

COMPARACIÓN MORFOLÓGICA Y FENOTÍPICA ENTRE LAS CÉLULAS MADRE HUMANAS DE LA PULPA DENTAL Y EL SACO DENTAL

MORPHOLOGICAL AND PHENOTYPIC COMPARISON BETWEEN HUMAN STEM CELLS FROM DENTAL PULP AND DENTAL SAC

Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología.

Facultad de Odontología – UNLP (Calle 50 e/ 1 y 115) La Plata (1900)

secyt_folp@hotmail.com

“Sin conflicto de interés”

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



RESUMEN

Objetivo: Las piezas dentarias son una fuente importante de células madre. Se pueden obtener de diferentes tejidos dentales (pulpa, saco, ligamento periodontal). El objetivo de este trabajo fue comparar las características fenotípicas y morfológicas de las células madre mesenquimales aisladas de la pulpa dental y el saco dental. Se obtuvieron tres muestras de tejido de pulpa y tres muestras de tejido de saco de terceros molares indicados para exodoncia. Las células aisladas se cultivaron en iguales condiciones y se caracterizaron mediante microscopía de contraste de fases, MET y citometría de flujo, utilizando marcadores CD73, CD90 y CD105. Se observaron células fusiformes y estrelladas con morfología similar a fibroblastos y disposición paralela. Células cuboides fueron encontradas en los cultivos derivados de saco. Resultados similares fueron obtenidos por citometría de flujo en ambas poblaciones. Estos resultados preliminares confirman que las células madre de ambos tejidos dentales tienen características similares.

Palabras claves: células madre-cultivo- morfología-fenotipo

ABSTRACT

Dental pieces are an important source of mesenchymal stem cells. They can be obtained from different dental tissues (pulp, sac, periodontal ligament). The aim of this research was to compare phenotypic and morphological characteristics of stem cells isolated from dental pulp and dental sac. Three samples of pulp tissue and three samples of sac tissue were obtained from third molars indicated for exodontia. The isolated cells were cultured under the same conditions, and characterized by phase contrast microscopy, MET and flow cytometry, using CD73, CD 90 and CD105 markers. Fusiform and stellate cells were observed, with fibroblast like shape and parallel arrangement. Cuboid like cells were found in sac tissue derived cultures. Similar results were obtained by Flow cytometry in both populations. These preliminary results confirm that stem cells from both dental tissues have similar characteristics.

Keywords: stem-culture-morphology-phenotype cells



INTRODUCCIÓN

Las células madre (CM) adultas han recibido gran atención gracias a su capacidad de diferenciarse a células de diferentes tejidos. En el adulto pueden obtenerse casi de cualquier tejido. La principal función de las CM adultas es mantener y reparar el tejido de origen, fundamentalmente el tejido en que ellas residen. Las CM tienen la capacidad de renovar las células después de un traumatismo, de una enfermedad o por recambio fisiológico. Una característica destacable de estas células es su plasticidad, pudiendo generar células especializadas de tejidos diferentes al cual ellas residen y también tienen la capacidad de diferenciarse funcionalmente a células especializadas de la misma capa embrionaria o de capas embrionarias diferentes a las de su origen. Respecto al tejido dentario, se han identificado poblaciones de CM adultas derivadas de Pulpa, Ligamento Periodontal y Folículo Dental. Según lo descrito por Gronthos(2000) la pulpa contiene células que son clonogénicas, altamente proliferativas y capaces de regenerar tejido mineralizado, propiedades que la definen como CM. Son células pluripotentes, capaces de diferenciarse en varios tipos de células. El objetivo de este trabajo fue comparar las características fenotípicas y morfológicas de las células madre mesenquimales aisladas de la pulpa dental y el saco dental.



MATERIALES Y MÉTODOS

Los tejidos se extrajeron de terceros molares con indicación de exodoncia. Una vez extraída la pieza, se la lavó en solución fisiológica estéril, se colocó en medio de cultivo para transporte y se trasladó refrigerada inmediatamente al laboratorio de procesamiento, Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, ubicado dentro del mismo edificio. Las muestras fueron inmediatamente procesadas. Se obtuvieron 3 muestras de pulpa y 3 muestras de saco correspondientes. Cada pulpa y cada saco fueron procesados por separado, el tejido fue disgregado físicamente con bisturí. Los explantes disgregados se cultivaron en placas de Petri de 9 cm² en condiciones estándar de cultivo, a 37°C y 5% de CO₂. El medio fue renovado cada 5 días hasta que las células alcanzaron un 80% de confluencia. Se realizaron entre 2 y 4 pasajes utilizando tripsina para despegar las células. El análisis morfológico fue efectuado mediante microscopio invertido con contraste de fases, (Leica mod.DM IL LED) acoplado a un sistema de registro fotográficos. Cuando los cultivos en pasaje 2 o pasaje 4 alcanzaron el estado de semiconfluencia, las células fueron resuspendidas y caracterizadas por citometría de flujo (Citometer BD FACSCalibur) para los marcadores CD73, CD90, CD105 y CD146.

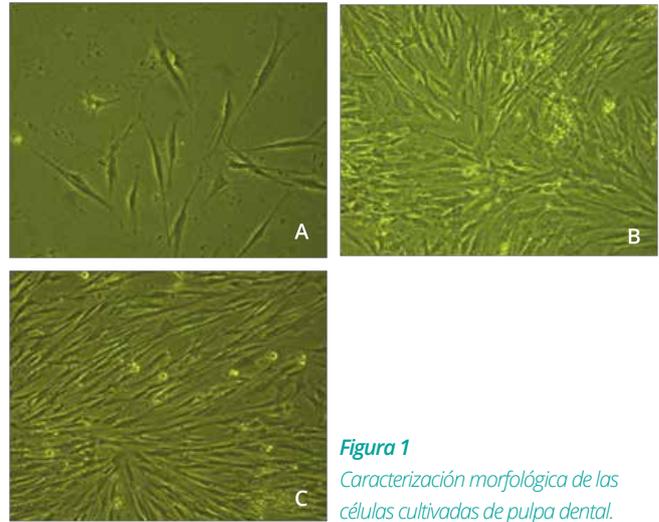


Figura 1
Caracterización morfológica de las células cultivadas de pulpa dental.



RESULTADOS

En cultivo se observaron la formación de numerosas colonias, de células fusiformes y estrelladas, formando agregados en forma irradiada, paralelas unas a otras (Fig.1 A). Las células cercanas a los agregados mostraron cambios morfológicos sugerentes de diferenciación, mientras que en el resto del cultivo las células conservaron su morfología fusiforme semejante a fibroblastos (Fig.1 B). Las células que se obtuvieron de las digestiones pulpares después de 14 días de cultivo celular mostraron una morfología de tipo fibroblástica, alargada y aplanadas ubicadas en colonias clonogénicas, característica esencial de las células madre adultas.(Figura 1 C)

La caracterización morfológica de las células mediante citometría de flujo para los marcadores CD73, CD90, CD105 y CD146, tanto de los cultivos de las células pulpares como de las células derivadas de saco, presentaron resultados similares, todas positivas para los primeros 3 marcadores (figura 2), aunque todas las poblaciones mostraron características heterogéneas para CD146 (figura 3).



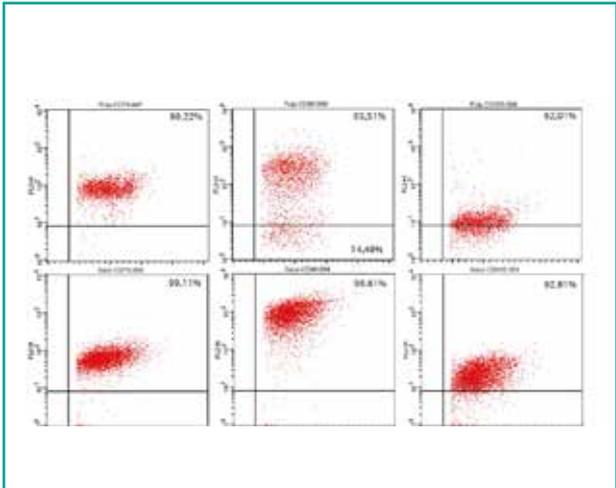


Figura 2
Caracterización celular por citometría de flujo, positivas para CD 73,90 y 105

C

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican que las células derivadas de explantes de pulpas dentales humanas y sus sacos correspondientes contienen subpoblaciones, entre las cuales existen células progenitoras que expresan marcadores que las identifican como células madre adultas. Estas presentan una característica esencial: son clonogénicas y pueden ser consideradas pluripotentes, con capacidad de diferenciación hacia un fenotipo celular mineralizante. Son necesarios más estudios de investigación para caracterizar el fenotipo diferenciado con especial énfasis al fenotipo odontoblástico, para su potencial aplicación en terapias de regeneración dental.

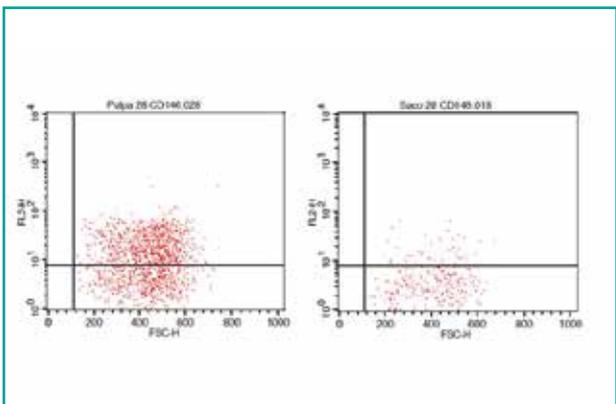


Figura 3
Caracterización celular por citometría de flujo.
Se evidencia heterogeneidad para CD 146.

Bibliografía

- Huang AHC, Chen YK, Chan AWS, Shieh TY, Lin LM. Isolation and characterization of human dental pulp stem/stromal cells from nonextracted crown-fractured teeth requiring root canal therapy. *J Endod* 2009; 35(5): 673- 681.
- Zhang W, Walboomers XF, Wolke JGC, Bian Z, Fan MW, Jansen JA. Differentiation Ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro. *Tissue Eng* 2005; 11(3/4): 357- 368.
- Mauth C, Huwig A, Graf-Hausner U, Roulet J-H. Restorative applications for dental pulp therapy. *Topics in Tissue Engineering* 2007; 3. Eds Ashammakhi N, Reis R, Chiellini.
- Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod* 2007; 33(6): 703- 708.
- Huang AHC, Chen YK, Chan AWS, Shieh TY, Lin LM, Shieh TY, Cha AWS. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 571- 574.
- Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod* 2009; 35(11): 1536- 1542.
- Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental pulp stem cells. *Methods in Enzymology* 2006; 419: 99-113.
- Tomasello et al. Mesenchymal stem cells derived from inflamed dental pulpal and gingival tissue: a potential application for bone formation. *Stem Cell Research & Therapy* (2017) 8:179
- Yasui et al. Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. *Inflammation and Regeneration* (2017) 37:8
- Stefanny Romero, Katherine Córdoba y col. Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología, *Revista Odontológica Mexicana* 2014; 18 (3): 156-163

