

Puesta a punto del proceso de expansión de células derivadas de tejidos dentales.-

Setting up of the process of expansion of dental tissue derived cells.-

Facultad de Odontología UNLP. Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular. Instituto Tecnológico de Chascomús, INTECH (CONICET/UNSAM).

Calle 50 e/ Av. 1 y 115 La Plata (1900). Bs. As. Argentina.

Sin conflicto de interés

- Merino, Graciela; Dewey, Ricardo; Mayocchi, Karina; Blasetti, Nahuel; Basal, Roxana; Butler, Teresa; Paggi, Ricardo; Dorati, Pablo; Micinquevich, Susana.-

RESUMEN

La presencia de células madre (CM) en tejidos dentales abrió nuevas líneas de investigación en el área de la odontología regenerativa. Los objetivos de este trabajo fueron poner a punto el método de obtención, aislamiento y expansión de CM derivadas de tejidos dentales y caracterizarlas. Se utilizaron terceros molares cuyas pulpas y saco periodontal se procesaron de la siguiente manera: 1) digestión enzimática; 2) obtención de explantes. En ambos casos, se cultivaron en DMEM suplementado. Las células fueron caracterizadas en el estadio P2 (pasaje 2) mediante el estudio de marcadores de superficie específicos de CM (CD73, CD90 y CD105) por citometría de flujo, obteniéndose porcentajes similares en ambos tratamientos: CD73 99.2%; CD90 85.5% y CD105 62.01%. Previo al procesamiento, se observó morfológicamente la pulpa dental mediante MET, destacándose la presencia de células de morfología variable, con signos que indican una intensa actividad metabólica. Se evidencian mitocondrias en todas las células, gran cantidad de vesículas y gránulos de secreción. Las células cultivadas fueron analizadas mediante microscopía con contraste de fases, y se observó la formación de numerosas colonias de células fusiformes y estrelladas, formando agregados en forma irradiada, paralelas unas a otras. Para el tratamiento 1, se alcanzó confluencia celular luego de 21 días de cultivo. En cambio para el tratamiento 2 el crecimiento fue más rápido y se alcanzó el estado de semiconfluencia a los 14 días. Con estos resultados preliminares podemos concluir que el explante es el mejor método para obtener CM mesenquimales derivadas de los tejidos dentales, ya que se obtiene mayor número de células en menor tiempo, lo que es coincidente con la bibliografía publicada al respecto. Además, la morfología celular es un buen indicador de calidad y desarrollo del cultivo, pudiendo utilizarse como control de calidad biológico en este tipo de procedimientos.

Palabras clave: Cultivo - Pulpa - Morfología -

SUMMARY

The presence of stem cells in dental tissues opened new lines of research in the regenerative dentistry area. The objectives of this work were to develop and characterize a method for obtaining, isolating and expanding dental tissues derived stem cells. Third molars were used, which pulps and periodontal sac were processed using one of these two methods: 1) enzymatic digestion 2) explants. In both cases, the obtained cells were cultured in supplemented DMEM. The cells were characterized in stage P2 (passage 2) by studying specific surface markers of stem cells (CD73, CD90 and CD105) by flow cytometry, obtaining similar percentages in both treatments: CD73 99.2%; CD90 85.5% and CD105 62.01%. Prior to processing, dental pulp was morphologically analyzed by MET, highlighting the presence of cells with variable morphology, with signs indicating intense metabolic activity. Mitochondria, large amount of vesicles and secretion granules are evidenced in all cells. Cultured cells were analyzed through contrast phase microscopy, the formation of numerous spindle and stellate cells colonies were observed, forming aggregates in irradiated form, parallel to one another. For treatment 1, cell confluence was reached after 21 days of culture. On the other hand, for treatment 2, the growth was faster and the state of semi confluence was reached after 14 days. With these preliminary results we can conclude that the explant is the best method to obtain stem cells derived from dental tissues, since a greater number of cells is obtained in less time, which coincides with the published literature. In addition, cell morphology is a good indicator of culture quality and development, and can be used as a biological quality control in this type of procedure.

Key words: Culture - Pulp - Morphology -

Introducción

En los últimos años se ha descubierto la presencia de células madre en los tejidos dentales (pulpa, saco, ligamento periodontal), lo que abrió nuevas líneas de investigación en el área de la odontología regenerativa. Los mecanismos naturales de regeneración y reparación de tejidos que el cuerpo posee para enfrentar algún daño tisular a consecuencia de trauma o enfermedad, necesitan de 3 factores:

- 1- Factores estimulantes o de crecimiento, que normalmente son secretados por las células propias del tejido dañado;
- 2- Una matriz o andamiaje sobre la que el tejido pueda crecer;
- 3- Células con capacidad de multiplicarse y diferenciarse a distintas poblaciones según el tejido a reparar.

Las células madre (CM) son células que cumplen con esta última característica, además de que liberan factores de crecimiento y citoquinas que favorecen la regeneración tisular.⁽¹⁾Hasta el momento, estas células han sido caracterizadas mediante técnicas de microscopía como inmunohistoquímica, microscopía de fluorescencia, y mediante la determinación de marcadores de superficie por citometría de flujo,⁽²⁾pero nunca se han caracterizado morfológicamente mediante técnicas de microscopía de barrido o de transmisión.

Objetivos

- Poner a punto el método de obtención, aislamiento y expansión de células madre derivadas de tejidos dentales y caracterizarlas mediante marcadores de superficie específicos y técnicas morfológicas y morfométricas.

Materiales y Métodos

Se utilizaron terceros molares obtenidos en el Hospital Universitario con el consentimiento del paciente y aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la UNLP. Las piezas fueron procesadas en el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Odontología de la UNLP. Se ensayaron distintos métodos de obtención y aislamiento de células derivadas tanto de pulpa, saco y ligamento periodontal: 1.- digestión enzimática con colagenasa y cultivo de la suspensión celular obtenida en placas de Petri de 9 cm²; 2.- obtención de explantes de 1mm² a partir de los tejidos y cultivo en placas de Petri de 9 cm². En ambos casos, el cultivo se realizó en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% a 37°C y 5%CO₂ (p0). Al alcanzar una confluencia de 80%, las células fueron repicadas a botellas de cultivo de 25 cm² (p1) y cultivadas durante 10 días más hasta alcanzar nuevamente 80 % de confluencia. En este estadio las células fueron caracterizadas mediante el estudio de marcadores de superficie específicos de células madre CD73, CD90 y CD105 mediante citometría de flujo. La pulpa extirpada, previo al procesamiento, se estudió morfológicamente mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). En cada paso del cultivo celular se realizaron controles morfológicos mediante microscopio invertido con contraste de fases.

Resultados

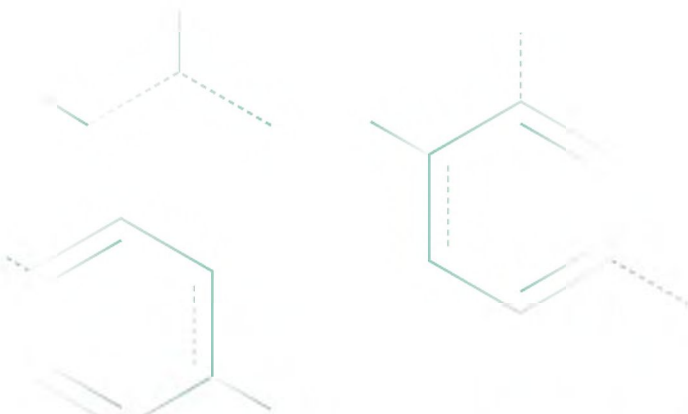
Mediante MET del tejido previo al procesamiento, se observó la presencia de células fusiformes, y otras de morfología variable, con gran cantidad de organelos bien desarrollados sobre una matriz con fibras colágenas agrupadas en haces, que a veces conforman una red y otras veces se disponen en la zona basal de las células más fusiformes. Los núcleos contienen de dos a tres nucléolos y la cromatina se encuentra condensada. Los RER y Golgi muy desarrollados. Se evidencia la presencia de mitocondrias en todas las células y gran cantidad de vesículas y gránulos de secreción (Fig. 1, 2 y 3). En cultivo se observaron la formación de numerosas colonias, de células fusiformes y estrelladas, formando agregados en forma irradiada, paralelas unas a otras. En todos los casos, las células cercanas a los agregados mostraron cambios morfológicos sugerentes de diferenciación (Fig. 4, 5 y 6). La caracterización fenotípica de las células mediante citometría de flujo para los marcadores CD73, CD90 y CD105, tanto de los cultivos de las células pulpares como de las células derivadas de saco, resultados similares, todas positivas para los 3 marcadores (Fig.7).

Discusión

Si bien por lo general los cultivos primarios se obtienen a partir de células disgregadas de los tejidos mediante métodos enzimáticos, existen evidencias que indican que la calidad de las células obtenidas se ve disminuida debido a la actividad enzimática.(6-7) Es por eso que se han buscado alternativas, como el método de explantes, sobre todo en los casos en los que el material de partida posee muy baja concentración de las células de interés.(6-7) Es importante también establecer métodos de control rápidos y poco costosos que nos permitan identificar a las células cultivadas, como por ejemplo la microscopía con contraste de fases.

Conclusiones

Con estos resultados preliminares podemos concluir que el mejor método para obtener células madre mesenquimales derivadas de los tejidos dentales es el del explante, ya que obtiene mayor número de células en menos tiempo, lo que es coincidente con la bibliografía publicada al respecto. Además la morfología celular es un buen indicador de la calidad y desarrollo del cultivo y puede usarse como un control de calidad biológico de rutina en este tipo de procesos.



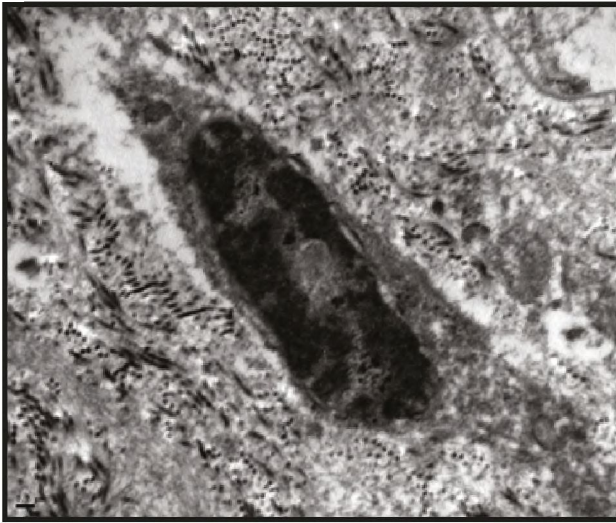


Figura 1.

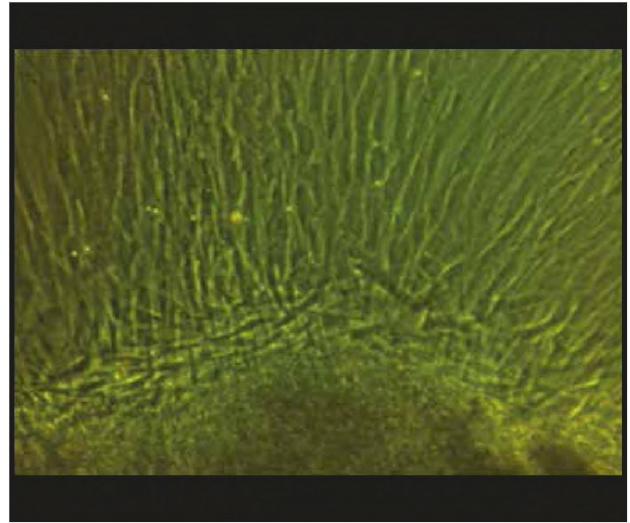


Figura 4.

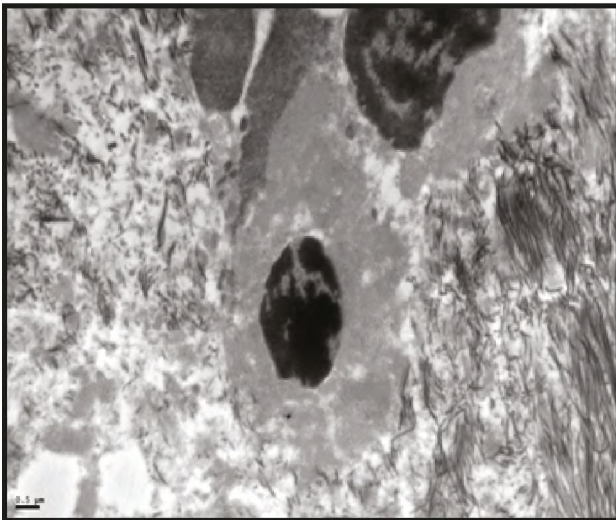


Figura 2.

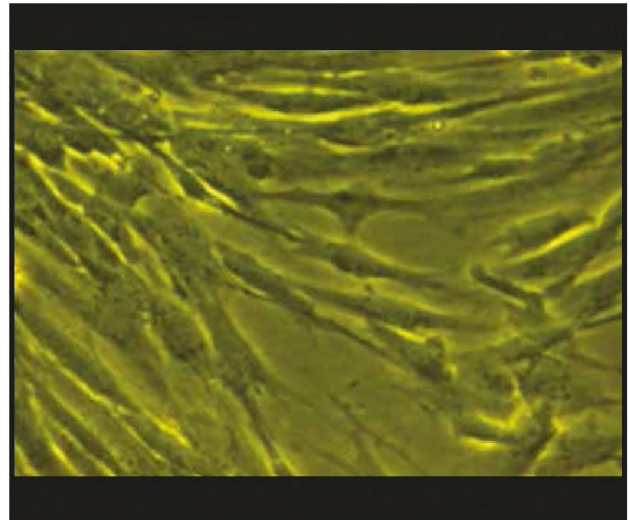


Figura 5.

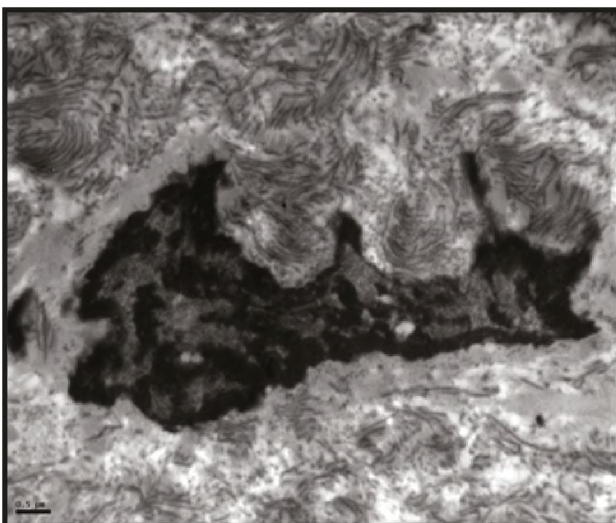


Figura 3.

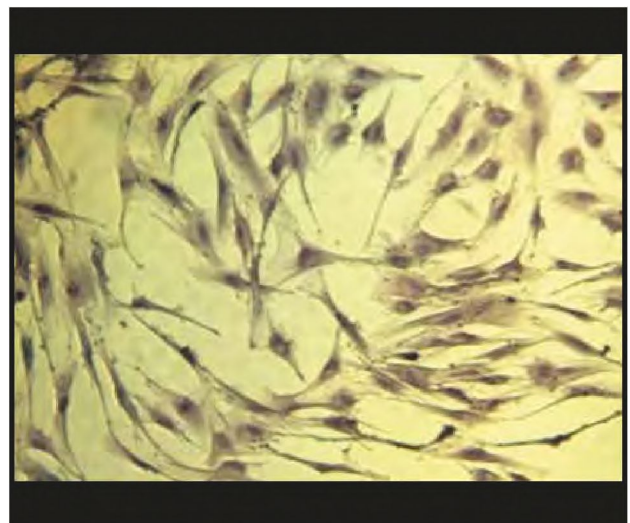


Figura 6.

* Para la digestión enzimática se alcanzó confluencia luego de 21 días de cultivo. Para el explante el crecimiento fue más rápido y se alcanzó el estado de semiconfluencia a los 14 días.

Referencias Bibliográficas

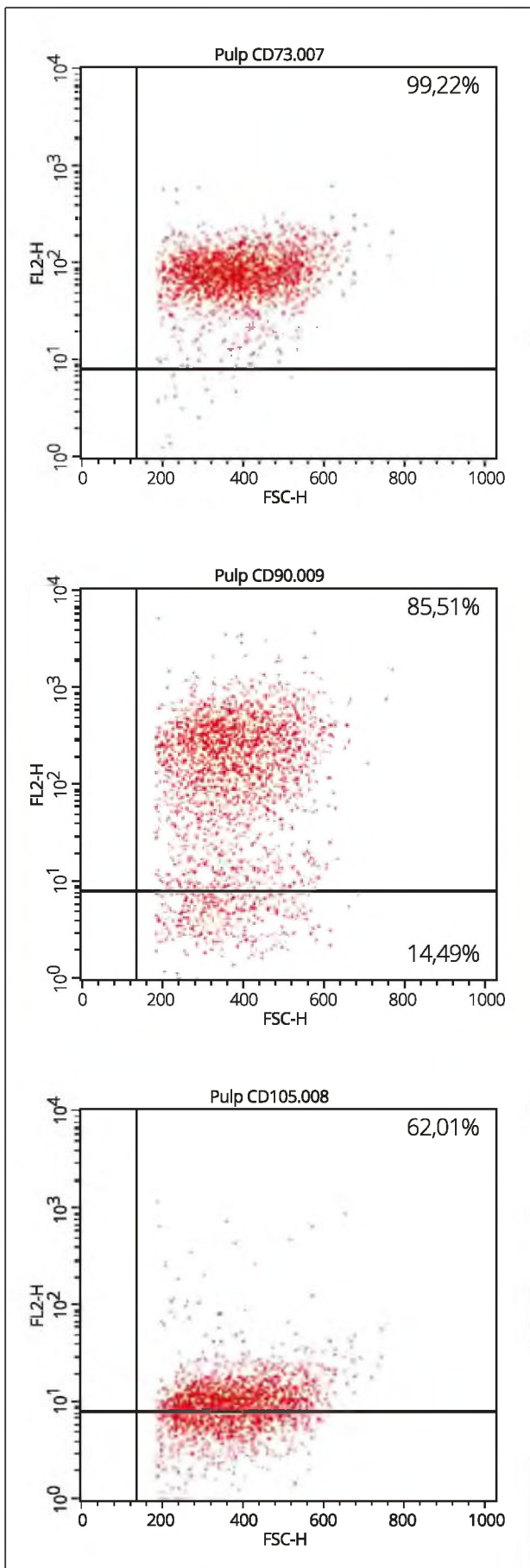


Figura 7. Caracterización fenotípica de las células mediante citometría de flujo.

- Huang J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: Their Biology and regenerative medicine. *Journal of Dental Research* [Internet]. 2009 [citado 22 Mar 2011];88(9)
- Magallanes Fabián M, Carmona Rodríguez B. Aislamiento y caracterización parcial de células madres de pulpa dental. *Rev Odontol Mexicana* [Internet]. 2010 [citado 22 Mar 2011];14(1)
- Aldana D, Gojanovich, María C, Giménez, Diego Masone, Tania Rodríguez, Ricardo A. Dewey, Laura R. Delgui, Diego M. Bustos, Marina Uhart. (2018) Human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cell handling protocols. Lipid droplets and protein double-staining. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 6:33. doi: 10.3389/fcell.2018.00033.
- M.L. Gimeno, F. Fuertes, A.E. Barcala Tabarozzi, A.I. Attorressi, R. Cucchiani, L. Corrales, T.C. Oliveira, M.C. Sogayar, L. Labriola, Ricardo A. Dewey, M. J. Perone. (2017) Pluripotent non-tumorigenic adipose tissue-derived Muse cells have immunomodulatory capacity mediated by TGF- β 1. *Stem Cells Translational Medicine*; 6:161–173.
- TM Rodríguez, A. Saldías, M. Irigo, J. Velasco Zamora, M.J. Perone, Ricardo A. Dewey. (2015) Effect of TGF- β 1 stimulation on the secretome of human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Translational Medicine*. 4(8): 894–898.
- J. Robert Smith et al. Standardizing Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cell for Translation to Clinical Use: Selection of GMP-Compliant Medium and a Simplified Isolation Method. *Stem Cells International* Volume 2016, Article ID 6810980, 14 page.
- Rouzbeh R. Taghizadeh et al. Collagenase Impacts the Quantity and Quality of Native Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived during Processing of Umbilical Cord Tissue. *Cell Transplantation* 2018, Vol. 27(1) 181–193.

