se encuentra la entrada de oxígeno (figura 3B) y sobretodo con respecto a las células control a la que no se les indujo un microambiente hipóxico por cubreobjetos (figura 3A), las cuales presentan una apariencia normal de células de tejido epitelial.

Estos resultados se condicen con los esperados dado que las células que se encuentran en la región central están ubicadas en la zona de entrada de oxígeno, donde se encuentra la perforación del cubreobjetos, y por lo tanto no deberían encontrarse en condiciones muy altas de hipoxia. A medida que la distancia entre las células y el centro de la placa va aumentando, hacia las zonas periféricas, va disminuyendo progresivamente el nivel del oxígeno, por lo que las células que se encuentran más alejadas de la zona central, en la periferia, son las que reciben menos oxígeno, y por lo tanto las que deberían

encontrarse en un ambiente más hipóxico, tal como hemos observado (ver figura 5), por lo que cabe suponer que dicho ambiente alterado se correlaciona con los cambios morfológicos observados.

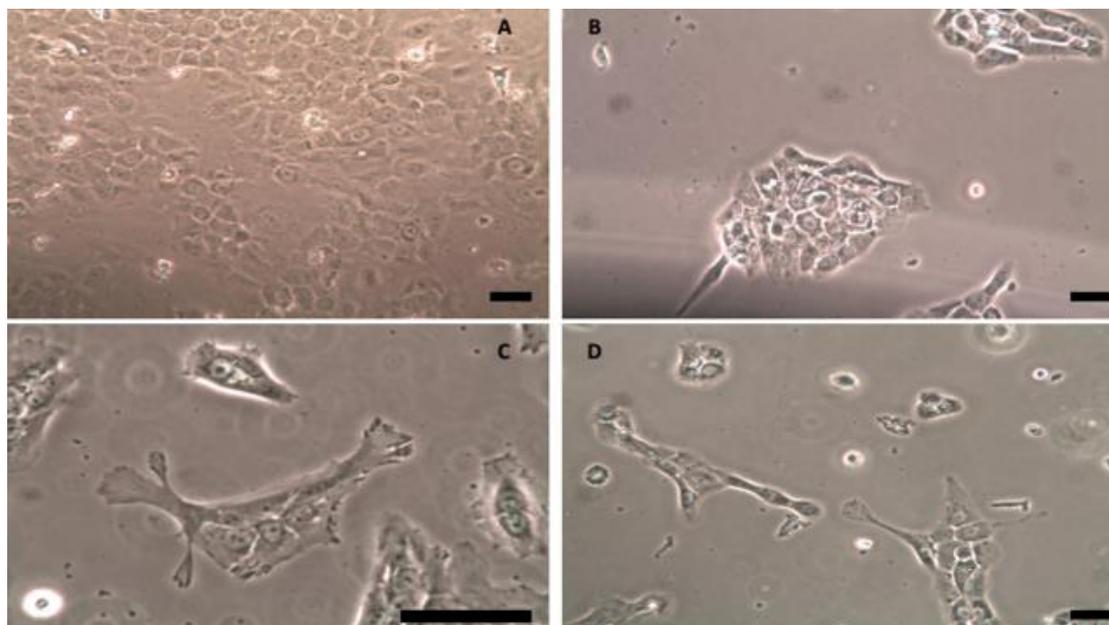


Figura 3. Observación por microscopio de contraste de fases de células HaCaT. Barra de calibración de 50 micrómetros. **A)** Cultivo de células control, cultivadas en un microambiente normal, sin inducción de un microambiente hipóxico. Aumento 10X. **B)** Células sometidas a un microambiente hipóxico por la variante del método hipoxia inducida por cubreobjetos, ubicadas en el centro de la placa. Aumento 10X. **C) y D)** Células sometidas a un microambiente hipóxico por la variante del método hipoxia inducida por cubreobjetos, ubicadas en una región periférica de la placa. Aumento 20X y 10X, respectivamente.

En base a los cambios morfológicos observados por contraste de fases, se buscó visualizar la señal de un marcador de actina, para observar los filamentos de actina del citoesqueleto de las células. Se realizó un marcaje con el marcador faloidina conjugado a un fluoróforo y, a través de microscopía de fluorescencia, con un microscopio confocal, se observaron las células marcadas. La faloidina se une a la actina filamentosa, por lo que unida a un fluoróforo, por microscopía de fluorescencia, se pudo observar los cambios morfológicos de las células estudiadas, a través de los filamentos de actina de

sus citoesqueletos. Como resultado de dicho marcaje, se vio que sobre las zonas periféricas de la placa las células presentan una señal más intensa de los filamentos de actina con respecto a las células que se encuentran cerca de la entrada de oxígeno, en el centro de la placa (figura 4A). A su vez, se observa que dichos filamentos de actina se encuentran en fibras de stress prominentes en las células de las regiones periféricas, con respecto a las observadas en el centro de la placa (figura 4B), lo cual se condice con el cambio morfológico observado por microscopía de contraste de fases.

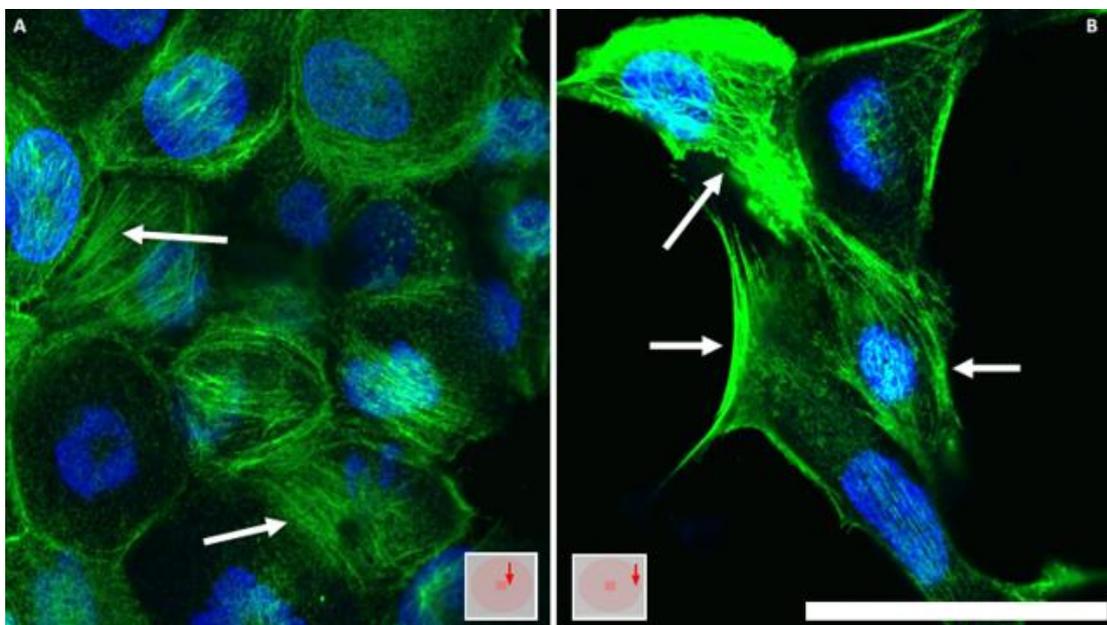


Figura 4. Observación por microscopio confocal de queratinocitos humanos cultivados con la variante del método coverslip hypoxia, a los que se les realizó un marcaje con un marcador de actina (verde), y una tinción con DAPI (azul). Barra de calibración de 50 micrómetros. Con flechas se indica algunos filamentos de Actina a modo de ejemplo en cada caso. **A)** Células HaCaT en el centro de la placa, cerca de la entrada de oxígeno. **B)** Células HaCaT en una región periférica de la placa, alejadas de la entrada de oxígeno.

Otro cambio observado en respuesta al microambiente hipóxico al cual se indujo a las células es un aumento en la queratinización o cornificación de las células que se encuentran más alejadas de la entrada de oxígeno, observándose células con envolturas córneas (figura 5). La formación de estas

envolturas cornificadas, de acuerdo a estudios anteriores, es un evento típico y muy importante de la diferenciación terminal de los queratinocitos (Michel et al., 1988).

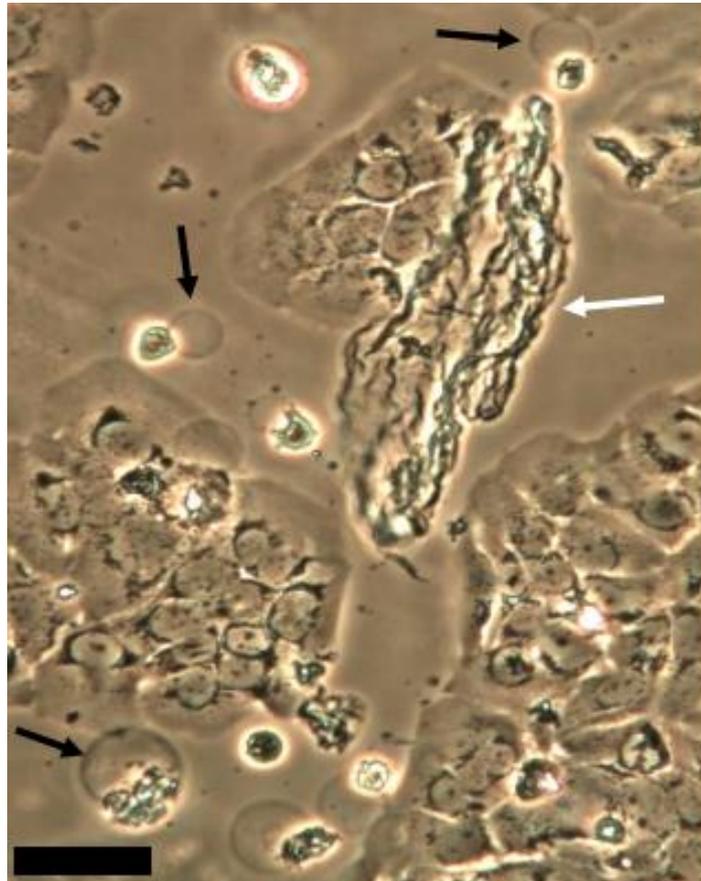


Figura 5. Observación por microscopio de contraste de fases de células HaCaT. Aumento 10x, barra de calibración de 50 micrómetros. Células inducidas a un microambiente hipóxico ubicadas en una región periférica de la placa, donde se puede observar una célula totalmente queratinizada (indicada con flecha blanca), así como burbujas de diferenciación terminal (señaladas con flechas negras).

Se observó a lo largo de todo el estudio que, al poner el cubreobjetos a las placas, 48 horas después, cuando se comenzaba a observar las células por microscopía de contraste de fases, se empezaban a ver elementos de cornificación, y estos aumentaban a lo largo de los días.

Esta característica observada en las células que se encuentran en un microambiente más hipóxico, se pudo constatar también con el marcador fluorescente de lípidos, Nile Red (ver más adelante, figura 8).

Se ha observado que, como parte del proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos, al formarse la capa córnea, se forman “burbujas” alrededor de las células queratinizadas (figura 5, señaladas con flechas). Estas “burbujas” son vesículas que se excretan de las células terminalmente diferenciadas donde contienen sus componentes citoplasmáticos que son secretados en el espacio extracelular, posiblemente para ser reutilizados por otras células (Michel et al., 1988; Nguyen et al., 2001). La observación de estas vesículas y las envolturas córneas en células expuestas a un ambiente hipóxico sugiere que la hipoxia es un factor que estimula la diferenciación terminal de los queratinocitos, como ya se ha observado previamente (Wong et al., 2015).

5.2. Detección de hipoxia mediante el marcador pimonidazol *in vitro* en células HaCaT sometidas a hipoxia inducida por cubreobjetos

Para la detección de hipoxia en los cultivos de células HaCaT a las que se les indujo un microambiente hipóxico aplicando la variante del método coverslip hypoxia, se realizó una inmunocitoquímica con la sonda de detección de hipoxia, Hypoxyprobe.

Esta sonda consiste en pimonidazol, que forma aductos proteicos, mayoritariamente con proteínas que presentan grupos tioles, cuando los niveles de oxígeno son muy bajos ($pO_2 < 10\text{mmHg}$), y un anticuerpo que reconoce los aductos formados entre pimonidazol y proteínas, conjugado a un fluoróforo, por lo que, a través de inmunofluorescencia puede ser detectada la presencia de dichos aductos. Por lo tanto, si a medida que las células se alejan del centro de la placa se encuentran en niveles de oxígeno cada vez más bajos, entonces se espera encontrar una mayor señal de pimonidazol hacia las zonas periféricas, y una menor expresión de la misma en el centro, donde se ubica la única entrada de oxígeno a la placa.

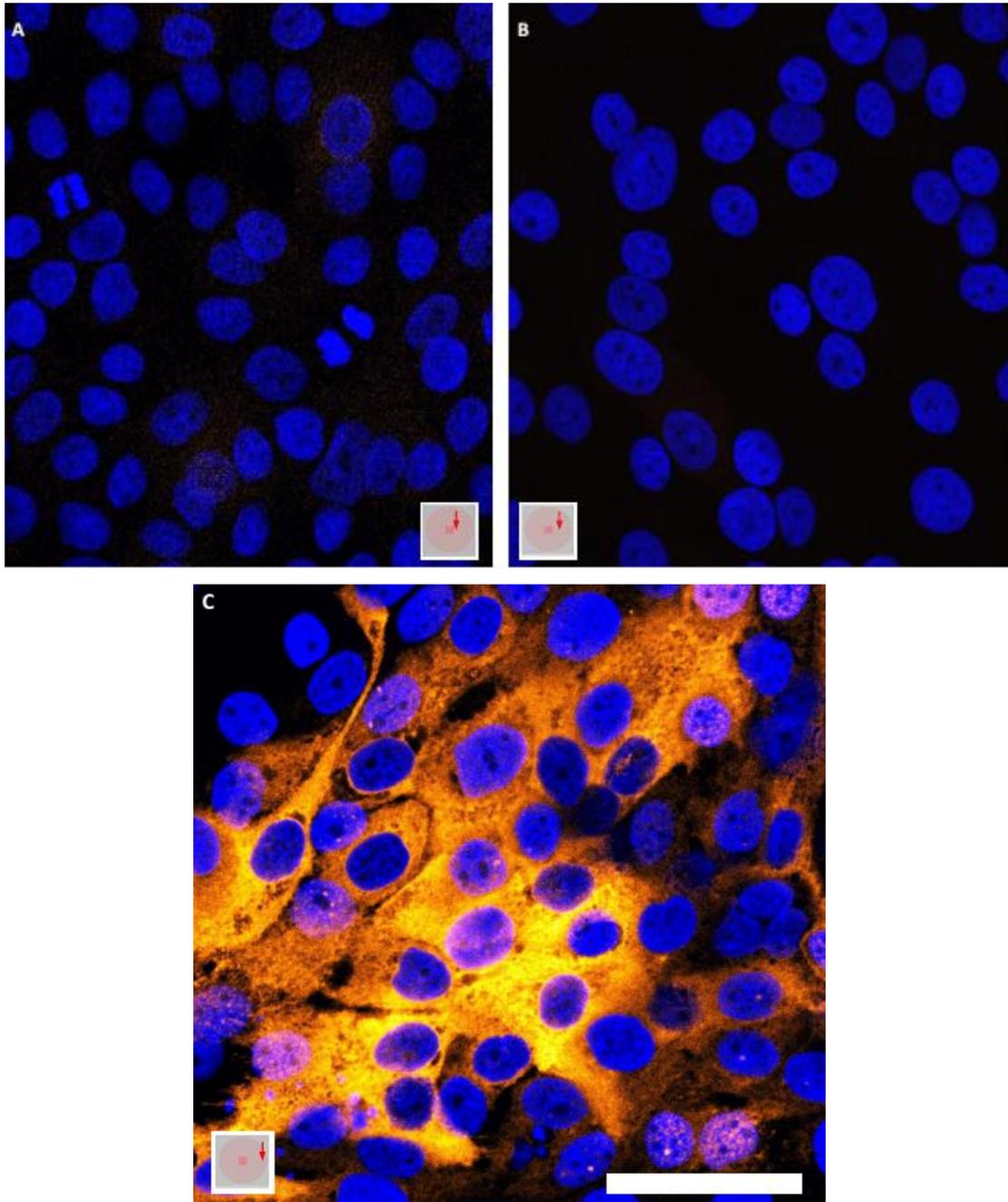


Figura 6. Observación por microscopio confocal de queratinocitos humanos cultivadas con la variante del método coverslip hypoxia, con la sonda de detección de hipoxia Hypoxyprobe (naranja) y teñidas con DAPI (azul). Barra de calibración de 50 micrómetros. **A)** Células HaCaT en el centro de la placa, donde solo se observa los núcleos marcados con DAPI. **B)** Células HaCaT en una región intermedia de la placa, donde solo se observa los núcleos marcados con DAPI. **C)** Células HaCaT en una zona periférica de la placa, donde se observa los núcleos marcados con DAPI y una notoria señal de pimonidazol.

Como resultado de la inmunofluorescencia con Hypoxyprobe, a las 48 horas de cultivadas las células, se obtuvo una señal muy intensa de pimonidazol en las zonas periféricas de la placa (figura 6C). Por otro lado, en el centro de la misma, así como en una región intermedia entre el centro y la periferia, no se observó señal de expresión de pimonidazol (figuras 6A y 6B).

Estos resultados se condicen con lo que se espera que ocurra en referencia al nivel de oxígeno presente en el microambiente de las células sometidas a hipoxia. Por lo que se puede observar en la micrografía de la figura 6C, en las regiones periféricas de la placa se detecta una señal muy intensa de pimonidazol, por lo que se puede afirmar que se detectó niveles muy elevados de hipoxia en los queratinocitos sometidos a hipoxia inducida por cubreobjetos, en las regiones alejadas de la fuente de oxígeno.

Cabe destacar que el método de detección de hipoxia, Hypoxyprobe, detecta niveles de hipoxia extremadamente altos. Es decir, el pimonidazol forma aductos proteicos a niveles de oxígeno muy por debajo de lo normal ($pO_2 < 10\text{mmHg}$) (Arocena et al., 2019; Cousins et al., 2016). Esto quiere decir que en las zonas intermedias de la placa, cuando comienza a aumentar la distancia de la zona central, región donde se encuentra la entrada de oxígeno, ya podría existir un microambiente con niveles de oxígeno disminuido, pero no lo suficientemente bajo como para que se formen los aductos y por lo tanto sea detectado por el anticuerpo conjugado de Hypoxyprobe. Cuando no se ve señal de pimonidazol es que probablemente los niveles de oxígeno estén por encima de 10mmHg .

A su vez, esta técnica fue realizada anteriormente a las 24 horas de cultivadas las células, para la detección de pimonidazol, tomando como referencia el estudio del microambiente hipóxico en células Lncap llevado a cabo por el Dr. Miguel Arocena y colaboradores (Arocena et al., 2019), sin obtener aún señal de pimonidazol en ninguna de las zonas de la placa (resultados no mostrados).

5.3. Detección de GLUT1 *in vitro* en células HaCaT sometidas a hipoxia inducida por cubreobjetos

Siguiendo con la búsqueda de la detección de hipoxia en las zonas alejadas de la entrada de oxígeno a la placa, se realizó otra inmunocitoquímica con el marcador de hipoxia GLUT 1.

Como resultado de esta inmunofluorescencia, al observar las células a través del microscopio confocal, se obtuvo una marcada señal de GLUT 1 en las regiones periféricas de la placa (figura 7B), no así en el centro de la misma (figura 7A).

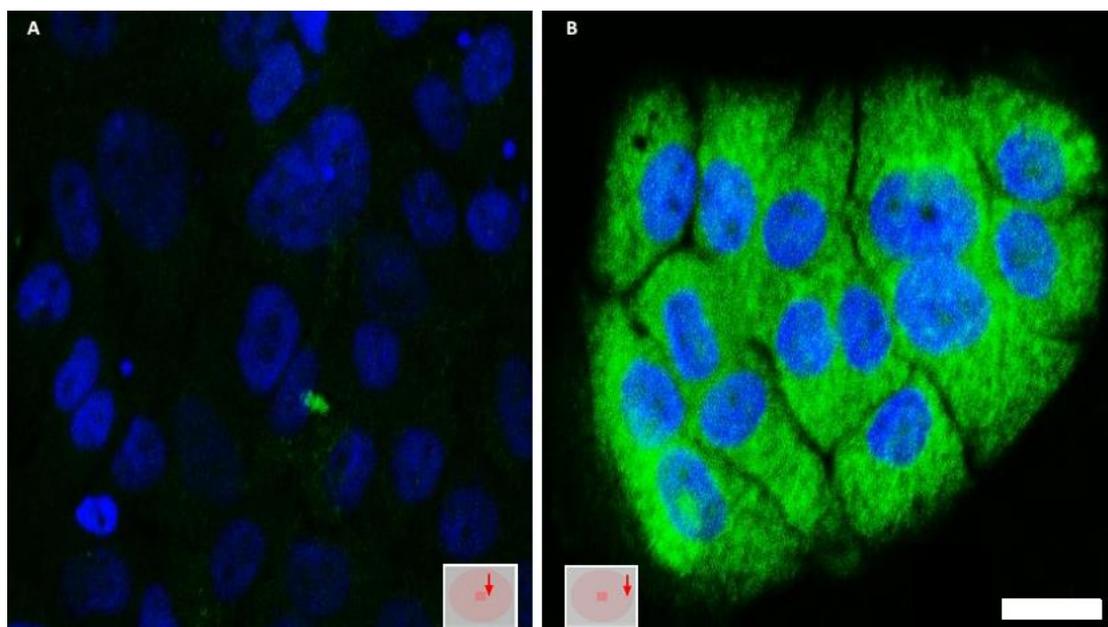


Figura 7. Observación por microscopio confocal de células HaCaT cultivadas con la variante del método coverslip hypoxia, a los que se les realizó una inmunofluorescencia con GLUT 1 (verde), y una tinción con DAPI (azul). **A)** Células HaCaT en el centro de la placa, próximas a la única entrada de oxígeno, donde solo se observa los núcleos en azul marcados con DAPI. **B)** Células HaCaT en una zona periférica de la placa, alejadas de la entrada de oxígeno, donde se observa los núcleos marcados con DAPI, en azul, y una marcada expresión de GLUT 1.

Dado que este transportador de Glucosa, GLUT 1, se expresa en mayor cantidad en las membranas celulares cuanto mayor es el consumo de glucosa

por parte de las células, y que las células en estado de hipoxia consumen más glucosa que en condiciones normales, se esperaba obtener los resultados mencionados, con una alta expresión de GLUT 1 en las zonas periféricas, región donde anteriormente se obtuvo una intensa señal de pimonidazol, y una muy baja, o nula, expresión del mismo en la zona central.

Estos resultados muestran la expresión de un marcador establecido de hipoxia en una región de la placa donde hemos comprobado que existe hipoxia y por lo tanto sugieren que la expresión de GLUT 1 en este caso está siendo inducida por hipoxia, tratándose entonces de una respuesta de las células al microambiente alterado al que fueron sometidas.

5.4. Detección de lípidos con el marcador Nile Red *in vitro* en células HaCaT sometidas a hipoxia inducida por cubreobjetos

Dada la observación de queratinización (o cornificación) de los queratinocitos por microscopía de contraste de fases, más aumentada en las zonas periféricas de la placa con cubreobjetos, se realizó un marcaje por fluorescencia con la sonda de detección de lípidos Nile Red, observándose luego al microscopio confocal. Se detectó con una excitación/emisión de 510/582 nm para detectar lípidos neutros, visualizándose en color verde, y de 540/624 nm para detectar fosfolípidos, en color rojo.

Se observó en las regiones periféricas de la placa indicios marcados de queratinización de las células (figura 8), observándose en la figura 8A lo que parece un comienzo de cornificación con un acúmulo de lípidos, y en la figura 8B una cornificación más avanzada, existiendo una correlación con lo observado por microscopía de contraste de fases. Comparando con células HaCaT en el centro de la placa marcadas con Nile Red (figura 9A), las células que se encuentran en la periferia (figuras 8A, 8B y 9B) presentan una señal más intensa de lípidos de membrana.

También se observó un aumento en la acumulación de gotitas de lípidos neutros en las zonas periféricas, (figura 9), tal como se ha observado en estudios previos (Arocena et al., 2019), así como una mayor intensidad de señal tanto de lípidos neutros como de lípidos de membrana.

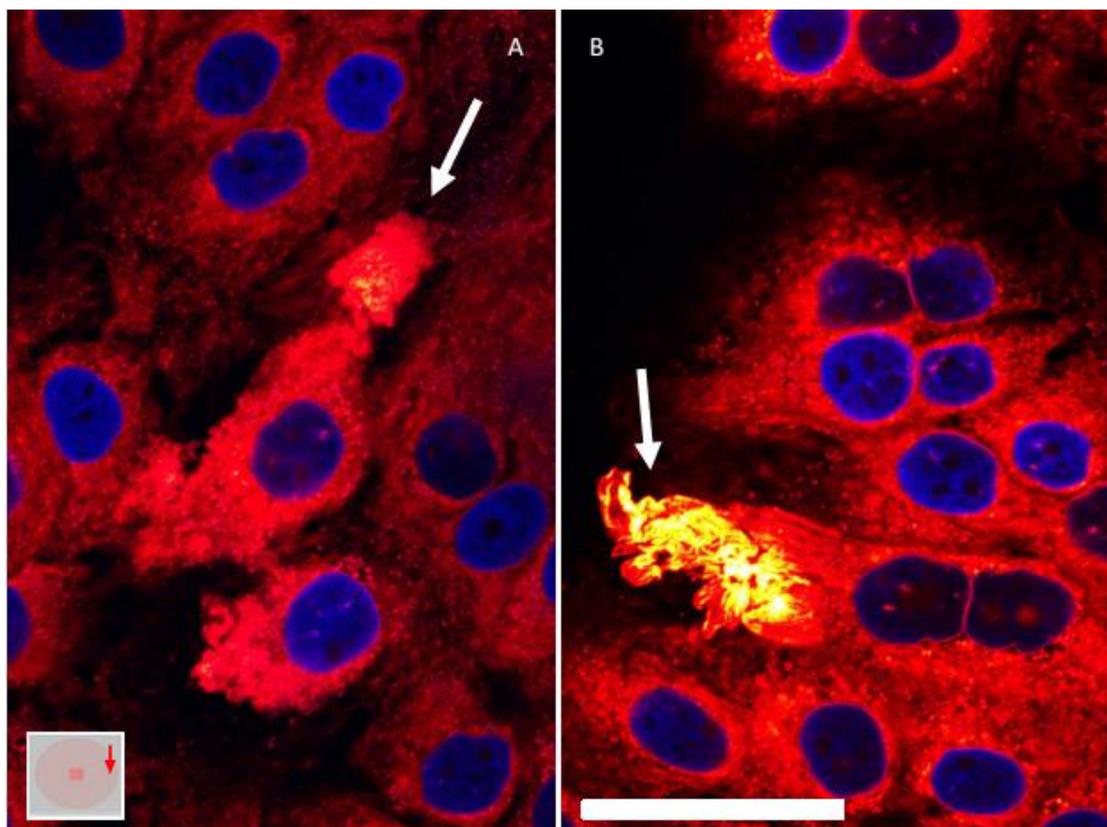


Figura 8. Observación por microscopio confocal de células HaCaT cultivados con la variante del método coverslip hypoxia, a los que se les realizó un marcaje con Nile Red (rojo), y con DAPI (azul). Barra de calibración de 50 micrómetros. En ambas imágenes se observa a las células HaCaT en diferentes zonas periféricas de la placa, alejadas de la entrada de oxígeno, con sus núcleos marcados con DAPI, y una marcada señal de lípidos, visualizándose incluso envolturas córneas (señaladas con flechas). **A)** células en comienzo de cornificación. **B)** células en un estado de cornificación más avanzado.

Estos resultados confirman lo observado por contraste de fases respecto al aumento de la queratinización en un ambiente hipóxico. Por otra parte, el aumento observado en la intensidad de marcación de gotitas lipídicas conteniendo lípidos neutros en un ambiente hipóxico es similar a lo que se ha

observado previamente en otros tipos celulares sometidos a hipoxia (Arocena et al., 2019; Zhang et al., 2017).

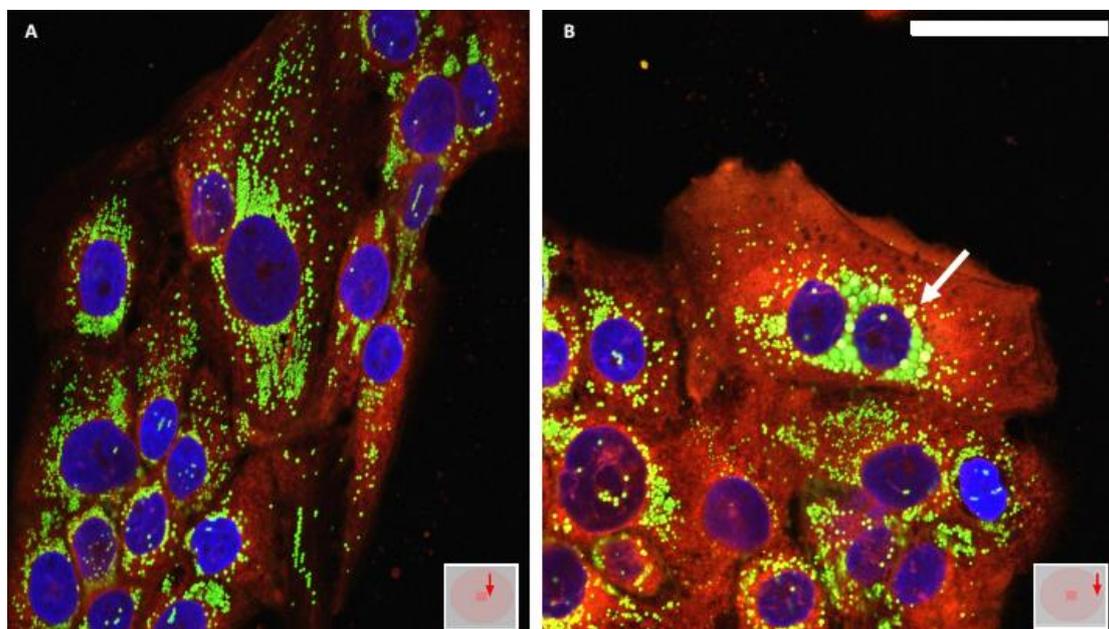


Figura 9. Observación por microscopio confocal de células HaCaT cultivadas con la variante del método coverslip hypoxia, marcados con Nile Red, detectándose con una excitación y emisión a 510/582 nm (verde) y con una excitación y emisión a 540/624 nm (rojo), y una tinción con DAPI (azul). En rojo se observan fosfolípidos que tienen una señal difusa en todo el citoplasma de las células, en verde se observan gotitas lipídicas neutras que tienen una distribución discreta (señaladas con flechas) y en azul los núcleos celulares. **A)** Células HaCaT en la zona central de la placa, cerca de la entrada de oxígeno. **B)** Células HaCaT en una zona periférica de la placa, alejadas de la entrada de oxígeno. Con la punta de flecha blanca se indica una gotita lipídica de gran tamaño.

5.5. Detección de GLUT1 *in vivo* en preparados de Liquen Plano Oral

Mediante la técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo el estudio *in vivo* de queratinocitos de la mucosa oral en el contexto de la patología Liquen Plano Oral, para la búsqueda del marcador de hipoxia GLUT 1, utilizando como control positivo preparados de Hiperplasia Fibrosa.

Se utiliza preparados de Hiperplasia Fibrosa en Amígdala como control positivo dado que ésta se asemeja a una mucosa oral normal, con un tejido epitelial

normal, con un patrón de GLUT-1 predominantemente en la capa basal y membranoso.

No se utilizó mucosa oral normal como control dado que es más complicado obtener este tipo de tejido debido a consideraciones éticas.

Realizando la observación al microscopio de los diferentes preparados, se obtuvo como resultado una marcada expresión de GLUT 1 en todos los preparados de Liquen Plano Oral (figura 10). En particular, se observó en algunos casos una marcada expresión de GLUT1 desde el estrato basal al estrato granuloso del epitelio oral (figuras 10B y 10C).

Como se ha mencionado anteriormente en la introducción, esta patología presenta un microambiente alterado, eventualmente hipóxico, al igual que el microambiente de las células tumorales. De hecho, es una patología precursora de carcinoma oral. Este resultado sobre la expresión de GLUT 1 es un acercamiento más indicativo de que la hipoxia podría ser una de las características del microambiente celular en esta patología.

Se observó a su vez un marcado aumento de la queratinización en el epitelio oral de Liquen Plano Oral, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos de los estudios *in vitro* de queratinocitos humanos (figura 11). En la figura 11A se puede apreciar una extensa capa córnea, y en la figura 11B se visualiza una zona interna del epitelio cornificada.

Todos estos datos apuntan a un microambiente en Liquen Plano Oral donde está inducida la expresión de GLUT 1 y a su vez hay un aumento de la queratinización acompañada de diferenciación terminal de los queratinocitos. Esto es similar a lo que hemos observado en el microambiente hipóxico *in vitro*, y dicha correlación sugiere entonces que las alteraciones en el epitelio oral de Liquen Plano Oral podrían tener su origen en parte en la presencia de un microambiente hipóxico *in vivo*.

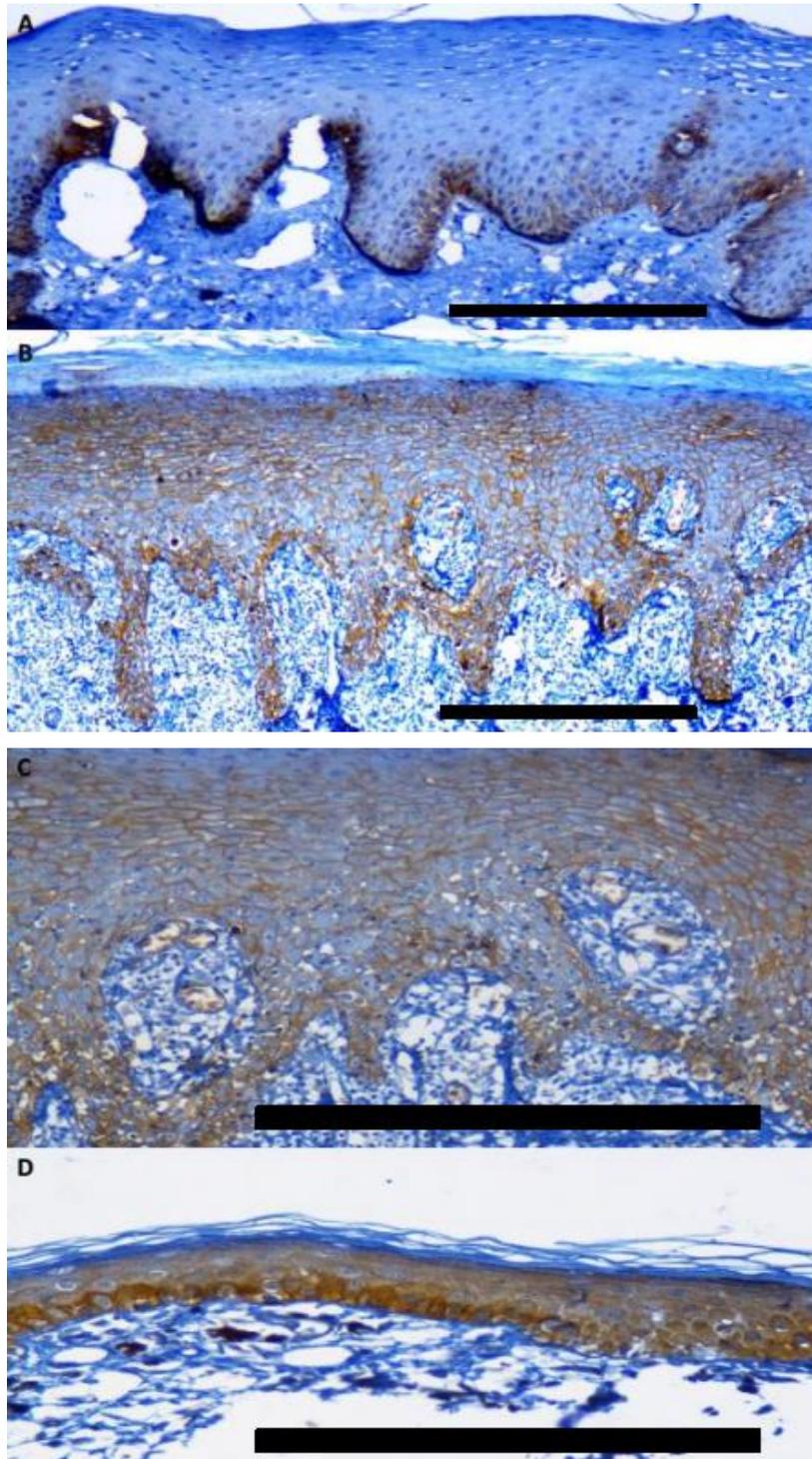


Figura 10. Observación al microscopio del resultado de la Inmunohistoquímica con GLUT 1, con contratinción con Hematoxilina, realizada en preparados de biopsias de la mucosa de revestimiento de la cavidad oral en el contexto de Liquen Plano Oral y de Hiperplasia Fibrosa, a modo de control. En color marrón se evidencia la señal de GLUT1 en cada imagen. Barras de calibración de 100 micrómetros. **A)** Hiperplasia Fibrosa a 20X. **B)** Liquen Plano Oral a 20X. **C)** Liquen Plano Oral a 40X. **D)** Liquen Plano Oral a 40X.

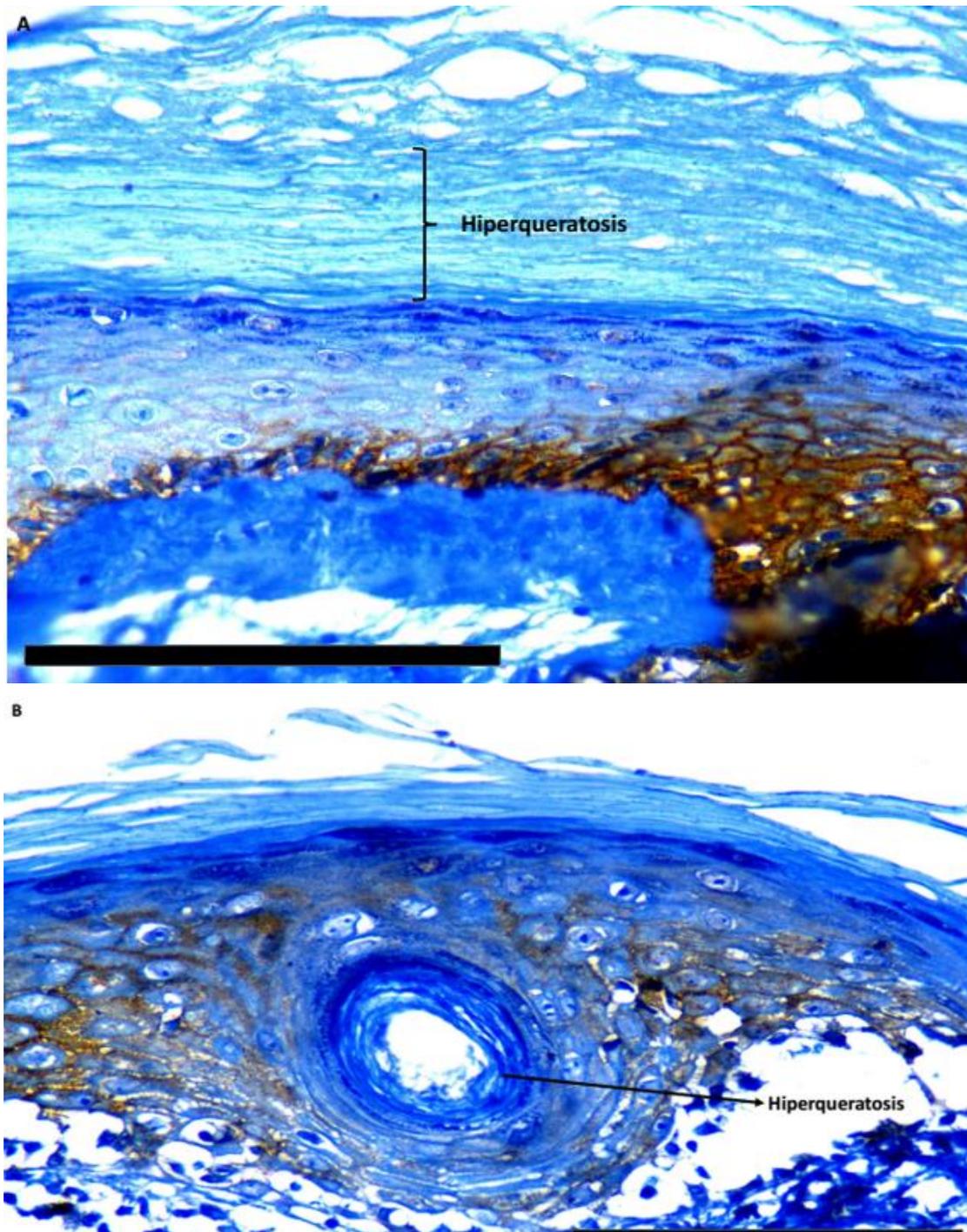


Figura 11. Observación al microscopio, 40X, del resultado de una Inmunohistoquímica con GLUT 1 con contratinción con Hematoxilina, realizada en preparados de biopsias de la mucosa de revestimiento de la cavidad oral en el contexto de Liquen Plano Oral, de corte transversal, donde se observa un marcado aumento de la queratinización. En color marrón se evidencia la señal de GLUT 1 en cada imagen. Barras de calibración de 100 micrómetros. **A)** Se destaca una hiperqueratinización en la capa córnea. **B)** Queratinización aumentada en zona central del epitelio.

Si bien GLUT 1 ya se detectó anteriormente en Liquen Plano Oral en estudios anteriores, en este trabajo se detectaron patrones de expresión de GLUT1 en varios estratos del epitelio oral en Liquen plano oral que en otros estudios recién se observan en Carcinoma oral (Wang et al., 2017). A su vez, otros estudios anteriores manifiestan haber detectado GLUT 1 en Liquen Plano Oral pero no presentan imágenes ilustrativas (Brands et al., 2017).

6. CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se realizó la puesta a punto del cultivo celular de células HaCaT cultivadas en un microambiente hipóxico inducido por cubreobjetos, estableciéndose que en estas células, a diferencia de las Lncap -línea celular con la que se trabajó en estudios anteriores al crear la variante utilizada del método para inducir hipoxia por cubreobjetos- parece ser necesario esperar 48 horas, una vez que son cultivadas con el cubreobjetos, para detectar hipoxia.

Además se logró detectar los marcadores de hipoxia pimonidazol y GLUT 1 en queratinocitos humanos utilizados como modelo de queratinocitos de la mucosa oral y sometidos a un microambiente hipóxico *in vitro*, a través de la variante del método hipoxia inducida por cubreobjetos.

También se detectaron marcados cambios morfológicos en las células como respuesta al microambiente hipóxico que se les indujo, obteniéndose, en las zonas periféricas de la placa, células con formas más extendidas y menos poligonales con protusiones de membrana, que no parecen observarse en el centro de la placa o en las células control sin el cubreobjetos, así como una notable presencia de cornificación como parte de la diferenciación terminal de los queratinocitos.

Además, si bien no es la primera vez, se ha detectado una marcada expresión del marcador de hipoxia GLUT 1 en tejido epitelial de la mucosa oral en Liquen Plano Oral *in vivo*, ampliando resultados anteriores (Brands et al., 2017; Wang et al., 2017).

También hemos observado un marcado aumento de la cornificación/queratinización en la mucosa oral en Liquen Plano Oral con respecto a la mucosa oral normal, no solamente en la región más externa (capa córnea), si no también en regiones basales (queratinización ectópica).

Se pudo constatar que hay un correlato entre las alteraciones detectadas en queratinocitos humanos inducidos a un microambiente hipóxico *in vitro* y las alteraciones detectadas *in vivo* en tejido epitelial de la mucosa oral en el contexto de Liquen Plano Oral, que se evidencia en la expresión del marcador de hipoxia GLUT1 tanto *in vitro* como *in vivo*, así como por el aumento de la queratinización detectada también *in vitro* e *in vivo*.

Estos datos son consistentes con la posible presencia de hipoxia en el microambiente de la patología de Liquen Plano Oral. Dado que la hipoxia es un factor muy importante en el desarrollo tumoral, nuestros resultados sugieren que continuar investigando la posible presencia de hipoxia en Liquen Plano Oral podría contribuir a una mejor comprensión de la patología de Liquen Plano Oral así como de su potencial transformación tumoral. Asimismo, nuestros resultados sugieren que la variante de hipoxia inducida por cubreobjetos que hemos utilizado es un método útil para estudiar la respuesta de los queratinocitos de la mucosa oral sometidos a un microambiente hipóxico, así como para extrapolar estas observaciones a la mucosa oral *in vivo* en condiciones patológicas.

7. PERSPECTIVAS A FUTURO

Para complementar el estudio sobre el microambiente hipóxico en la patología de Liquen Plano Oral, y dado que la sonda de detección de hipoxia Hypoxyprobe ha sido utilizada en estudios en humanos previamente (Westbury et al., 2007), se podría plantear la posibilidad de utilizarla en estudios *in vivo* en pacientes con Liquen Plano Oral. De esta forma se podrían obtener datos más directos de la presencia de un microambiente hipóxico en esta patología.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, K., & Brekken, R. (2014). Hypoxia Studies with Pimonidazole in vivo. *Bio-Protocol*, 4(19). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1254>
- Arocena, M., Landeira, M., Di Paolo, A., Silva, A., Sotelo-Silveira, J., Fernández, A., & Alonso, J. (2019). Using a variant of coverslip hypoxia to visualize tumor cell alterations at increasing distances from an oxygen source. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 16671–16678. <https://doi.org/10.1002/jcp.28507>
- Becelli, R., Renzi, G., Morello, R., & Altieri, F. (2007). Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. *Journal of Craniofacial Surgery*, 18(5), 1051–1054. <https://doi.org/10.1097/scs.0b013e3180de63eb>
- Brands, R. C., Köhler, O., Rauthe, S., Hartmann, S., Ebhardt, H., Seher, A., Linz, C., Kübler, A. C., & Müller-Richter, U. D. A. (2017). The prognostic value of GLUT-1 staining in the detection of malignant transformation in oral mucosa. *Clinical Oral Investigations*, 21(5), 1631–1637. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1954-5>
- Cheng, Y. S. L., Gould, A., Kurago, Z., Fantasia, J., & Muller, S. (2016). Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 122(3), 332–354. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.05.004>
- Cousins, F. L., Murray, A. A., Scanlon, J. P., & Saunders, P. T. K. (2016). Hypoxyprobe™ reveals dynamic spatial and temporal changes in hypoxia in a mouse model of endometrial breakdown and repair. *BMC Research Notes*, 9(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1842-8>
- Eltzschig, H. K., & Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 364(7), 656–665. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910283>
- Fenoll, B.-, López-Jornet, A. *, & Pía. (2004). Liquen plano oral. Naturaleza,

- aspectos clínicos y tratamiento Oral lichen planus. Character, clinical aspects and treatment. In *RCOE* (Vol. 9).
- Ge, Y., Xu, Y., Sun, W., Man, Z., Zhu, L., Xia, X., Zhao, L., Zhao, Y., & Wang, X. (2012). The molecular mechanisms of the effect of Dexamethasone and Cyclosporin A on TLR4 /NF- κ B signaling pathway activation in oral lichen planus. *Gene*, *508*(2), 157–164.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.045>
- Gillies, R. J., & Gatenby, R. A. (2007). Adaptive landscapes and emergent phenotypes: Why do cancers have high glycolysis? In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 39, Issue 3, pp. 251–257).
<https://doi.org/10.1007/s10863-007-9085-y>
- Gillies, R. J., Raghunand, N., Karczmar, G. S., & Bhujwala, Z. M. (2002). MRI of the tumor microenvironment. In *Journal of Magnetic Resonance Imaging* (Vol. 16, Issue 4, pp. 430–450).
<https://doi.org/10.1002/jmri.10181>
- Greenspan, P., & Fowler, S. D. (1985). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of Lipid Research*, *26*(7), 781–789.
- Ibrahim-Hashim, A., Robertson-Tessi, M., Enriquez-Navas, P. M., Damaghi, M., Balagurunathan, Y., Wojtkowiak, J. W., Russell, S., Yoonseok, K., Lloyd, M. C., Bui, M. M., Brown, J. S., Anderson, A. R. A., Gillies, R. J., & Gatenby, R. A. (2017). Defining cancer subpopulations by adaptive strategies rather than molecular properties provides novel insights into intratumoral evolution. *Cancer Research*, *77*(9), 2242–2254.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2844>
- Jones, K. B., & Klein, O. D. (2013). Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: The first steps in a long journey. *International Journal of Oral Science*, *5*(3), 121–129.
<https://doi.org/10.1038/ijos.2013.46>
- Kujan, O., Farah, C. S., & Johnson, N. W. (2017). Oral and oropharyngeal cancer in the Middle East and North Africa. *Translational Research in Oral Oncology*, *2*, 2057178X1769848.
<https://doi.org/10.1177/2057178x17698480>

- Marín-Hernández, Á. (2009). El factor inducido por la hipoxia-1 (HIF-1) y la glucólisis en las células Tumorales. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(2), 42–51.
- Markopoulos, A. K. (2012). Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. *The Open Dentistry Journal*, 6(1), 126–130.
<https://doi.org/10.2174/1874210601206010126>
- Michel, S., Schmidt, R., Shroot, B., & Reichert, U. (1988). Morphological and biochemical characterization of the cornified envelopes from human epidermal keratinocytes of different origin. *Journal of Investigative Dermatology*, 91(1), 16–21. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12463281>
- Nguyen, V. T., Ndoye, A., Hall, L. L., Zia, S., Arredondo, J., Chernyavsky, A. I., Kist, D. A., Zelickson, B. D., Lawry, M. A., & Grando, S. A. (2001). Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *Journal of Cell Science*, 114(6), 1189–1204.
- Peng, Q., Zhang, J., Ye, X., & Zhou, G. (2017). Tumor-like microenvironment in oral lichen planus: evidence of malignant transformation? *Expert Review of Clinical Immunology*, 13(6), 635–643.
<https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1295852>
- Pitts, K. R., & Toombs, C. F. (2004). Coverslip hypoxia: A novel method for studying cardiac myocyte hypoxia and ischemia in vitro. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 287(4 56-4), H1801–H1812. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00232.2004>
- Rademakers, S. E., Lok, J., van der Kogel, A. J., Bussink, J., & Kaanders, J. H. A. M. (2011). Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 α , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer*, 11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-167>
- Rivera, C., & Venegas, B. (2014). Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 8(1), 7–11.
<https://doi.org/10.3892/ol.2014.2103>

- Robin, E. D., Murphy, B. J., & Theodore, J. (1984). Coordinate regulation of glycolysis by hypoxia in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*, *118*(3), 287–290. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041180311>
- Seo, M. D., Kang, T. J., Lee, C. H., Lee, A. Y., & Noh, M. (2012). HaCa T keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. *Biomolecules and Therapeutics*, *20*(2), 171–176. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.2.171>
- Thomson, P. J., Potten, C. S., & Appleton, D. R. (1999). Mapping dynamic epithelial cell proliferative activity within the oral cavity of man: A new insight into carcinogenesis? *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *37*(5), 377–383. <https://doi.org/10.1054/bjom.1999.0130>
- Wang, X. X., Sun, H. Y., Yang, Q. Z., Guo, B., Sai, Y., & Zhang, J. (2017). Hypoxia-inducible factor-1 α and glucose transporter 1 in the malignant transformation of oral lichen planus. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *10*(8), 8369–8376.
- Westbury, C. B., Pearson, A., Nerurkar, A., Reis-Filho, J. S., Steele, D., Peckitt, C., Sharp, G., & Yarnold, J. R. (2007). Hypoxia can be detected in irradiated normal human tissue: A study using the hypoxic marker pimonidazole hydrochloride. *British Journal of Radiology*, *80*(959), 934–938. <https://doi.org/10.1259/bjr/25046649>
- Winning, T. A., & Townsend, G. C. (2000). Oral mucosal embryology and histology. In *Clinics in Dermatology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 499–511). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(00\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(00)00140-1)
- Wong, W. J., Richardson, T., Seykora, J. T., Cotsarelis, G., & Simon, M. C. (2015). Hypoxia-inducible factors regulate filaggrin expression and epidermal barrier function. *Journal of Investigative Dermatology*, *135*(2), 454–461. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.283>
- Zhang, X., Saarinen, A. M., Hitosugi, T., Wang, Z., Wang, L., Ho, T. H., & Liu, J. (2017). Inhibition of intracellular lipolysis promotes human cancer cell adaptation to hypoxia. *ELife*, *6*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.31132>