



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS CD34+
ESTROMALES/TELOCITOS EN LA LÁMINA PROPIA DE
LA LENGUA MEDIANTE EL EMPLEO DE UN MODELO
MURINO TRANSGÉNICO.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

SANDRA LILIA SANJUAN CHÁVEZ

TUTOR: Mtro. JOSÉ GUILLERMO VILLAGÓMEZ OLEA

VoBo



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

*“Haz todo con el más profundo cariño, como si tus manos se movieran para quien más amas.
No olvides que nuestras vidas fluyen dentro de un mismo río, y así, todos estamos conectados
en el gran círculo de la vida.”*
Ana Epulef Panguilef.

Expreso mi gratitud al maestro José Guillermo Villagómez Olea, al compartir su intelecto, guiándome con disposición comprensiva y loable.

Extiendo mi agradecimiento al Departamento de Patología Bucal, Medicina bucal y Maxilofacial, de la Facultad de Odontología UNAM. En especial a la maestra Claudia Patricia Mejía Velázquez y a la especialista Jessica Tamara Páramo Sánchez, por la plausible enseñanza que me fue transmitida. Igualmente, a las residentes de primer año de la especialidad de patología bucal, por su puntual apoyo técnico.

Dedicatoria

En memoria de Moisés Chávez Olmedo, mi abuelo. Por su grandeza al ser y trascender.

A mi madre, al procurarme con amor inefable, su magno obsequio.

A mi padre, por los consejos brindados, las lecciones indiscutibles para afrontar lo fortuito, con voluntad y gallardía.

Tabla de contenido

<i>Agradecimientos</i>	3
<i>Dedicatoria</i>	3
<i>Antecedentes</i>	5
Definición y características morfológicas de los telocitos.	5
Inmunocaracterización de los telocitos.	7
Localización y función de telocitos.	9
Telocitos en la lámina propia de la lengua humana.	12
<i>Justificación</i>	14
<i>Hipótesis</i>	15
<i>Objetivos</i>	16
<i>Materiales y métodos</i>	17
Modelo murino transgénico.	17
Histología e Inmunofluorescencia	17
Reanálisis de datos bioinformáticos	19
<i>Resultados</i>	20
Análisis histológicos por H&E de cortes coronales de lengua de ratón.	20
Identificación de Telocitos CD34+ mediante el empleo de un modelo murino transgénico. ...	22
Reanálisis de datos de secuenciación de célula única (sc-RNAseq) para la identificación in silico de telocitos en la lengua de ratón.....	24
<i>Discusión</i>	28
<i>Conclusión</i>	32
<i>Bibliografía</i>	33

Antecedentes

Definición y características morfológicas de los telocitos.

Los telocitos son células estromales con morfología peculiar, pues tienen un citoplasma central redondo, u en forma de huso, a partir del cual emergen prolongaciones finas y largas, denominadas telopodos. Estos telopodos pueden tener una extensión de 10-100 micrómetros, y a lo largo de ellos se identifica la presencia de dilataciones en forma de perlas (Figura 1).(1) El re-descubrimiento de los telocitos los ha identificado como una entidad central en la regulación de los nichos celulares, que incluyen interacciones con diferentes tipos celulares como células madre, inmunitarias, nerviosas, endoteliales, etc. Estas células ya habían sido descritas hace más de 100 años por Santiago-Ramón y Cajal (2). Sin embargo, debido a las limitaciones de la época, se pensó que eran un artificio (3). Posteriormente, gracias a las técnicas microscópicas, incluyendo inmunofluorescencia, microscopía electrónica, y más recientemente análisis genómicos, como secuenciación de ARN, se ha corroborado su existencia.

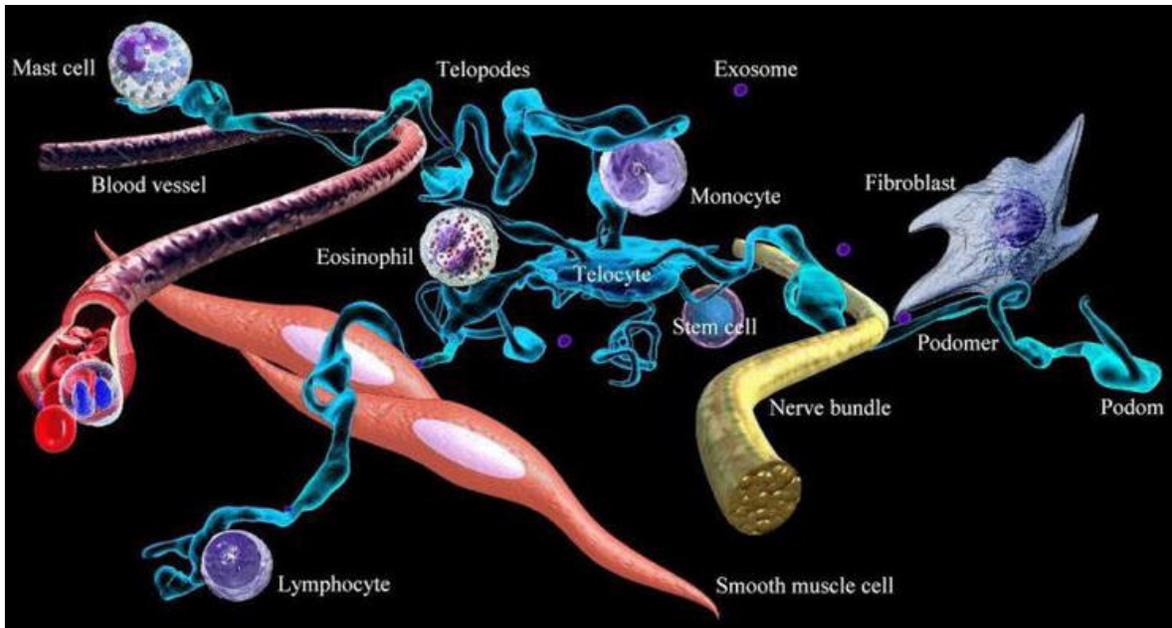


Figura 1. Representación esquemática de los telocitos, y su interacción con diferentes tipos celulares. En la presente figura se observa al telocito (en azul celeste), que tiene un cuerpo central del cual emergen prolongaciones (podómeros), a través de los cuales establece contacto físico directo con diferentes tipos celulares, que incluyen células inmunitarias, vasos sanguíneos, células de músculo liso, células madre y fibroblastos. Así mismo se pueden observar exosomas liberados por los telocitos. Estos exosomas son pequeñas vesículas con contenido interno, que se hipotetiza es uno de los mecanismos de mediación, pertenecientes a la comunicación entre los telocitos con otras células. (Figura tomada de (4))

Inmunocaracterización de los telocitos.

Además de la morfología, los telocitos también pueden ser identificados con técnicas de inmunodetección. Actualmente, no existe un marcador único para identificar a los telocitos. Sin embargo, se ha caracterizado un grupo de marcadores que en combinación, pueden auxiliar a su identificación. Estos marcadores propuestos incluyen a CD34, PDGFRA, FoxL1, Vimentina, C-KIT, Gli1, etc.(1). Aunque de todos los marcadores, la combinación de CD34 y PDGFRA es actualmente la forma más confidente para identificar a los telocitos(3). Algunos autores también incluyen el evaluar la negatividad en telocitos, para marcadores como CD31 (marcador de célula endotelial)(5). De tal manera, que la aproximación más holística para identificar a los telocitos, se basa en la evaluación de su localización estromal, su morfología y el uso de marcadores.

Organ	Markers
Heart	Kit; CD34; S100
Heart valves	Kit; CD34; vimentin; PDGFR β
Pulmonary veins	Kit
Trachea and bronchi	Kit
Lungs	Kit; CD34
Meninges and choroid plexus	Kit
Striated muscle	Kit; caveolin 1
Skin	Kit or CD34; vimentin
Gastrointestinal tract	CD34; vimentin; PDGFR α
Gastrointestinal tract (lamina propria)	CD34; vimentin; PDGFR α ; FOXL1; GLI1; SOX6; CD90
Salivary glands	Kit; vimentin; α -SMA
Gall bladder	Kit; CD34; vimentin
Pancreas	Kit; CD34; vimentin; some α -SMA; some S100 positive
Mammary gland	CD34; vimentin; CD10
Fallopian tube	Kit; CD34; S100; some vimentin
Myometrium	Kit; CD34
Placenta	Varying expression of Kit; CD34; vimentin
Kidney	Kit; CD34; vimentin
Ureter and urinary bladder	CD34/calreticulin double positive; PDGFR α / calreticulin double positive

Tabla 1. Lista de marcadores para telocitos identificados en diferentes órganos y tejidos. Nótese como CD34 y PDGFRA, son los marcadores más comúnmente reportados. Tabla tomada de Kondo et al.(3).

Localización y función de telocitos.

En los vertebrados, incluyendo el humano, los telocitos han sido descritos en los compartimentos estromales de diferentes órganos y tejidos, entre los cuales se encuentra el corazón, pulmón, córnea, tejido musculoesquelético, intestino, ligamento periodontal, lengua, piel, mucosas, glándulas salivales, etc. (1) (Ver tabla 1).

Respecto a sus funciones, los telocitos pueden tener un rol de **soporte**, debido a su distribución en forma de red interconectada, y proporción relativamente abundante en diferentes tejidos. Se ha reportado la presencia en el estroma de diferentes órganos y tejidos, de células con características de telocitos y que forman parte del mesénquima, en estos sitios(6-9). Específicamente, son sus proyecciones -telopodos-, quienes le confieren la capacidad de construir redes complejas, estableciendo conexiones de tipo homo y heterocelular. Esta capacidad de interconexión, también se ha asociado con el rol de **mediadores de la comunicación**, pues tanto estudios in vitro como in vivo, han identificado la capacidad de los telocitos de secretar diversos ligandos(9). Asimismo, los telocitos pueden secretar exosomas (ver figura 1), las cuales son pequeñas vesículas (de entre 30-150nm) con contenido que incluye ácidos nucleicos, iones y proteínas(10). Los telocitos también han sido postulados, como **células inmunoregulatoras**. Igualmente observados en proximidad, o estableciendo contacto directo con macrófagos, linfocitos, basófilos, y eosinófilos. Al igual, tienen la capacidad de secretar quimioatrayente como quimiocinas (p ej: interleucinas, interferones, factores de necrosis tumoral, factores de crecimiento, formilpéptidos)(11). Todo esto apunta, a un papel asociado a las respuestas inmunes innatas, y adaptativas aún no caracterizados.

Sin embargo, la mayor evidencia del papel de los telocitos, proviene de estudios en modelos murinos, donde se analiza su rol en el tracto gastro-intestinal. Aquí se ha identificado que estas células, pueden residir en el estroma sub-epitelial tanto en el fondo de las criptas intestinales, como a lo largo de las vellosidades intestinales(1). En las criptas intestinales, los telocitos han sido identificados por su capacidad de secretar ligandos (p. ej. de la familia de Wnt y R-spondins) asociados a la supervivencia de las células madre epiteliales intestinales. A lo largo de las vellosidades intestinales, también se ubican telocitos sub-epiteliales, que cambian el tipo de ligandos secretados(12). Específicamente, a este nivel secretan proteínas de la familia BMP (Proteína morfogenética ósea) y DKK (Dickkopf), y proteínas de la vía no canónica de Wnt (p. ej: Wnt5a). Este cambio, obedece al hecho de que estos factores son importantes, para promover la diferenciación y mantenimiento de la identidad celular a este nivel(12). (Ver figura 2).

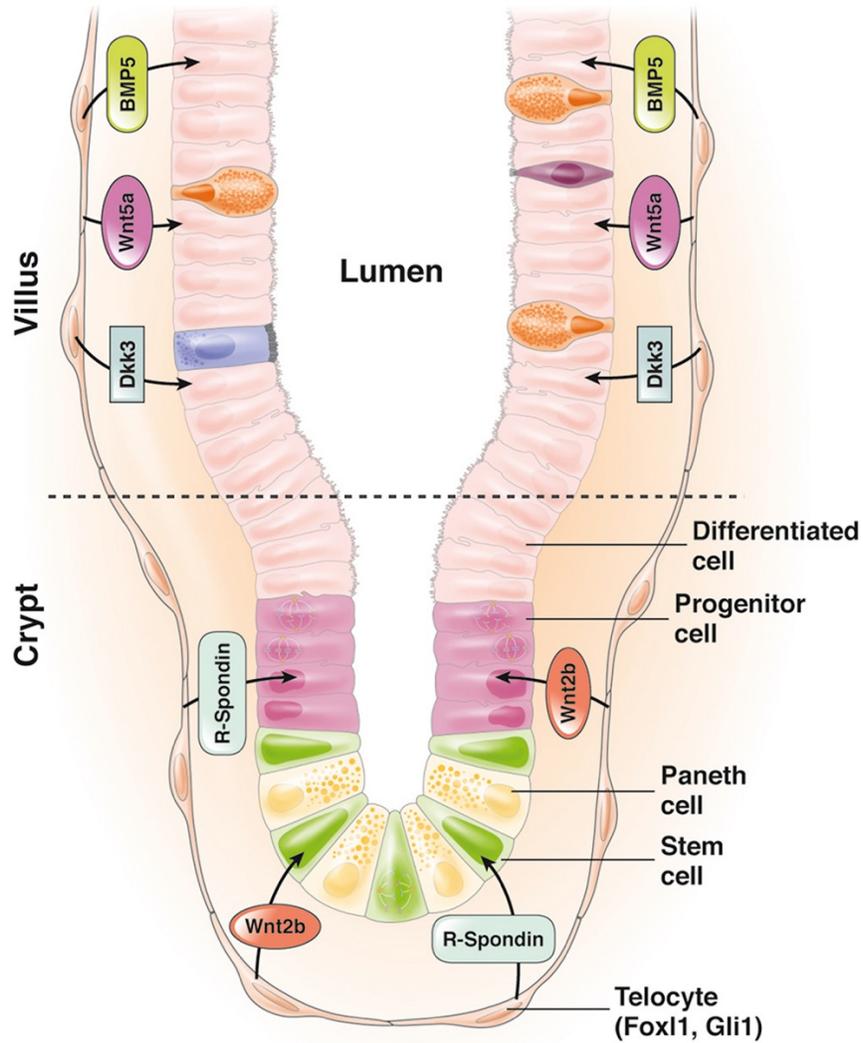


Figura 2. Telocitos sub-epiteliales presentes en el intestino. En esta imagen se muestra la secreción asociada de telocitos ubicados en la cripta intestinal, principalmente asociados a la supervivencia de las células madre intestinales epiteliales (p. ej: Wnt2b, R-spondin). Asimismo, los ligandos secretados a lo largo de las vellosidades, lo cuales tienen una función principalmente a la promoción de la diferenciación (p. ej: Dkk3, Wnt5a, BMP5). (Imagen tomada de: (13))

Telocitos en la lámina propia de la lengua humana.

La lengua es un órgano muscular, parte del tracto gastrointestinal, central para la alimentación, el habla, y la percepción del gusto. La lengua está constituida por músculo estriado, recubierto por una membrana mucosa, la cual, consta de un epitelio escamoso estratificado queratinizado en algunas zonas, por debajo del cual se localiza un tejido conjuntivo laxo. La mucosa de la superficie dorsal, se forma por tres tipos de papilas: filiformes, fungiformes y circunvaladas. Por su parte, en la porción postero lateral, se pueden observar papilas foliadas. Las papilas filiformes son las más abundantes, poseen un epitelio escamoso estratificado queratinizado, sin embargo no presentan botones gustativos. Las papilas fungiformes se encuentran dispersas. El tejido conjuntivo de estas papilas es altamente vascularizado.

Rosa y cols., han caracterizado que la lámina propia del estroma (tejido conjuntivo) lingual se encuentra enriquecido, por células CD34+ con características propias de telocitos. Esto incluye la co-expresión de CD34 junto con PDGFRA y la presencia ultraestructural de telopodos y dilataciones a lo largo de ellos(5). Además estos mismos autores caracterizaron, que estos telocitos también se encuentran presentes entremezclados en el intersticio de la musculatura subyacente, y en aposición a las fibras musculares. A pesar de esta inicial caracterización, la identificación en modelos animales, incluida su función en este sitio, aún permanece sin caracterizarse. Sin embargo, su localización sugiere que estas células tiene roles relevantes en estos sitios, participando directamente en la homeostasis del órgano y potencialmente teniendo participación en procesos, condiciones, o alteraciones que afectan a la lengua, como cicatrización, reparación o transformación maligna.

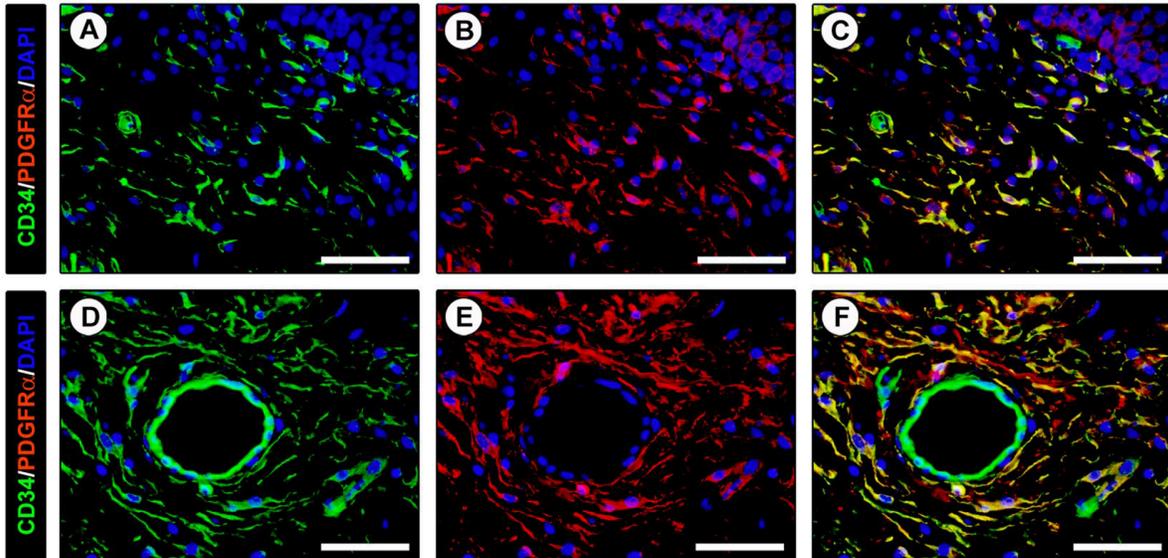


Figura 3. Identificación de telocitos en la lámina propia lingual (de humano). En esta imagen se muestra la detección por inmunofluorescencia de células que co-expresan a CD34 (verde) y PDGFRA (rojo), presentes de manera abundante en la lámina propia de la lengua humana. Nótese como también, existen células que no co-expresan estos marcadores y que probablemente corresponden a células distintas (como células endoteliales). En azul se puede identificar a DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), el cual es un marcador nuclear. Imagen tomada de(5).

Justificación

Las células CD34⁺ estromales/telocitos, han emergido como una entidad celular con roles emergentes en la regulación de órganos y tejidos. Estos han sido identificados, en diferentes nichos celulares, incluyen la lámina propia y el intersticio muscular de la lengua del humano. Sin embargo, su identificación aún permanece por corroborarse en modelos animales, que permitan indagar sobre su rol en este sitio.

Los modelos murinos transgénicos, representan una herramienta atractiva para la identificación, análisis, y estudio *in vivo* de células que habitan órganos y tejidos, permitiendo su estudio en diferentes contextos, incluyendo el desarrollo, crecimiento y estímulos particulares.

El empleo de un modelo murino transgénico que sirva, para la identificación de células CD34⁺ estromales/telocitos en la lengua, representa una novedosa estrategia para aplicarse, en el estudio de condiciones, que van desde , el desarrollo hasta la regeneración tisular y enfermedades como cáncer oral.

Hipótesis

La lengua del ratón, se caracteriza por la presencia de células con características propias de telocitos, presentes en la lámina propia y en el intersticio muscular. Además, estas células tienen una firma transcripcional y funciones tanto específicas para su nicho, como similares a otros compartimentos, las cuales pueden ser identificados mediante análisis bioinformáticos.

Objetivos

- Identificar a células con características propias de telocitos, mediante el empleo de un modelo murino transgénico, que permita el marcaje de las células positivas para CD34.
- Corroborar la presencia de telocitos en la lengua del ratón, mediante el reanálisis bioinformático de datos disponibles depositados en la base de Gene Expression Omnibus (GEO, NCBI).
- Realizar análisis *in silico* para predecir la firma transcripcional, que caracteriza a los telocitos linguales.
- Realizar análisis ontológicos para predecir la función de los telocitos linguales.

Materiales y métodos.

Modelo murino transgénico.

En detalle, las muestras que utilizamos provienen de una línea de ratón transgénico CD34-CreER^{T2}; R26-tdTomato, en la cual se expresa de manera condicional a la proteína rojo fluorescente (RFP) en células CD34+. Las muestras de ratones transgénicos fueron proporcionados por el laboratorio de Paul T. Sharpe (Dental Institute, King's College London, Reino Unido). Estos ratones fueron mantenidos bajo el background genético *C57BL6J*. Para inducir la expresión de la RFP, se debe administrar tamoxifeno. Dicho tamoxifeno fue administrado, mediante inyección intraperitoneal cada 24 horas, durante 5 días consecutivos a una concentración de 75 mg/kg de peso corporal. 48 horas posterior a la última inyección por tamoxifeno los animales fueron sacrificados, las lenguas disecionadas para ser procesadas, y finalmente embebidas en parafina.

Histología e Inmunofluorescencia

Los experimentos fueron llevados a cabo bajo la guía de tesina (Dr. Villagómez Olea).

Los bloques de lenguas fijadas y embebidas en parafina, fueron cortados en secciones coronales con un grosor de 7 μ m, y montados en portaobjetos cargados. Para verificar la integridad del tejido, se realizó tinción por Hematoxilina y Eosina. Una vez verificada la integridad se procedió a realizar ensayos de inmunofluorescencia, para detectar la expresión de la proteína rojo fluorescente expresada exclusivamente en células CD34.

Posterior a la selección de secciones representativas, se procedió a realizar los ensayos de inmunofluorescencia. Primeramente se procedió a desparafinar la muestra, rehidratarla, y realizar la recuperación de antígenos con buffer de citratos (10 mM, pH 6.0), incubando las muestras a 60C° por media hora. A continuación se realizó bloqueo de sitios no específicos, utilizando una solución de albumina de suero bovino a una concentración de 1%, incubándolo por dos horas. Como anticuerpo primario, se utilizó Anti-RFP generado en conejo (Rockland, 600-401-379), mientras que como anticuerpo secundario para su detección se utilizó el anticuerpo Alexa-Fluor Goat anti-rabbit 488 (Thermo, A-11008). El anticuerpo primario fue diluido a una concentración 1:100 en PBS/Tween 0.05%, e incubado durante toda la noche. Al día siguiente las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente, durante 30 minutos antes de añadir el anticuerpo secundario. Previo a la incubación del anticuerpo secundario, se realizaron lavados con PBS-Tween. El anticuerpo secundario fue diluido a una concentración 1:500 en PBS/Tween 0.05% e incubado durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de lavados se contratiñeron con DAPI, antes de ser analizadas por microscopía confocal. Una vez adquiridas las imágenes, estas fueron analizadas utilizando el software ImageJ software (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Reanálisis de datos bioinformáticos

Los re-análisis e interpretación de datos bioinformáticos fueron llevados a cabo bajo la guía del asesor de tesina (Dr. Villagómez Olea).

Para estudiar las células estromales a nivel de expresión genética, decidimos reanalizar datos disponibles a partir de experimentos de secuenciación de célula única, reportados por Lyras y cols. (14). Estos datos los descargamos de la base de datos del Gene Expression Omnibus (GEO, NCBI), los cuales se encuentra bajo el código (GSE205162). Particularmente nos enfocamos, en reanalizar los datos provenientes de ratones postnatales, colectados a los tres días de nacidos. Posterior a descargar los datos, estos fueron analizados utilizando el paquete Seurat v4.0 R, usando como parámetros para filtrar los datos que cada gene estuviese expresado en al menos tres células, y que cada célula expresase al menos 200 genes. Posteriormente, los datos se analizaron utilizando los parámetros indicados por los autores para hacer un re-análisis, lo más fiel al análisis original. Para identificar los diferentes grupos celulares utilizando una resolución de 0.42, utilizando UMAP y 'Dim Plot' como la función definida para reducción dimensional no lineal, y para su visualización. Asimismo para los análisis de enriquecimiento y ontología utilizamos paquetes mencionados en la sección de resultados.

Resultados

Análisis histológicos por H&E de cortes coronales de lengua de ratón.

Para observar las características del estroma de la lengua de ratón, realizamos cortes coronales y tinción por Hematoxilina y Eosina. Estos nos permitieron llevar a cabo una correcta observación y comparación de los diferentes compartimentos de la lengua murina. Observamos que debajo del epitelio ventral y lingual, existe una densa lámina propia formada por tejido conjuntivo irregular. Específicamente, en la región lingual se puede observar la presencia de múltiples papilas las cuales tienen una región central de tejido conjuntivo. (Figura 4)

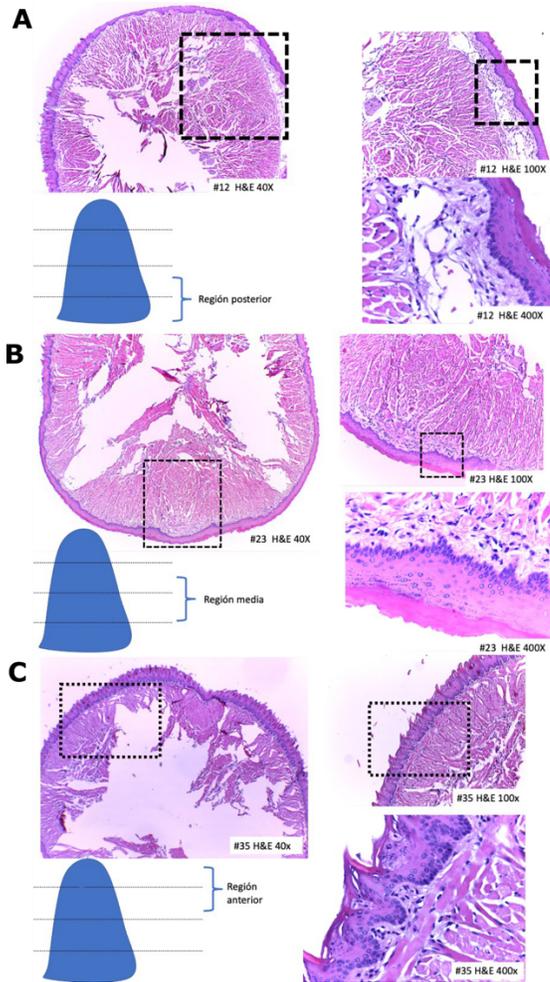


Figura 4. Análisis histológicos de la lengua de ratón. Los paneles A,B,C corresponden a cortes coronales teñidos de hematoxilina y eosina de la región posterior, medial, y anterior de la lengua de ratón. A través de estos se puede observar la presencia de una lámina propia subepitelial, que interconecta al epitelio con la musculatura subyacente. Este tejido mesenquimal tiene una arquitectura similar a la descrita en el humano como tejido conjuntivo irregular, donde se puede observar de manera concentrada en forma puntiaguda, en regiones de papilas filiformes (panel C, magnificación 400x).

Identificación de Telocitos CD34+ mediante el empleo de un modelo murino transgénico.

Para marcar a las células CD34 presentes en la lengua de ratón, tomamos ventaja de un modelo murino transgénico diseñado por Li y colaboradores. Este modelo fue creado mediante la inserción por técnica de knockin de la secuencia que codifica para CreERT2 en el locus del gen CD34, dando lugar a la línea *CD34-CreERT2^{+/+}* (15) . Posteriormente, esta línea fue cruzada con el reportero *crossed R26R-tdTomato^{+/+}* lo que dio a lugar a progenie *CD34-CreERT2^{+/-} ;R26R tdTomato^{+/-}* . De tal manera, que en este modelo se conduce a la expresión de tdTomato (Proteína rojo fluorescente) posterior a la activación por medio de la administración de tamoxifeno (Figura 5, panel superior). Para inducir una recombinación efectiva, se administró tamoxifeno a ratones de entre 2-4 meses de edad, al tratarlos durante 5 días con inyecciones intraperitoneales consecutivas. El tejido de interés fue colectado 48 horas posterior a la última inyección.

Los resultados mostraron la expresión efectiva y esperada de la proteína fluorescente, marcando a células con características a telocitos. Estas células fueron identificadas a lo largo de la lámina propia de la lengua, y se observó que morfológicamente tenían las propiedades de un cuerpo redondo u ovalado, con la presencia de extensiones que emergen del mismo, y que se encontraban de manera abundante formando una red interconectada a lo largo del estroma (Figura 5A,B). También indentificamos que estas células se encontraban dispersas en el intersticio de la musculatura central, con células en aposición a las fibras musculares . Es de resaltar, que esta técnica de marcaje permitió un mejor análisis estructural que la simple inmunotinción, donde no se pueden observar estos detalles (Figura 5C) .

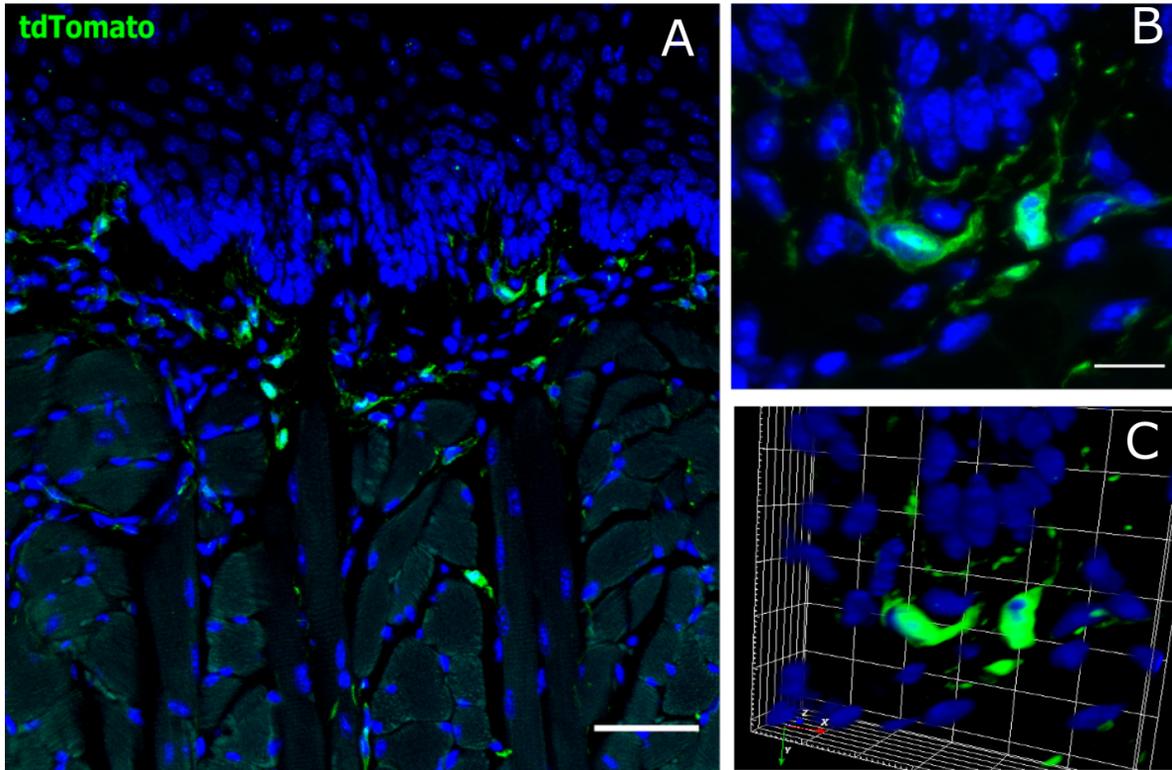
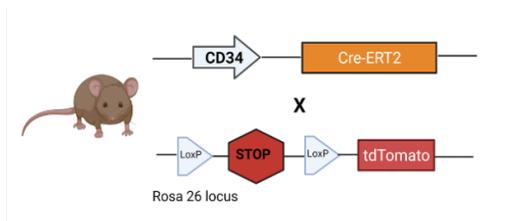


Figura 5. Identificación de células CD34 mediante el marcaje utilizando un modelo murino transgénico. Panel superior: Cruza del modelo murino transgénico, donde la expresión de la proteína CreERT2 es inducida por la actividad del promotor del gen de CD34. Esta línea fue cruzada con el reportero tdTomato. En el panel A, se observa la expresión de células fluorescentes posterior a la administración de tamoxifeno. El panel B, corresponde a la magnificación de una región del panel A donde se observa en mayor detalle la morfología de las células marcadas, y se aprecia la presencia del cuerpo central, y las prolongaciones emitidas a partir de estas. El panel C, corresponde a una reconstrucción tridimensional de B, para verificar que realmente dichas prolongaciones son emitidas desde un cuerpo central. (Barra de referencia= 100 micrometros, Color azul = DAPI, Color verde =tdTomato (RFP)).

Reanálisis de datos de secuenciación de célula única (sc-RNAseq) para la identificación in silico de telocitos en la lengua de ratón.

Liras y colaboradores recientemente reportaron, el análisis mediante secuenciación de célula única de las diferentes poblaciones inmunitarias presentes en la lengua de ratón. Sin embargo, también reportan dentro de su análisis, la identificación de una pequeña población estromal, que no fue posteriormente analizada(14). Por esto, nosotros decidimos reanalizar los datos disponibles, para verificar si la población estromal correspondía a telocitos. Al reanalizar los distintos datasets disponibles, encontramos que el dataset que corresponde a las lenguas provenientes de ratones recién nacidos (edad p3), era el que mejor describía a esta población estromal.

Una vez filtrados y normalizados los datos, las diferentes poblaciones fueron identificadas mediante análisis de ontología celular, utilizando análisis de Single R(16). Este análisis permitió correlacionar 13 grupos celulares con las principales poblaciones inmunitarias identificadas por los autores, y que incluía los diferentes grupos de macrófagos, mastocitos, neutrófilos, monocitos, células B, células Fn1+ y basófilos. Además encontramos un grupo celular que incluye a una mezcla de células T, células linfoides innatas (ILCS), células asesinas naturales (NK) y asesinas naturales T (NKT). Otro grupo celular estaba principalmente representado por células dendríticas mieloides (mDCs) (Figura 6A,C). Sin embargo, y siendo más relevante para nuestro análisis, esta estrategia permitió identificar la presencia de un grupo celular no inmune, que fue suscrito como células estromales o fibroblastos. Dado que las referencias que utiliza Single R, no contienen a los telocitos como una entidad celular reconocida, evaluamos si este grupo celular expresaba marcadores de telocitos incluido a CD34, PDGFRA, FoxL1 y Lgr5.

Mientras que la expresión de FoxL1 y Lgr5 estaba ausente en este grupo, encontramos que las células eran positivas tanto para CD34 como PDGFRA con una correlación positiva de 0.64 (Fig 6B). Considerando estos hallazgos con nuestros análisis in vivo decidimos renombrar a este grupo como CD34+ Telocitos/células estromales.

Los genes Col1a1, Col1a2, Col1a3, Postn, y Sparc se encontraron como parte de los genes más expresados, y parte de la firma transcripcional de los telocitos identificados en nuestro análisis (Fig 6C). Interesantemente estos genes también han sido identificados como parte de la firma transcripcional de células CD34+ estromales en el intestino, donde se sabe que tienen papeles asociados a la remodelación e inflamación tisular(17).

Debido a estas similitudes, decidimos analizar si era viable encontrar la expresión de otros ligandos asociados a telocitos. Específicamente, han sido caracterizados los telocitos de la lámina propia intestinal como una fuente rica en ligandos de Wnt, Dkk y Bmp. Por ello, hicimos una selección de ligandos asociados a telocitos (18), que se relacionan con la supervivencia de células madre, y procesos de diferenciación (Figura 6D). De esta lista encontramos que los CD34+ telocitos linguales, se caracterizan por la secreción del Wnt5a, ligando no canónico de la vía de Wnt. Asimismo encontramos cierta expresión de Srp1, el cual es un modulador de la vía de Wnt. Finalmente de los ligandos asociados a la vía de BMP, encontramos la expresión de BMP2 (Figura 6D).

Al terminar realizamos análisis de enriquecimiento. y de ontología genética para saber cuales son los procesos a los cuales están asociados los telocitos en la lengua. Nuestros resultados identificaron su participación en la organización y estructura de la matriz extracelular, incluyendo la organización y metabolismo de las fibras de colágeno (Fig 6F). Asimismo este análisis, predice una participación en la vía de TGFB, y la regulación de respuestas celulares asociadas a estímulos de factores de crecimiento. Interesantemente, se sugiere un rol potencial, para los telocitos en el fenómeno de transición epitelio-mesénquima (Fig 6E), lo que revela un rol aún no descrito ni estudiado para los CD34+ telocitos en este órgano.

expresión para esos ligandos incluyendo a Wnt5a, Sfrp1 y BMP2. E) Análisis de vías asociadas a la expresión de los CD34⁺ telocitos linguales donde resalta la asociación a la vía de TGFB y al fenómeno de transición epitelio-mesenquimal. F) Análisis de enriquecimiento, donde se identifican procesos celulares asociados a los telocitos linguales, corroborando su asociación a la remodelación y metabolismo tisular, así como a la vía de TGFB.

Discusión

En el presente trabajo hemos identificado, que de manera similar al humano, en la lámina propia y en el intersticio muscular de la lengua del ratón se encuentran células CD34⁺ estromales, con características atribuibles a telocitos. Esta identificación, se realizó mediante la integración de estrategias *in vivo*, en combinación con análisis *in silico*, que permitieron de manera confidente poder establecer la existencia de telocitos linguales, los cuales tienen potenciales roles relevantes para la homeostasis, y las patologías que aquejan a este órgano (p. ej: carcinoma oral de células escamosas).

Para llevar a cabo la identificación de los CD34⁺ telocitos, utilizamos una línea murina transgénica (CD34-CreERT2^{+/-}; R26R tdTomato^{+/-}), que marca de manera eficiente a las células que expresan al marcador CD34 en la lengua. Mediante el uso de este modelo, corroboramos la presencia de células con características morfológicas propias de telocitos, que las distinguen de otros tipos celulares. El tener este modelo murino es un recurso invaluable, que permitirá evaluar diferentes hipótesis y escenarios, desde desarrollo, hasta en procesos de enfermedad. Por ejemplo, dado que evidencia reciente ha postulado la capacidad progenitora de los telocitos; el tener esta línea nos permitirá realizar estudios de rastreo de linaje celular, para evaluar el papel progenitor de los CD34⁺ telocitos en la lengua.

Para indagar más sobre el papel funcional de los telocitos linguales, utilizamos datos disponibles de secuenciación de célula única (*single cell-RNAseq*), que nos permitió identificar un pequeño grupo de células que expresan tanto a CD34, como a PDGFRA. Notablemente estas células, no expresan a otros marcadores reportados

como FoxL1 y Lgr5. Sumado esto, a los resultados del marcaje *in vivo*, decidimos renombrar a este grupo celular como células CD34⁺ estromales/telocitos. A pesar de los límites de nuestro análisis, los datos obtenidos nos permiten observaciones relevantes: Se identificó que estas células tienen un patrón de expresión que conserva similitudes con los CD34⁺ telocitos presentes en el intestino. Específicamente, se identificaron a Col1a1, Col1a2, Col3a2, Postn y Sparc entre los genes más expresados en ambos compartimentos. Este grupo de genes comparten funciones estructurales y matricelulares relacionadas a la remodelación extracelular de tejidos, función corroborada mediante nuestros análisis bioinformáticos(17). Asimismo, se ha identificado que las células CD34⁺ telocitos en el intestino están involucradas en fenómenos inflamatorios, lo que sugiere una conservación funcional de los telocitos en diferentes compartimentos a lo largo del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, las células estromales en la lámina propia del intestino se requieren para la maduración postnatal tanto de las células epiteliales como inmunitarias(11), lo que haría relevante indagar más sobre esta función en las mucosas bucales, incluida la lengua.

Posteriormente, nuestros análisis por GO (*Gene Ontology*) identificaron que los CD34⁺ telocitos linguales tienen una firma transcripcional o expresión genética, asociada a la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGFB). Esta es una vía de señalización evolutivamente conservada, que se involucra en procesos de desarrollo embrionario, así como en la homeostasis de órganos y tejidos del adulto. Específicamente, TGFB participa en procesos celulares de crecimiento, diferenciación, migración y apoptosis(19). Además, se ha identificado la relación de la vía a fenómenos como la transición epitelio-mesénquima(20). El mecanismo de acción de la vía de TGFB involucra la unión inicial a receptores tipo II (TGFBRII), para reclutar y transfosforilar a receptores tipo I (TGFBRI). Posterior a esta activación de los receptores, se fosforila a un grupo de proteínas intracelulares -principalmente de tipo SMAD-, de las cuales, algunas formarán complejos para traslocarse al núcleo y actuar como factores de transcripción de genes blanco(19).

Interesantemente, la vía de TGFB ha sido también relacionada con la actividad de los telocitos pulmonares y renales. En modelos *in vitro*, se ha observado que la proliferación de los telocitos pulmonares sucede por un mecanismo de comunicación cruzada con PI3K (Fosfatidilinositol-3-cinasa), en donde isoformas de PI3K participan concertadamente con el ligando TGFB1 para regular el ciclo celular de los telocitos(21). Por otra parte, se ha reportado que los telocitos tienen un rol protector contra fibrosis renal, mediado por la regulación de la vía de TGFB. En un modelo de obstrucción renal inducido en ratas, se observó que los telocitos pueden atenuar el daño, gracias a su capacidad para incrementar la secreción del factor de crecimiento hepático (HGF). El modelo propuesto, implica que HGF inhibe la función TGFB1, lo cual conlleva a la reducción en la fosforilación de Smad 1/3. En últimas cuentas esto inhibe la expresión de genes, como Snai1 y Zeb1, directamente asociados a fibrosis y a la transición epitelio-mesénquima(22). Nuestros análisis por enriquecimiento también predicen la asociación de los CD34⁺ telocitos linguales en la transición epitelio-mesénquimal, un fenómeno del cual se ha estudiado poco la participación de la lámina propia lingual, pero que tiene implicaciones muy relevantes para el estudio de condiciones como cicatrización/reparación de tejidos, y carcinoma oral de células escamosas.

El rol de los telocitos en el intestino, ha sido estudiado principalmente en relación con la regulación de la supervivencia de las células madre epiteliales, la promoción de su diferenciación, y el mantenimiento de su identidad. Análisis *in silico* paralelos al presente estudio, predicen que en la lengua también existe la comunicación entre el epitelio lingual y los CD34⁺ telocitos de la lámina propia. Encontramos que las células basales epiteliales se caracterizan por la expresión de PDGFA, el principal ligando de PDGFRA, el cual es un marcador expresado en los CD34⁺ telocitos linguales, tanto en ratón como en humano. (Este hallazgo es relevante, pues se sabe que las células madre epiteliales se encuentran la capa más basal del epitelio, en continua proliferación y diferenciación asimétrica, para renovar las capas más apicales de la mucosa lingual. Tomando en cuenta esto, y nuestros hallazgos

previos de las similitudes con los telocitos intestinales, nos llevó a indagar si podíamos detectar la secreción de los principales ligandos provenientes de telocitos, que regulan la homeostasis del epitelio intestinal. De una lista curada de genes, identificamos que Wnt5a, Sfrp1 y Bmp2 son los principales ligandos cuya expresión podíamos detectar expresados por parte de los CD34⁺ telocitos linguales. Específicamente, Wnt5a es un ligando de la vía no canónica de Wnt cuyo papel se ha asociado a la regulación, proliferación y diferenciación de las células madre en diferentes órganos y tejidos. Particularmente, en el intestino se ha observado que los telocitos ubicados en la unión de las vellosidades con la cripta intestinal, se caracteriza por la secreción enriquecida de este ligando(12). Por su parte Sfrp1, es un receptor señuelo, que funciona como modulador de Wnt, y cuya secreción está enriquecida, y determinada por los telocitos ubicados en la cripta intestinal, donde es importante se promueva la proliferación de las células madre epiteliales, para que al mismo tiempo, se prevenga su promiscua diferenciación(23). Es de notar que estudios han mostrado la capacidad de Sfrp1 para inhibir la proliferación de células madre cancerosas (*cancer-stem cells*), así como de sugerirse un papel como gen supresor de tumores(24). Por su parte Bmp2, es un ligando de la familia de las proteínas morfogenéticas óseas, cuya función está asociada a la diferenciación celular. En el intestino se ha observado que su secreción esta enriquecida a lo largo de las vellosidades intestinales como parte de los ligandos secretados, para el mantenimiento de la identidad celular(12). Nuestro estudio mostró, que además de los CD34⁺ telocitos, también los Cx3cr1⁺ macrófagos secretan a este ligando (dato no mostrado), sugiriendo la existencia de múltiples fuentes o funciones redundantes entre las células que forman parte de la lámina propia lingual.

Estos resultados dan la pauta sobre la relevancia de los CD34⁺ telocitos linguales, de igual para realizar una caracterización sobre su patrón de expresión genética, y si esta, se da de forma compartimentalizada y en gradiente, como en el caso de los telocitos intestinales.

Conclusión

Esta investigación muestra mediante evidencia *in vivo* e *in silico*, la existencia de células con características propias de telocitos presentes en la lengua del ratón, específicamente en la lámina propia y en el intersticio muscular. Además, se identifican similitudes con telocitos de otros sitios, lo que sugiere una conservación funcional. Finalmente firmas transcripcionales asociadas a procesos relevantes para la homeostasis, así como alteraciones y/o patologías que pueden aquejar a este órgano.

Bibliografía

1. Rosa I, Marini M, Manetti M. Telocytes: An Emerging Component of Stem Cell Niche Microenvironment. *J Histochem Cytochem.* 2021;69(12):795-818.
2. Popescu LM, Fausson-Pellegrini MS. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):729-40.
3. Kondo A, Kaestner KH. Emerging diverse roles of telocytes. *Development.* 2019;146(14).
4. Cretoiu SM. Telocytes and Other Interstitial Cells: From Structure to Function. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10).
5. Rosa I, Taverna C, Novelli L, Marini M, Ibba-Manneschi L, Manetti M. Telocytes constitute a widespread interstitial meshwork in the lamina propria and underlying striated muscle of human tongue. *Sci Rep.* 2019;9(1):5858.
6. Zhao J, Birjandi AA, Ahmed M, Redhead Y, Olea JV, Sharpe P. Telocytes regulate macrophages in periodontal disease. *Elife.* 2022;11.
7. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia MP, Gonzalez-Gomez M, Carrasco JL, Alvarez-Arguelles H, et al. Telocytes/CD34+ Stromal Cells in Pathologically Affected White Adipose Tissue. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24).
8. Ceafalan L, Gherghiceanu M, Popescu LM, Simionescu O. Telocytes in human skin--are they involved in skin regeneration? *J Cell Mol Med.* 2012;16(7):1405-20.
9. Qi G, Lin M, Xu M, Manole CG, Wang X, Zhu T. Telocytes in the human kidney cortex. *J Cell Mol Med.* 2012;16(12):3116-22.
10. Cretoiu D, Gherghiceanu M, Hummel E, Zimmermann H, Simionescu O, Popescu LM. FIB-SEM tomography of human skin telocytes and their extracellular vesicles. *J Cell Mol Med.* 2015;19(4):714-22.
11. Stzepourginski I, Nigro G, Jacob JM, Dulauroy S, Sansonetti PJ, Eberl G, et al. CD34+ mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(4):E506-E13.
12. McCarthy N, Manieri E, Storm EE, Saadatpour A, Luoma AM, Kapoor VN, et al. Distinct Mesenchymal Cell Populations Generate the Essential Intestinal BMP Signaling Gradient. *Cell Stem Cell.* 2020;26(3):391-402 e5.
13. Kaestner KH. The Intestinal Stem Cell Niche: A Central Role for Foxl1-Expressing Subepithelial Telocytes. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;8(1):111-7.
14. Lyras EM, Zimmermann K, Wagner LK, Dorr D, Klose CSN, Fischer C, et al. Tongue immune compartment analysis reveals spatial macrophage heterogeneity. *Elife.* 2022;11.
15. Jiang L, Chen T, Sun S, Wang R, Deng J, Lyu L, et al. Nonbone Marrow CD34(+) Cells Are Crucial for Endothelial Repair of Injured Artery. *Circ Res.* 2021;129(8):e146-e65.

16. Aran D, Looney AP, Liu L, Wu E, Fong V, Hsu A, et al. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. *Nat Immunol.* 2019;20(2):163-72.
17. Jacob JM, Di Carlo SE, Stzepourginski I, Lepelletier A, Ndiaye PD, Varet H, et al. PDGFRalpha-induced stromal maturation is required to restrain postnatal intestinal epithelial stemness and promote defense mechanisms. *Cell Stem Cell.* 2022;29(5):856-68 e5.
18. McCarthy N, Kraiczy J, Shivdasani RA. Cellular and molecular architecture of the intestinal stem cell niche. *Nat Cell Biol.* 2020;22(9):1033-41.
19. Massague J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(10):616-30.
20. French R, Feng Y, Pauklin S. Targeting TGFbeta Signalling in Cancer: Toward Context-Specific Strategies. *Trends Cancer.* 2020;6(7):538-40.
21. Song D, Tang L, Huang J, Wang L, Zeng T, Wang X. Roles of transforming growth factor-beta and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in integrin beta1-mediated bio-behaviors of mouse lung telocytes. *J Transl Med.* 2019;17(1):431.
22. Zheng L, Li L, Qi G, Hu M, Hu C, Wang S, et al. Transplantation of Telocytes Attenuates Unilateral Ureter Obstruction-Induced Renal Fibrosis in Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(5):2056-71.
23. Bahar Halpern K, Massalha H, Zwick RK, Moor AE, Castillo-Azofeifa D, Rozenberg M, et al. Lgr5+ telocytes are a signaling source at the intestinal villus tip. *Nat Commun.* 2020;11(1):1936.
24. Sunkara RR, Sarate RM, Setia P, Shah S, Gupta S, Chaturvedi P, et al. SFRP1 in Skin Tumor Initiation and Cancer Stem Cell Regulation with Potential Implications in Epithelial Cancers. *Stem Cell Reports.* 2020;14(2):271-84.