

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR ENDOTELIAL CD146 EN CÉLULAS
MADRE DE PULPA DENTAL *IN VITRO*.

Por

JESSICA PAOLA DUSSAUGE AGUILAR

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría.

Agosto, 2020

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría.

IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR ENDOTELIAL CD146 EN CÉLULAS
MADRE DE PULPA DENTAL *IN VITRO*.

Comité de Académico

DRA. MARCELA MONTES VILLARREAL

Presidente

DR. GUILLERMO CRUZ PALMA

Secretario

DR. JAIME ADRIÁN MENDOZA TIJERINA

Vocal

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría.

IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR ENDOTELIAL CD146 EN CÉLULAS
MADRE DE PULPA DENTAL *IN VITRO*.

JESSICA PAOLA DUSSAUGE AGUILAR

Tesista

Comité de Tesis

DR. GUILLERMO CRUZ PALMA

Director de tesis

DR. CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA

Co - Director

DRA. EYRA ELVYRA RANGELPADILLA

Asesor metodológico

DRA. MARCELA ALEJANDRA GLORIA GARZA

Asesor metodológico

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al **Dr. Guillermo Cruz Palma** Director de mi tesis. Así como al **Dr. Casiano Del Angel Mosqueda**, por su colaboración e interés como Co-Director, por sus valiosas sugerencias y asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento aprobado para el proyecto de Investigación Básica SEP-CONACYT A1-S-31196.

Al laboratorio de Biología celular de la Facultad de Odontología.

A mi familia por el apoyo moral que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
Contenido	
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVOS	14
Objetivos Generales.....	14
Objetivos específicos.....	14
4. ANTECEDENTES	15
4.1 Células madre mesenquimales (MSCs).....	15
4.2 Células madre de origen dental.....	17
4.2.1 Células madre de pulpa dental (DPSCs).....	19
4.2.2 Células madre derivadas de dientes deciduos (SHED)	19
4.2.3 Células madre de papila apical (SCAPs).....	20
4.2.4 Células madre gingivales (GSC)	20
4.2.5 Células madre de ligamento periodontal (PDLSCs).....	20
4.3 Células madre pulpa dental (DPSCs).....	21
4.4 CD146.....	23
5. MÉTODOS	25
5.1 Selección de pacientes	25
5.2 Extracción de piezas dentales	26
5.3 Obtención de pulpa dental.....	26
5.4 Disgregación de pulpa dental.....	27
5.5 Cultivo celular y microscopia de contraste de fases	27
5.6 Inmunocitoquímica de CD146 en DPSCs.....	28
6. RESULTADOS.....	29
Cultivo y análisis morfológico de DPSCs.....	29
Expresión de CD146 en DPSCs	30
7. DISCUSIÓN.....	31

8. CONCLUSIONES.....	33
9. LITERATURA CITADA.....	34
10. RESUMEN BIOGRÁFICO	39

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
<i>Figura 1 Células madre de origen dental</i>	18
<i>Figura 2 Microcentrífuga MiniSpin Y balanza analítica</i>	27
<i>Figura 3 Incubadora de CO2</i>	28
<i>Figura 4 Microscopio de fluorescencia</i>	28
<i>Figura 6 Crecimiento de agrupaciones y morfología celular posterior a 96 horas de cultivo</i>	29
<i>Figura 5 Crecimiento de agrupaciones y morfología celular posterior a 48 horas de cultivo</i>	29
<i>Figura 8 Grupo control sin señal de fluorescencia</i>	30
<i>Figura 7 Grupo CD146, donde se observa una expresión positiva de la proteína por inmunofluorescencia</i>	30

NOMENCLATURA

MSCs: Células madre mesenquimales

HSCs: Células madre hematopoyéticas

DPSCs: Células madre de pulpa dental

SHED: Células madre derivadas de dientes deciduos

μm: Micrómetro

Rpm: Revoluciones por minuto

DIx5: Homeobox 5 menor distal

DMEM-F12: Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12

DMSO: Dimetilsulfóxido

Nm: Nanómetros

CLSM: Microscopía de barrido láser confocal

TIRFM: Microscopía de fluorescencia de reflexión interna total

DFPC: Células progenitoras del folículo dentario

ABMSC: Células estromales de la médula ósea alveolar

TGPC: Células progenitoras de gérmenes dentales

GMSC: Células madre mesenquimales gingivales

PDL: Células madre del ligamento periodontal

SCAPs: Células madre de la papila apical

Células ME: Células madre embrionarias

Células IPS: Células madre pluripotentes inducidas

TESISTA: JESSICA PAOLA DUSSAUGE AGUILAR
DIRECTOR DE TESIS: GUILLERMO CRUZ PALMA
CO - DIRECTOR DE TESIS: CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR ENDOTELIAL CD146 EN CÉLULAS
MADRE DE PULPA DENTAL *IN VITRO*.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Se ha informado de la existencia de células madre adultas en varios tejidos. El aislamiento de células madre humanas de alta calidad que pueden utilizarse para la regeneración de enfermedades mortales a partir de recursos accesibles, es un avance importante en la investigación con células madre. Estas células se utilizan para tratar numerosos trastornos genéticos y degenerativos. La ingeniería de tejidos basada en células madre se ha realizado en el modelo animal para muchos tipos de regeneración de tejidos, como cartílago articular, hueso, tendón, tejido muscular y adiposo. Sin embargo, es importante identificar diferentes tipos de subpoblaciones de células madre de pulpa dental (DPSCs). **OBJETIVO:** El propósito de este estudio fue identificar el marcador endotelial CD146 en DPSCs. **MÉTODOS:** Se cultivaron las DPSCs por medio de disociación enzimática y se realizó el análisis morfológico utilizando microscopia de contraste de fases, para identificar mediante microscopia de fluorescencia la expresión del marcador endotelial CD146. **RESULTADOS:** Se obtuvo una población de DPSCs con morfología típica fibroblástica alargada en forma de huso, además estas células tuvieron una expresión positiva del marcador CD146 respecto al control negativo. **CONCLUSIÓN:** La expresión del marcador CD146 sugiere su relación a nivel tisular con linajes endoteliales por lo tanto esta subpoblación podría ser utilizada en ingeniería de tejidos debido a su potencialidad.

PALABRAS CLAVE: células madre de pulpa dental, CD146, cultivo celular, microscopia de fluorescencia, ingeniería de tejidos

TESISTA: JESSICA PAOLA DUSSAUGE AGUILAR
DIRECTOR DE TESIS: GUILLERMO CRUZ PALMA
CO - DIRECTOR DE TESIS: CASIANO DEL ANGEL MOSQUEDA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR ENDOTELIAL CD146 EN CÉLULAS
MADRE DE PULPA DENTAL *IN VITRO*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The existence of adult stem cells has been reported in various tissues. The isolation of high-quality human stem cells that can be used for the regeneration of deadly diseases from accessible resources is an important advance in stem cell (MSCs) research. These cells are used to treat numerous genetic and degenerative disorders. Stem cell-based tissue engineering has been performed in the animal model for many types of tissue regeneration, such as articular cartilage, bone, tendon, muscle and adipose tissue. However, it is important to identify different types of dental pulp stem cells (DPSCs) subpopulations. **OBJECTIVE:** The purpose of this study was to identify the endothelial marker CD146 in DPSCs. **METHODS:** DPSCs were cultivated by means of enzymatic dissociation and morphological analysis was performed using phase contrast microscopy, to identify by fluorescence microscopy the expression of the endothelial marker CD146. **RESULTS:** A population of DPSCs with typical elongated spindle-shaped fibroblast morphology was obtained. Furthermore, these cells had a positive expression of the CD146 marker compared to the negative control. **CONCLUSION:** The expression of the CD146 marker suggests its relationship at the tissue level with endothelial lineages, therefore this subpopulation could be used in tissue engineering due to its potentiality.

KEY WORDS: dental pulp stem cells, CD146, cell cultive, fluorescence microscopy, tissue engineering

1. INTRODUCCIÓN

Se ha informado de la existencia de células madre adultas en varios tejidos. El aislamiento de células madre humanas de alta calidad que pueden utilizarse para la regeneración de enfermedades mortales a partir de recursos accesibles es un avance importante en la investigación con células madre (MSCs) (1). La investigación básica y clínica realizada durante los últimos años sobre células madre embrionarias, fetales, amnióticas, de cordón umbilical y de células madre adultas ha constituido una revolución en la medicina regenerativa y las terapias contra el cáncer al brindar la posibilidad de generar múltiples tipos de células terapéuticamente útiles. Estas nuevas células podrían usarse para tratar numerosos trastornos genéticos y degenerativos (2). La ingeniería de tejidos basada en células madre se ha realizado en el modelo animal para muchos tipos de regeneración de tejidos, como cartílago articular, hueso, tendón, tejido muscular y adiposo (3). Sin embargo, se desconoce si existe una sobreexpresión del marcador endotelial CD146 en células madre de pulpa dental (DPSCs). El propósito de este estudio fue evaluar la expresión de dicho marcador cultivadas in vitro. Los resultados proporcionan evidencia de que Es posible cultivar DPSCs de terceros molares utilizando un protocolo correcto de disociación enzimática. Las DPSCs exhiben morfologías fibroblásticas alargadas típicas de MSCs. La expresión positiva del marcador CD146 sugiere su relación a nivel tisular con linajes endoteliales lo que podría impactar sobre su potencialidad.

2. HIPÓTESIS

Existe una expresión positiva del marcador endotelial CD146 en DPSCs *in vitro*.

3. OBJETIVOS

Objetivos Generales

Identificar el marcador endotelial CD146 en DPSCs *in vitro*.

Objetivos específicos

- Cultivar una población de DPSCs utilizando disociación enzimática.
- Analizar la morfología de las DPSCs cultivadas utilizando microscopia de contraste de fases.
- Determinar la expresión del marcador endotelial CD146 utilizando microscopia de fluorescencia.

4. ANTECEDENTES

4.1 Células madre mesenquimales (MSCs)

En la actualidad, se están investigando varios tipos de células madre como las células madre embrionarias, fetales o gestacionales, mesenquimales y pluripotentes inducidas para su aplicación clínica. La ingeniería de tejidos ayuda a configurar las células madre para que se desarrollen en un tejido viable deseado, para usarlas clínicamente como sustituto del método convencional. La ingeniería de tejidos también se utiliza en la modulación del sistema inmunológico mediante el uso de células madre mesenquimales (MSC) específicas del paciente y modificando las características físicas de los andamios que pueden provocar el sistema inmunológico (44).

Las MSCs son células adultas multipotentes con propiedades inmunomoduladoras y regenerativas y, dado su potencial terapéutico, están siendo ampliamente estudiadas para evaluar su viabilidad, seguridad y eficacia celular (4).

Después de que Friedenstein et al., identifica a las MSCs en la médula ósea, se abre el camino hacia una etapa de medicina regenerativa y se enfoca el uso de estas células como medio terapéutico, incluso con ventajas como la falta de formación de tejido fibroso, bajo riesgo de rechazo autoinmune y la transmisión de la enfermedad. La principal función de estas células es servir como reemplazo para una homeostasia y como reemplazo celular cuando sea necesario (5).

En el pasado reciente, la investigación en el desarrollo de aplicaciones clínicas para las CMM ha aumentado significativamente. Las MSCs exhiben una proliferación de potencial múltiple y son capaces de diferenciarse en cartílago, hueso, células neuronales

y adipocitos, etc. Las vías de señalización, los factores de transcripción y los factores de crecimiento modulan la diferenciación de las MSCs en diferentes linajes celulares. Además, los factores físicos pueden regular la diferenciación molecular de las células madre (43).

La fuente de MSCs mejor estudiada y accesible es la médula ósea adulta. A diferencia de las células madre hematopoyéticas (HSCs), las MSCs carecen de un antígeno de superficie único para la selección positiva. La identificación de MSCs se basa en las propiedades de diferenciación y en un amplio panel de anticuerpos monoclonales, que incluyen marcadores específicos de diferenciación y linaje, receptores de factores de crecimiento y moléculas de adhesión (6).

Se han aislado (MSCs) de una variedad de tejidos usando diferentes métodos. La investigación activa ha confirmado que el sitio más accesible para recolectarlos es el tejido adiposo; que tiene una concentración significativamente mayor de MSCs. Además; la recolección del tejido adiposo es menos invasiva; no existen limitaciones éticas y un menor riesgo de complicaciones graves (34).

Al analizar la diferenciación de las células madre, es fundamental considerar la influencia de su tejido de origen. Las MSCs se aíslan ahora de forma rutinaria de la médula ósea de muchos organismos modelo de mamíferos, así como de otros tejidos de origen mesodérmico, como el tejido adiposo, muscular, óseo y tendinoso. Recientemente, también se han aislado células multipotentes de muchos otros tipos de tejidos de origen no mesodérmico (28).

El Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular propone criterios mínimos para definir la MSCs humana:

- adherencia al plástico

- potencial de diferenciación (linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos)
- expresión de antígenos de superficie específicos (expresar CD105, CD73 y CD90, y carece de expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, Moléculas de superficie CD79alpha o CD19 y HLA-DR) (31).

Hay muchos tipos de células madre, incluidas las células madre pluripotentes y las células madre adultas. Se cree que las células madre pluripotentes, como las células madre embrionarias (células ME) y las células madre pluripotentes inducidas (células iPS), son herramientas emergentes en la medicina regenerativa, pero existen muchos problemas, incluidas preocupaciones éticas y de seguridad, que deben superarse antes uso clínico (39).

Un nicho de células madre se define no solo por la presencia de tejido de células madre, sino también por la caracterización de las células de soporte somáticas, que secretan factores esenciales para el mantenimiento de la pluripotencia en las células madre residentes (34).

4.2 Células madre de origen dental

Inicialmente, estas células fueron aisladas por Gronthos y cols. en el 2000 (7). Se ha reportado estudios en donde sugieren las células madre mesenquimatosas de la médula ósea como tratamiento en donde exista pérdida de tejido periodontal, ya que se piensa que estas células tienen la capacidad de regenerar el tejido perdido, ya sea en pacientes con enfermedad periodontal o en defectos en donde exista pérdida de las estructuras que comprenden el periodonto (8).

La región orofacial también ganó mucho interés como fuente potencial de MSCs. Hasta la fecha, se han obtenido ocho poblaciones distintas de MSCs de origen dental, células progenitoras del folículo dentario (DFPCs) , células estromales de la

médula ósea alveolar (ABMSCs) células progenitoras de gérmenes dentales (TGPCs), células madre mesenquimales gingivales (GMSCs) (35), DPSCs, células madre de piezas deciduas (SHED), células madre del ligamento periodontal (PDL), células madre de la papila apical (SCAPs) y células madre gingivales (9), además, se han aislado células madre / progenitoras de tejidos dentales enfermos como pulpa inflamada y quistes periapicales (10), así como para la regulación sistémica de la inflamación excesiva en trastornos inmunitarios, como enfermedades autoinmunes e hipersensibilidad (22).

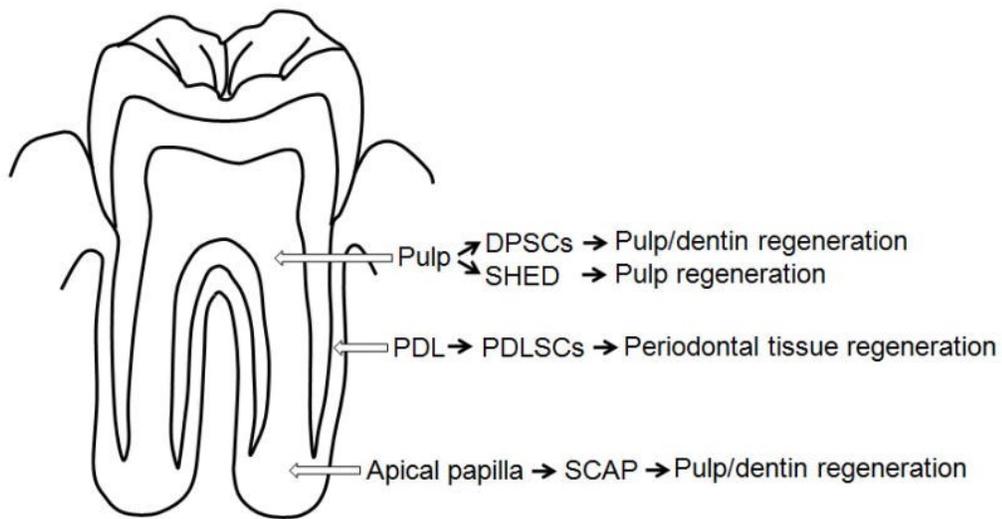


Figura 1 Células madre de origen dental

Estos diferentes tipos de células madre dentales parecen ser buenas fuentes de células para regenerar los tejidos dentales (23).

Los tejidos dentales, una nueva fuente de células madre, proporcionan células que tienen características de MSCs, como estructura similar a un fibroblasto, expresión de antígenos de superficie específicos para MSCs, capacidad de regeneración, capacidad de diferenciación multilineaje y características inmunomoduladoras. Las células madre dentales expresan marcadores de células madre mesenquimales como Stro-1, CD146, CD106, CD90, CD73 CD29 y CD13. Sin embargo, no expresan marcadores de células madre hematopoyéticas como CD11b, CD45 y CD34 (26).

Estas células son capaces de diferenciarse en células multilinaje, que han sido descubiertas contra células como los linfocitos T y B, al igual que células dendríticas. Al suprimir células T, B, NK y células presentadoras de antígeno, logra pasar inadvertida para el sistema inmune, y modula efectos tanto inmunes como antiinflamatorios (5).

El cultivo celular es una técnica estándar de oro utilizada para expandir células (incluidas las células madre) antes de los experimentos in vitro o del uso in vivo. Sin embargo, la literatura es controvertida con relación a si las condiciones de cultivo podrían afectar el fenotipo las células (35).

4.2.1 Células madre de pulpa dental (DPSCs)

Son células multipotenciales con propiedades inmunosupresivas. Su característica principal es su potencial en diferenciarse en un linaje odontoblástico y condrogénico (7). Poseen la capacidad de plasticidad, es decir, tomar la forma de cualquier linaje celular debido a componentes locales del entorno, como son los factores de crecimiento, receptores y señalizadores de moléculas, factores de transcripción y la matriz de proteína extracelular. Sanz *et al*, menciona cómo estas células pueden originarse del neuroectodermo. Esto explica su potencial para la terapia de células madre neurales. En el 2015, se realizó un estudio en donde se colocaron estas células en el cerebro de ratas con daño cortical, se observó como estas migraron hacia las regiones dañadas, expresando marcadores específicos (5).

4.2.2 Células madre derivadas de dientes deciduos (SHED)

Estas células tienen la capacidad de inducir formación ósea y generar dentina. Tienen mayor tasa de proliferación comparado con las DPSCs y la capacidad de diferenciarse en células neurales, osteoblastos, condrocitos, adipocitos y miocitos. Pueden diferenciarse en odontoblastos capaces de generar dentina tubular y tejido parecido a dentina, sin embargo, no pueden generar el complejo dentinopulpar (5).

4.2.3 Células madre de papila apical (SCAPs)

Las SCAPs se refiere a los tejidos blandos en los ápices de piezas permanentes en desarrollo. Estas representan un precursor para la pulpa radicular a diferencia de las DPSCs. Pueden inducir formación de la raíz y poseen la capacidad de diferenciarse en célula osteogénica/dentinogénica, neurogénica y adipogénica (5).

4.2.4 Células madre gingivales (GSC)

Poseen capacidad inmunomoduladora y de diferenciación en linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico (5).

4.2.5 Células madre de ligamento periodontal (PDLSCs)

Las células madre de ligamento periodontal es una rama de MSCs que se encuentran localizadas en el espacio perivascular (42). Además de poseer capacidad osteogénica y condrogénica, tiene la propiedad de diferenciarse en adipocitos (7). Posee propiedades similares a MSCs, como los marcadores de superficie: CD105, CD90 y CD73. No posee el HLA-II a comparación de las células madre mesenquimales y esto le provee baja inmunogenicidad (42).

El LPO tiene células que pueden diferenciarse en células formadoras de cemento, hueso y colágeno. Se sospecha de su potencial en regenerar tejido tipo cemento/ligamento periodontal, ya que tienen la capacidad de diferenciarse *in vivo* en cementoblastos y formar fibras de colágeno en tejido como cemento. Se piensa que estas células pueden participar en la regeneración del hueso alveolar (5).

El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) es uno de los factores de crecimiento más comunes que se utilizan para expandir las células madre, incluidas las

células madre embrionarias humanas (hES) y varias células madre específicas del tipo de tejido (46).

4.3 Células madre pulpa dental (DPSCs)

Las células madre obtenidas de la pulpa de los dientes deciduos humanos son células multipotentes plásticas y altamente proliferativas, lo que las convierte en un modelo relevante de células madre, aplicadas en diversas áreas biomédicas, con diferentes propósitos (36).

Numerosos estudios han proporcionado evidencia de la capacidad de diferenciación de las DPSCs, como en la neurogénesis, adipogénesis, osteogénesis, condrogénesis, angiogénesis y dentinogénesis (11).

Los datos preliminares sugieren que estas células tienen la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos, condrocitos y células neurales. De confirmarse, estos datos respaldarían el uso de estas células, que se obtienen fácilmente de los dientes extraídos, en terapias dentales, incluida la endodoncia regenerativa, proporcionando una nueva modalidad terapéutica (29).

Las DPSCs y las SHED se han aislado del tejido de la pulpa dental de los dientes permanentes y los dientes temporales adultos, respectivamente. Debido a sus características similares a las de las MSCs, como su alta capacidad de crecimiento, multipotencia, expresión de marcadores relacionados con las MSCs y efectos inmunomoduladores, se sugiere que son una fuente celular importante para la regeneración de tejidos (17).

La pulpa dental humana ofrece una fuente fascinante de células madre adultas. La vía de desarrollo que genera DPSCs da como resultado un tipo de célula que puede contribuir a la regeneración de numerosos tipos de tejidos. Potencialmente, las DPSCs

podrían ser fáciles de obtener de los dientes que se pierden naturalmente durante la infancia o que se extraen quirúrgicamente debido a la impactación. Se está acumulando una gran cantidad de literatura para respaldar el uso clínico de DPSCs en odontología, ortopedia y otras aplicaciones (16).

El complejo dentina-pulpa muestra un potencial regenerativo exquisito en respuesta a una lesión. La naturaleza de las poblaciones de células madre / progenitoras en la pulpa es de importancia para comprender sus potencialidades y el desarrollo de estrategias de aislamiento o reclutamiento, y permitir la explotación de su uso en la regeneración y la ingeniería de tejidos (20).

Las células multipotentes adherentes al plástico, capaces de diferenciarse en células óseas, cartilaginosas y grasas (entre otras), pueden aislarse de muchos tipos de tejidos adultos. Sin embargo, incluso si se aíslan mediante fraccionamiento en gradiente de densidad, siguen siendo una mezcla heterogénea de células con diferentes potenciales de proliferación y diferenciación. Aunque es aceptable para aplicaciones terapéuticas basadas en células, una comprensión rigurosa de las MSCs requiere una mejor definición de lo que es una MSCs. Se han realizado muchos intentos para desarrollar un perfil de antígeno de superficie celular para una mejor purificación e identificación de las MSCs. De particular importancia es si las MSCs aisladas de diferentes tejidos son identificables por el mismo inmunofenotipo (12).

Se han informado numerosos métodos para el aislamiento, expansión y preservación de DPSC. El establecimiento de protocolos generales optimizados o personalizados permitirá obtener cultivos de DPSCs bien definidos con propiedades específicas, que permitan resultados más reproducibles que serán la base para desarrollar terapias efectivas y seguras. (37).

Los avances en las técnicas de microscopía permiten visualizar y analizar la detección de procesos moleculares intracelulares para PDLSC. La microscopía de barrido

láser confocal (CLSM) y la microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM) son dos técnicas de microscopía bien estudiadas que permiten un aumento en la resolución y el contraste de las micrografías y la capacidad de localizar eventos en la membrana plasmática, respectivamente (38).

4.4 CD146

El CD146 es una molécula de adhesión celular localizada en la unión endotelial y participa en el control de la cohesión célula-célula(25).

Baksh y col. informó de una alta expresión de CD146 en células perivasculares del cordón umbilical humano; Las células perivasculares positivas para CD146 demuestran perfiles funcionales y de expresión génica que son similares a las MSCs (18).

La heterogeneidad de las células madre mesenquimales (MSCs) influye en el resultado de la terapia celular y la aplicación en la ingeniería de tejidos. Además, la aplicación de subpoblaciones de MSC en la regeneración del cartílago sigue estando poco caracterizada. Las MSC CD146 + se identifican como los ancestros naturales de las MSCs y la expresión de CD146 es indicativa de una mayor pluripotencia y potencial de autorrenovación (45).

El CD146 es un marcador de MSCs aisladas de múltiples órganos adultos y fetales, y su expresión está relacionada con la multipotencia. Las MSCs con mayor potencial de diferenciación expresan niveles más altos de CD146 en la superficie celular (19).

Se ha demostrado que CD146 se expresa no solo en células epiteliales, sino también en otras células, incluidas las células endoteliales, subpoblaciones de células T y MSCs (24). Las poblaciones de MSCs aisladas del tejido adiposo también pueden contener células T reguladoras (Treg), que tienen la capacidad de modular el sistema

inmunológico. Las propiedades inmunorreguladoras y regenerativas de las MSCs las hacen ideales para su uso como agentes terapéuticos in vivo (13).

Se ha informado recientemente que CD146, una molécula endotelial implicada en la permeabilidad y la trans migración de monocitos promueve el crecimiento de vasos. (27). Se han descrito tres formas de CD146, incluidas 2 isoformas transmembrana y una proteína soluble que es detectable en el plasma (30).

5. MÉTODOS

Universo de estudio

Humanos adultos jóvenes (18-24 años) sin distinción de género.

Criterios de inclusión

- Terceros molares superiores e inferiores erupcionados.

Criterios de exclusión

- Terceros molares seccionados o fracturados.
- Terceros molares con caries.

5.1 Selección de pacientes

El reclutamiento de pacientes voluntarios se llevó a cabo en el posgrado de Ortodoncia de la facultad de odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde se realizó a los candidatos a donador una historia clínica y examen radiográfico para la selección de terceros molares a extraer, de esta manera se descartó la presencia de caries dental como factor bacteriano, así como patología a nivel de la zona periapical o fractura coronaria.

5.2 Extracción de piezas dentales

Se realizó un protocolo modificado para garantizar la vitalidad y óptimas condiciones del tejido pulpar. Primeramente, se indicaron a los donadores colutorios bucales de clorhexidina al .12% previo a la cita durante 1 semana, con el objetivo de disminuir la carga bacteriana evitando contaminación de los tejidos periapicales posterior a la extracción dental.

Una vez transcurrido el tiempo de profilaxis, se realizaron las extracciones de los terceros molares aplicando benzocaína al 20% en el sitio de la punción e infiltración con anestesia scandonest 2 % especial solución inyectable 36/.018 mg.

El procedimiento se realizó de manera atraumática en el menor tiempo posible para garantizar la integridad dental y pulpar, utilizando un instrumento quirúrgico tipo Hollenback para la debridación del tejido blando y posteriormente las piezas dentales fueron luxadas utilizando elevadores rectos de hoja estrecha y ancha.

Una vez extraídas las piezas dentales se lavaron con buffer de fosfatos 1X (PBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para retirar restos de sangre e inmediatamente fueron inmersas en tubos estériles de 50 ml, que contenían una solución de transporte compuesta por PBS 1X, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μ m /ml y anfotericina B0.25 μ m /ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

5.3 Obtención de pulpa dental

Una vez en el laboratorio, la pulpa dental de los terceros molares fue retirada vía apical utilizando pinzas de curación. A continuación, las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml con 1ml de solución de transporte, posteriormente se etiquetaron las muestras y se conservaron en refrigeración a 4° C. Las muestras de pulpa dental se obtuvieron de 20 terceros molares humanos extraídos por razones de Ortodoncia

de pacientes sanos. Finalmente fue incluido dentro del estudio solamente el tejido del paciente más joven (18 años).



Figura 2 Microcentrífuga MiniSpin Y balanza analítica.

5.4 Disgregación de pulpa dental

La porción de tejido obtenido se colocó en una solución de 3 mg/ml de colagenasas tipo 1 y 4 mg/ml de dispasa (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C en baño María. Pasado el tiempo de digestión enzimática se lavó la muestra 3 veces con PBS 1X utilizando centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos para finalmente re-suspender el botón celular y filtrar con una malla de nylon de 70 μm (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

5.5 Cultivo celular y microscopia de contraste de fases

La suspensión de células de pulpa dental fue centrifugada a 1200 rpm durante 10 minutos realizando 2 lavados con PBS 1X; las células fueron re-suspendidas en medio completo de crecimiento compuesto de Dulbecco's modified Eagles medium- Ham's F12 (DMEM-F12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{m}/\text{ml}$ de estreptomycin y 0.25 $\mu\text{m}/\text{ml}$ de anfotericina B (Sigma-Aldrich). Las células fueron cultivadas a 37° C en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO₂ durante 3 semanas en frascos de 25 cm². el medio fue renovado cada 3 días.

Finalmente, el análisis morfológico de las células se realizó enfocando un campo al azar y en él se realizó una identificación de las formas más típicas mediante microscopia de contraste de fases.



Figura 3 Incubadora de CO2.

5.6 Inmunocitoquímica de CD146 en DPSCs

Las DPSCs se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de $\sim 2 \times 10^4$ células por pocillo, manteniéndolas en medio de crecimiento durante 24 h (Corning Inc., Corning, NY, EE. UU.). Después de 24 horas de incubación se eliminó el medio y las células se lavaron 3 veces con PBS. Posteriormente se fijaron utilizando una solución de formalina neutra amortiguada al 10%. Finalmente, las células fijadas y posteriormente incubadas con el anticuerpo CD146-FITC (Miltenyi biotec, Germany), para ser observadas utilizando el microscopio de fluorescencia Evos Fluid (Invitrogen, USA).



Figura 4 Microscopio de fluorescencia.

6. RESULTADOS

Cultivo y análisis morfológico de DPSCs

Las células obtenidas del tejido pulpar mostraron tener características adherentes al frasco de cultivo creciendo de manera constante durante tres semanas bajo las condiciones óptimas de cultivo.

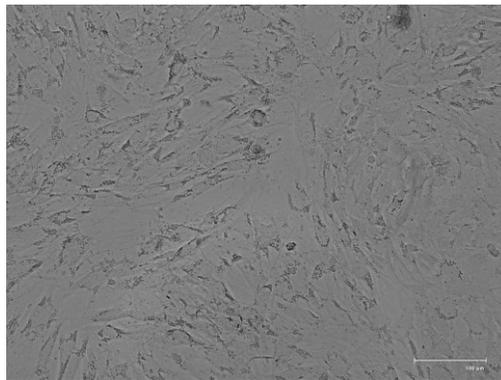


Figura 5 Crecimiento de agrupaciones y morfología celular posterior a 48 horas de cultivo.

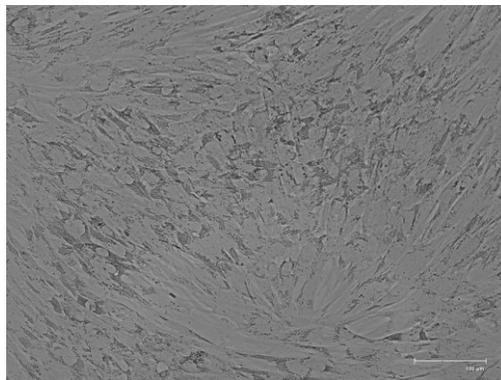


Figura 6 Crecimiento de agrupaciones y morfología celular posterior a 96 horas de cultivo.

Las DPSCs tuvieron una morfología homogénea caracterizada por formas espigadas alargadas y con núcleo redondo además fueron observadas a las primeras horas de cultivo múltiples colonias o agrupaciones, características especiales de MSCs.

Expresión de CD146 en DPSCs

El análisis de inmunofluorescencia confirmó que las células cultivadas en DMEM-12 durante tres semanas fueron positivas para la proteína de superficie CD146, en contraste el grupo control (control negativo) el cual no mostro señal de fluorescencia a una longitud de onda de 488 nm.

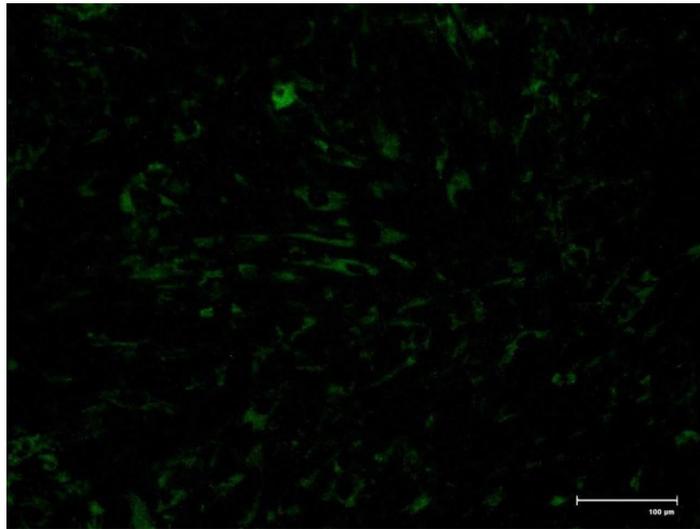


Figura 7 Grupo CD146, donde se observa una expresión positiva de la proteína por inmunofluorescencia.



Figura 8 Grupo control sin señal de fluorescencia.

7. DISCUSIÓN

La ingeniería de tejidos se utiliza en la modulación del sistema inmunológico mediante el uso de MSCs del paciente y modificando las características físicas de los andamios que pueden provocar el sistema inmunológico (44). Huang et al, 2010 proporcionan la primera evidencia que muestra que el tejido similar a la pulpa se puede regenerar en el espacio del conducto radicular vacío gracias a las células madre de la papila apical y las DPSCs dan lugar a células similares a los odontoblastos que producen tejido similar a la dentina en las paredes dentinarias existentes (21). Bakopoulou et al, proporcionan evidencia de que diferentes tipos de MSCs dentales se pueden usar en protocolos de ingeniería / regeneración de tejidos como una fuente accesible de células madre para la diferenciación y biomineralización osteo / odontogénica que podría aplicarse más a las terapias clínicas basadas en células madre (32), Kozłowska et al hacen énfasis en que la fuente de MSCs con propiedades biológicas específicas y la duración del cultivo son una consideración importante para su selección en medicina regenerativa (33). Cabe señalar que se han informado numerosos métodos para el aislamiento, expansión y preservación de DPSC. El establecimiento de protocolos generales optimizados o personalizados permitirá obtener cultivos de DPSCs bien definidos con propiedades específicas, que permitan resultados más reproducibles que serán la base para desarrollar terapias efectivas y seguras (37). Nuestros resultados proporcionan evidencia de que con las condiciones óptimas de cultivo las células de tejido pulpar tienen características de adhesión y crecimiento constante. Además, debemos mencionar que DPSCs podrían ser fáciles de obtener de los dientes que se pierden naturalmente durante la infancia o se extraen quirúrgicamente.

La morfología celular se ha utilizado como un indicador importante para caracterizar y evaluar la calidad celular (47, 48). Observamos que las DPSCs tuvieron una morfología homogénea caracterizada por formas espigadas alargadas y con núcleo

redondo además fueron observadas a las primeras horas de cultivo múltiples colonias o agrupaciones, características especiales de MSCs.

Se han realizado muchos intentos para desarrollar un perfil de antígeno de superficie celular para una mejor purificación e identificación de las MSCs. De particular importancia es si las MSCs aisladas de diferentes tejidos son identificables por el mismo inmunofenotipo (12). Kawashima ha publicado una revisión exhaustiva de los marcadores candidatos de DPSCs y ha analizado el origen de su cresta neural; estos marcadores incluyen STRO - 1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 y CD271 (15). Matsui et al, sugieren el uso de CD146 + DPSCs en la terapia regenerativa de la pulpa dental. Sin embargo, se requieren más análisis mecanicistas de la capacidad de las células CD146 + para autorrenovarse para la utilización eficaz de las DPSC en la terapia regenerativa (18). Boneberg et al, sus datos indican que la superficie CD146 juega un papel central en la regulación de la permeabilidad vascular y demuestran que CD146 y metaloproteasas de matriz son objetivos potenciales para modificar la función de barrera endotelial (25). Se ha informado recientemente que CD146, una molécula endotelial implicada en la permeabilidad y la trans migración de monocitos promueve el crecimiento de vasos. (27). Se han descrito tres formas de CD146, incluidas 2 isoformas transmembrana y una proteína soluble que es detectable en el plasma (30). Nuestro estudio confirma mediante el análisis de inmunofluorescencia, que las células cultivadas en DMEM-12 fueron positivas para la proteína de superficie CD146, en contraste el grupo control el cual no mostro señal de fluorescencia.

Este estudio demuestra la posibilidad de cultivar DPSCs en DMEM-12 y además dar resultado positivo para la proteína de superficie CD146, mostrando una crecimiento positivo y morfología fibroblástica alargada típico de MSCs. Por lo que indica relación entre el marcador CD146 con linajes endoteliales a nivel tisular.

8. CONCLUSIONES

- Es posible cultivar una población de DPSCs derivadas de terceros molares utilizando un protocolo de disociación enzimática.

- Las DPSCs derivadas de terceros molares exhiben morfologías fibroblásticas alargadas en forma de huso típicas de MSCs.

- La expresión positiva del marcador CD146 en DPSCs sugiere su proximidad a nivel tisular con linajes endoteliales lo que podría impactar sobre su potencialidad.

9. LITERATURA CITADA

1. Ikeda E, Yagi K, Kojima M, Yagyuu T, Ohshima A, Sobajima S, Tadokoro M, Katsube Y, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Go MJ, Adachi H, Yokota Y, Kirita T, Ohgushi H. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*. 2008;76(5):495-505.
2. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(3):252-264.
3. Yu J, Wang Y, Deng Z, et al. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell*. 2007;99(8):465-474.
4. Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(9):408-414.
5. Sanz AR, Carrión FS, Chaparro AP. Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering. *Periodontol 2000*. 2015; 67 (1):251-267.
6. Wiesmann A, Bühring HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med*. 2006;2:8.
7. Mendigaño N, Robayo A, Mendoza L. Aislamiento y capacidad de osteodiferenciación de las células madre provenientes del ligamento periodontal y pulpa dental. *Rev. CES Odont*. 2015; 28(2): 20-34.
8. Paknejad M, Eslaminejad M, Ghaedi B, Rokn A, Khorsand A, EstemadMoghadam S, Alaeddini M, Dehghan M, Moslemi N, Nowzari H. Isolation and assessment of mesenchymal stem cells derived from bone marrow: histologic and histomorphometric study in a canine periodontal defect. *J Oral Implantol*. 2015; 41(3):284-91.

9. Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Ma L, Hoshino Y, Nonaka K, Terada Y, Kukita T, Shi S, Yamaza T. Immune Therapeutic Potential of Stem cells from human supernumerary teeth. *J Dent Res.* 2013;92(7):609-615.
10. El Moshy S, Radwan IA, Rady D, Abbass MMS, El-Rashidy AA, Sadek KM, Dörfer CE, Fawzy El-Sayed KM. Secretoma derivado de células madre dentales / medio acondicionado: el futuro de las aplicaciones terapéuticas regenerativas. *Células madre Int.* 31 de enero de 2020; 2020: 7593402.
11. Tsutsui TW. Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. *Stem Cells Cloning.* 2020;13:33-42.
12. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.* *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204.
13. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods.* 2016;99:62-68.
14. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-13630.
15. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration?. *Arch Oral Biol.* 2012;57(11):1439-1458.
16. Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015;9(11):1205-1216.
17. Yoshida S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Sugii H, Maeda H. Insight into the Role of Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Therapy. *Biology (Basel).* 2020;9(7):160. Published 2020 Jul 9.
18. Matsui M, Kobayashi T, Tsutsui TW. CD146 positive human dental pulp stem cells promote regeneration of dentin/pulp-like structures. *Hum Cell.* 2018;31(2):127-138.
19. Sivasankar V, Ranganathan K. Growth characteristics and expression of CD73 and CD146 in cells cultured from dental pulp. *J Investig Clin Dent.* 2016;7(3):278-285.

20. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 2007;13(2):151-157.
21. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(2):605-615.
22. Yang JW, Shin YY, Seo Y, Kim HS. Therapeutic Functions of Stem Cells from Oral Cavity: An Update. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4389. Published 2020 Jun 19.
23. Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3:788-800.
24. Sun Z, Ji N, Ma Q, Zhu R, Chen Z, Wang Z, Qian Y, Wu C, Hu F, Huang M, Zhang M. La transición epitelial-mesenquimal en la remodelación de las vías respiratorias para el asma está regulada por la IL-33 / CD146 Eje. *Front Immunol.* 2020; 11: 1598.
25. Boneberg EM, Illges H, Legler DF, Fürstenberger G. Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. *Microvasc Res.* 2009;78(3):325-331.
26. Aydin S, Şahin F. Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1144:123-132.
27. Harhour K, Kebir A, Guillet B, et al. Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. *Blood.* 2010;115(18):3843-3851.
28. Peng L, Ye L, Zhou XD. Células madre mesenquimales e ingeniería dental. *Int J Oral Sci.* Marzo de 2009; 1 (1): 6-12.
29. Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J.* 2011;44(9):800-806.
30. Leroyer AS, Blin MG, Bachelier R, Bardin N, Blot-Chabaud M, Dignat-George F. CD146 (Cluster of Differentiation 146). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(6):1026-1033.
31. Sierra-Sánchez Á, Ordóñez-Luque A, Espinosa-Ibáñez O, Ruiz-García A, Arias-Santiago S. Epithelial In vitro Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2018;13(6):409-422.

32. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol.* 2011;56(7):709-721.
33. Kozłowska U, Krawczenko A, Futoma K, Jurek T, Rorat M, Patrzalek D, Klimczak A. Similitudes y diferencias entre células madre / progenitoras mesenquimales derivadas de varios tejidos humanos. *Células madre del mundo J.* 2019; 11 (6): 347-374.
34. Câmara DAD, Shibli JA, Müller EA, De-Sá-Junior PL, Porcacchia AS, Blay A, Lizier NF. Adipose Tissue-Derived Stem Cells: The Biologic Basis and Future Directions for Tissue Engineering. *Materials (Basel).* 2020;13(14):3210.
35. Stefańska K, Mehr K, Wieczorkiewicz M, Kulus M, Angelova Volponi A, Shibli JA, Mozdziak P, Skowroński MT, Antosik P, Jaśkowski JM, Piotrowska-Kempisty H, Kempisty B, Dyszkiewicz-Konwińska M. Stemness Potency of Human Gingival Cells-Application in Anticancer Therapies and Clinical Trials. *Cells.* 2020;9(8): E1916.
36. Ferreira JRM, Greck AP. Adult mesenchymal stem cells and their possibilities for Dentistry: what to expect? *Dental Press J Orthod.* 2020;25(3):85-92.
37. Rodas-Junco BA, Villicaña C. Dental Pulp Stem Cells: Current Advances in Isolation, Expansion and Preservation. *Tissue Eng Regen Med.* 2017;14(4):333-347.
38. Merkel A, George A. In Vitro Analysis of Intramolecular Signaling Events in PDLSCs Using Confocal and TIRF Microscopy. *Methods Mol Biol.* 2019; 1922:103-110.
39. Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Kusano K, Baba S. Clinical Potential and Current Progress of Dental Pulp Stem Cells for Various Systemic Diseases in Regenerative Medicine: A Concise Review. *Int J Mol Sci.* 6 de marzo de 2019; 20 (5): 1132.
40. Vaca AM, Guido CB, Sosa Ldel V, Nicola JP, Mukdsi J, Petiti JP, Torres AI. The expansion of adult stem/progenitor cells and their marker expression fluctuations are linked with pituitary plastic adaptation during gestation and lactancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(2):E367-79.
41. Daltoe FP, Oliveira NAJ, Peron CN, Sharpe PT, Mantesso A. Phenotype changes of oral epithelial stem cells after in vitro culture. *Braz Oral Res.* 2020;34:e033.

42. Zhu W, Liang M. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects. *Stem Cells Int* .2015; 2015: 972313.
43. Tatullo M, Codispoti B, Sied J, Makeeva I, Paduano F, Marrelli M, Spagnuolo G. Stem Cells-based and Molecular-based Approaches in Regenerative Dentistry: A Topical Review. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019;14(7):607-616.
44. Dubey SK, Alexander A, Sivaram M, Agrawal M, Singhvi G, Sharma S, Dayaramani R. Uncovering the Diversification of Tissue Engineering on the Emergent Areas of Stem Cells, Nanotechnology and Biomaterials. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2020;15(3):187-201.
45. Li X, Guo W, Zha K, Jing X, Wang M, Zhang Y, Hao C, Gao S, Chen M, Yuan Z, Wang Z, Zhang X, Shen S, Li H, Zhang B, Xian H, Zhang Y, Sui X, Qin L, Peng J, Liu S, Lu S, Guo Q. Enrichment of CD146+ Adipose-Derived Stem Cells in Combination with Articular Cartilage Extracellular Matrix Scaffold Promotes Cartilage Regeneration. *Theranostics*. 2019;9;9(17):5105-5121.
46. Gotoh N. Control of stemness by fibroblast growth factor signaling in stem cells and cancer stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009;4(1):9-15.
47. Leischner U, Schierloh A, Zieglgansberger W, Dodt HU. La fluorescencia inducida por formalina revela la forma y morfología de las células en muestras de tejido biológico. *Más uno*. 2010; 5: e10391.
48. Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, et al. Predicción basada en la morfología del potencial de diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales humanas. *Más uno*. 2013; 8: e55082.

10. RESUMEN BIOGRÁFICO

Jessica Paola Dussauge Aguilar

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría.

Tesis: IDENTIFICACIÓN DEL MARCADOR ENDOTELIAL CD146 EN
CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL *IN VITRO*.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Tula de Allende, Hidalgo el 6 de febrero de 1995, hija
de Sergio Alejandro Dussauge Leon y Maria Esther Aguilar Olguin.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Cirujano Dentista 2017.

Experiencia Profesional: Consulta privada 2017, Hospital San Lucas.