

Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental

Magallanes Fabián Miriam ^{*}, Carmona Rodríguez Bruno [§], Álvarez Pérez Marco Antonio ^{||}

Resumen

La nueva tendencia en la ingeniería de tejidos es el empleo de las células madre aisladas de tejidos adultos y hoy día existe un gran interés en el uso terapéutico de las células madre en la terapia de regeneración de tejidos dentales. Por ello, el propósito de este estudio fue aislar, caracterizar e inducir la diferenciación celular de células madre derivadas de extractos de pulpa dental de premolares de pacientes jóvenes que fueron extraídos por cuestiones de tratamientos de ortodoncia. Las células madre aisladas en los cultivos celulares derivadas de los extractos de pulpa dental, formaron colonias clonogénicas después de 5 semanas de cultivo celular, presentando células con morfologías alargadas, aplanadas y fibroblásticas. Estas clonas fueron positivas a los anticuerpos CD-44 y STRO-1 que reconocen epítopes membranales específicos de células madre aisladas de tejidos adultos. Asimismo, estas células fueron capaces de diferenciarse hacia un fenotipo mineralizante, por expresar moléculas asociadas al proceso de biomineralización como sialoproteína ósea, osteopontina, analizadas por la técnica de RT-PCR e inmunocitoquímica. En conclusión,

nuestros resultados muestran que a partir de pulpas dentales de humano es posibles aislar células madre adultas con características clonogénicas. Estas células madre son capaces de recibir estímulos para inducir su diferenciación celular, formando tejido mineral similar al depositado por las células que darán origen a la dentina o tejidos mineralizados como hueso y cemento radicular. Sin embargo, es necesario realizar más estudios encaminados a caracterizar genes específicos del linaje odontoblástico, para poder utilizar estas células madres en terapias de regeneración celular, específicamente encaminadas al área de la ingeniería de tejidos mineralizados.

Palabras Claves: Células madre, Biomineralización, Pulpa dental.

Abstract

There is an increasing interest in the utility of dental pulp stem cells (DPSCs) for dental tissue regeneration. The purposes of the study was to isolation and identifies potential markers of stem cells from human dental pulp and investigate the mineralization capacity by a differentiation stimuli by dexametason. The isolated dental

*Clínica de Odontopediatría, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

§Profesor de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

||Profesor e Investigador del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

pulp stem cells have a fibroblastic like morphology and expressed mesenchymal stem cell markers (STRO-1 and CD-44) as shown by immunocytochemistry essay and could differentiate *in vitro* into osteoblastic like lineage. This differentiation was evaluated by RT-PCR and by immunocytochemistry and the results revealed that bone sialoprotein and osteopontin two very important extracellular matrix protein were expresses in the induction cultures

Introducción

Hoy día el conocimiento en la bioingeniería tisular para lograr regenerar un tejido después de una lesión o de un daño causado por un ataque bacteriano han llevado a la identificación y aislamiento de poblaciones de células progenitoras que bajo estímulos específicos pueden diferenciarse en una población específica, recibiendo el nombre de células madre (SC).¹

Las células madre generalmente se definen como células clonogénicas capaces de autorenovación; es decir son células no especializadas que se renuevan durante largos períodos de tiempo por división celular; y son capaces de diferenciación celular específica; esto hace referencia a que pueden ser inducidas por un estímulo adecuado a diferenciarse a células con funciones especiales como miocitos, osteoblastos, etc.^{2,3}

Los reportes actuales sobre células madre reportan que se han aislado a partir de varios tejidos adultos, incluyendo médula ósea, tejido neural, músculo, piel, retina y

and confirm the osteoblastic-like phenotype. In conclusion, we isolated cells from dental pulp with stem cell characteristics and the present study suggests that stem cells from human dental pulp may potentially be used as a novel cellular therapy in the tissue engineering area.

Key words: Stem Cells, Biomineralization, Dental pulp cells.

folículos pilosos.⁴ Con referencia al área dental existen reportes incipientes donde las células madre asiladas son a partir de extractos de ligamento periodontal y de pulpas de órganos dentarios exfoliados (SHED).^{5,6}

Los estudios con células madre enfocadas al área dental han reportado que éstas células pueden formar estructuras que parecen complejos pulpa-dentina y ligamento periodontal-cemento radicular respectivamente al ser transplantadas subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos⁷, o pueden participar en procesos de reparación periodontal en defectos creados en roedores.⁸ Asimismo, las células madre SHED son capaces de estimular la nueva formación de hueso por lo que tienen posible aplicación en regeneración ósea craneofacial.^{9,10} Estos y otros datos experimentales, resaltan el potencial de las células madre para lograr la regeneración de tejidos dentarios humanos *in vivo*, sin embargo, no se conocen las señales necesarias para la diferenciación a un fenotipo celular específico, por lo que la investigación actual está encaminada a

desentrañar cuales son los mecanismos moleculares involucrados en el tránsito de una población celular progenitora con característica de célula madre a una población comprometida hacia un linaje dental o célula diferenciada.¹¹

Por ello, el estudio de las células madre abre un panorama considerable desde su descubrimiento en el área biomédica y dental, aunado a su facilidad de obtención con la factibilidad de expandir el cultivo *in vitro* para su utilización terapéutica; convirtiendo a las células madre en candidatas ideales para la investigación en el área de regeneración tisular e ingeniería de tejidos.

Con la finalidad de contribuir al conocimiento de las células madre, el propósito de esta investigación se baso en llevar a cabo el asilamiento, caracterización y diferenciación celular de células madre derivadas de extractos de pulpa dental de premolares de pacientes jóvenes que fueron extraídos por cuestiones de tratamientos de ortodoncia.

Materiales y Métodos

Selección de pacientes

Para realizar este estudio, se reclutaron 5 pacientes sanos de ambos sexos, adolescentes en un intervalo de 12 a 18 años de edad que acudían a la Clínica de Ortodoncia de la División de Estudios

de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. Su tratamiento de base contempló extracciones de primeros premolares superiores e inferiores y ellos fueron informados del estudio para su consentimiento.

Extracción Dental

La extracción de los premolares de los 5 pacientes se llevo a cabo en la Clínica de Odontopediatria de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. La extracción se realizó utilizando 1.8 mililitros de anestésico lidocaína con epinefrina (36mg/0.025mg, Uniseal) luxando el órgano dentario con un elevador recto No. 301m y manipulando con fórceps No. 150. El órgano dentario extraído se colocó inmediatamente en medio Dulbelcos modified eagle medium (DMEM) frío para garantizar el estado celular del tejido pulpar.

Obtención de Muestra Pulpar

Posterior a la extracción del órgano dentario, se procedió a obtener pulpas dentales. El órgano dentario se fracturo por medio de utilizar pieza de alta velocidad para garantizar no dañar el tejido pulpar. La muestra pulpar se extrajo de la cavidad y se colocaron en medio DMEM frío estéril.

Aislamiento de células madre

*Clínica de Odontopediatria, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

§Profesor de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

||Profesor e Investigador del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

Para llevar el aislamiento de las células madre, las pulpas dentales; se colocaron en una solución de 3mg/mL de colagenasa tipo I y 4mg/mL de dispasa durante 10 minutos. Pasado el tiempo de digestión se lavaron con medio DMEM con suero fetal bovino al 10% por 3 minutos.

Los extractos digeridos de las pulpas dentales se dejaron crecer en cajas de cultivo de 6 pozos en presencia del medio de cultivo modificado Eagle's suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisonea (0.3 µg/ml), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de piruvato de sodio, hasta obtener colonias clonogénicas, aproximadamente de 2 a 5 semanas de cultivo. El medio de cultivo antes mencionado se cambio cada tercer día, para garantizar el crecimiento celular.

Inmunocitoquímica

Para detectar los marcadores específicos STROH-1 y CD-44 las clonas de células madre aisladas de los extractos pulpares, se crecieron en cajas de cultivo de Lab-Tek de 8 pozos durante 3 días. Pasado el tiempo las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 minutos, se lavaron con buffer de fosfatos (PBS) por 2 minutos repitiendo tres veces. Para detectar los marcadores específicos las células se permeabilizaron con metanol frío durante 10 minutos y se incubaron con los anticuerpos específicos que reconocen a los epítipes STROH-1 y CD-44 a una

concentración de 1:100 incubados a 4°C durante 24 horas. Pasado el tiempo de reacción se lavaron 3 veces por 10 minutos con PBS-Tritón 100x para eliminar la señal inespecífica del anticuerpo. La señal se obtendrá por incubar con un segundo anticuerpo acoplado a Isotiocinato de fluoresceína (FITC) a una concentración de 1:1000. Esta señal se observo bajo el microscopio de fluorescencia y se tomaran fotos de 5 campos al azar para foto documentar la señal positiva de los marcadores.

Ensayo de Diferenciación celular

La determinación de la diferenciación celular se realizará por medio de utilizar un medio inductor de la biomineralización que contiene medio DMEM suplementado con 10% SFB, 50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerofosfato, 10^{-7} M de dexametasona y una solución de antibióticos compuesta de penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL). El medio se cambiara cada 2 días. El control de los ensayos de diferenciación fueron las células madres cultivadas en ausencia del medio inductor de la mineralización. Para analizar la diferenciación celular de las células madre derivadas de la pulpa dental, se evaluaron los niveles de expresión del gen que codifica para dos de las proteínas más importantes involucradas en el proceso de biomineralización: Sialoproteína ósea (BSP) y Osteopontina (OPN) por medio de la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR), por inmunohistoquímica utilizando los

anticuerpos policlonales anti-BSP y anti OPN a concentraciones de 1.500 y por detectar la presencia de nódulos mineralizados por medio de la tinción con rojo de Alizarina roja S.

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos de este estudio muestran que a partir de tejido pulpar utilizando métodos de digestión enzimática es posible aislar células o colonias individuales, después de un periodo de cultivo de 14 a 20 días. Esto concuerda con los resultados de otros estudios donde obtienen colonias celulares desde 5 a 15 días de cultivo celular a partir de explantes de tejido pulpar.³ Las células que se obtuvieron de las digestiones pulpares después de 14 días de cultivo celular (Figura 1 a y b); muestran una morfología de tipo fibroblástica, alargada y aplanada que se pueden ubicar en colonias clonogénicas, característica esencial de las células madre post-natales. Por otro lado, los ensayos inmunocitoquímicos para detectar marcadores membranales específicos de células progenitoras mesenquimales, muestran que las células presentes en nuestros cultivos derivados de las digestiones de las pulpas dentales humanas son positivas a los marcadores CD-44 y STRO-1 (Figuras 1 c y e). Estos ensayos inmunocitoquímicos concuerdan con estudios previos donde aislaron y caracterizaron células madres a partir de dientes exfoliados deciduos y de células madres a partir del ligamento

periodontal siendo positivas las colonias celulares a los marcadores CD-44 y STRO-1.⁵ Asimismo, estos marcadores (CD-44 y STRO-1) en combinación con marcadores como CD-146 (MUC-18), VCAM-1, entre otros; han sido extensivamente utilizados para caracterizar colonias altamente puras de células madre mesenquimales aisladas a partir de medula ósea.¹²⁻¹⁴ Lo cual nos ayuda a confirmar que las células aisladas en nuestro estudio son células progenitoras.

Las células madre se consideran células progenitoras capaces de responder a estímulos diferenciadores específicos. Para confirmar lo anterior expuesto, realizamos un estudio de diferenciación *in vitro*, donde utilizamos un estímulo que promovería la formación de nódulos mineralizados por medio de utilizar dexametasona en los medios de cultivo celular. Los resultados de los ensayos de diferenciación muestran que las células madre que recibieron dexametasona a una concentración de 10^{-7} M por 15 días de cultivo, son capaces de formar nódulos mineralizados (positivos a la tinción con Alizarina roja S) cuando se comparan con las células madre cultivadas en ausencia del estímulo mineralizante (Figura 2). Sin embargo para evaluar la diferenciación celular de las células madre derivadas de la pulpa dental hacia un fenotipo mineralizante analizamos la expresión de dos de las proteínas más importantes

*Clínica de Odontopediatría, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

§Profesor de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

||Profesor e Investigador del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

involucradas en el proceso de biomineralización: Sialoproteína ósea (BSP) y Osteopontina (OPN) por medio de inmunocitoquímica (Figura 3) y por medio de la técnica de RT-PCR (Figura 4).

Los resultados de los ensayos de inmunohistoquímica muestran que las células madre que recibieron dexametasona a una concentración de 10^{-7} M por 15 días de cultivo, son positivas a las proteínas BSP y OPN cuando se compararon con las células madre cultivadas en ausencia del estímulo mineralizante (Figura 3).

Asimismo, en la Figura 4 se puede apreciar que existe una expresión diferencial de los genes que codifican para BSP y OPN. El gen que codifica para BSP se observa con mayor expresión con respecto al gen que codifica para OPN en las células madre que recibieron dexametasona a una concentración de 10^{-7} M por 15 días de cultivo.

Ambas proteínas están involucradas en el proceso de biomineralización. Sin embargo el que exista una mayor expresión de BSP nos habla que la diferenciación de las células madre es completamente hacia un fenotipo mineralizante, ya que BSP es una proteína involucrada en la nucleación de cristales de hidroxapatita y se presenta entre el 8 al 12% del total de proteínas no colágenas del hueso alveolar, cemento radicular, dentina y algunas subpoblaciones del ligamento periodontal. Esta expresión nos indica el papel tan importante que juega la BSP en el proceso de mineralización debido a que es una molécula que se propone puede estar involucrada en el reclutamiento de

células progenitoras que darán origen a los linajes periodontales por medio de su secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) involucrada en la adhesión celular por medio de receptores a integrinas.¹⁶⁻¹⁸

Así mismo durante este tiempo experimental puede estar jugando su papel más destacado, llevar a cabo la fijación de iones de Ca^{++} en la matriz extracelular permitiendo la nucleación de cristales. Esto nos indica el periodo en el que se encuentra el proceso de mineralización debido a que la BSP se expresa en los periodos iniciales de la mineralización. Una vez que la nucleación se lleva a cabo la expresión de OPN es importante porque se propone que juega un papel en regular el crecimiento adecuado de los cristales de hidroxapatita.¹⁹ Estos resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por la literatura donde usando una metodología similar las células madres aisladas de dientes deciduos, células derivadas del ligamento periodontal y células madre mesenquimales de médula ósea han sido diferenciadas hacia células osteoblásticas y/o cementoblásticas, expresando marcadores como BSP, OPN, osteocalcina, fosfatasa alcalina, colágena tipo I entre otras y bajo otros estímulos diferenciadores a células adiposas, células neuronales, musculares entre otras.¹⁹⁻²¹

Conclusión

Nuestros resultados indican que las células derivadas de las digestiones de pulpas dentales humanas contienen subpoblaciones celulares

entre las cuales existen células progenitoras que expresan marcadores que las identifican como células madre post-natales.

Estas células madre derivadas de las pulpas dentales humanas, presentan una característica esencial que son clonogénicas y que pueden ser catalogadas como multipotenciales con capacidad de diferenciación hacia un fenotipo mineralizante.

Sin embargo, es necesario llevar más estudios para caracterizar el fenotipo al cual las células se han diferenciado con especial énfasis al fenotipo odontoblasto/osteoblástico para pensar en un futuro en un uso potencialmente clínico en terapias de regeneración dental.

Referencias

1. - Krebsbach P, D.D.S, Ph.D, Gehron P, Ph.D. Dental and Skeletal Stem Cells: Potencial Cellular Therapeutic for Craniofacial Regeneration. *Journal of Dental Education* 66(6): 766-772 (2002).
2. - Gronthos. S, Brahim. J, Li. W, Fisher. L.W, Cherman. N, Boyde. A. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res* 81 (8): 531-535 (2002).
3. - Gronthos. S, Mankani. M, Brahim J. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *J Cell biology* 97(25): 13625-13630 (2000).
4. - Batouli S, Miura M, Brahim J. Comparison of Stem- cell- mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. *J Dent Res* 82(12): 976-981 (2003).
- 5.- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Gehron Robey P, and Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 100: 5807–5812 (2003).
- 6.- Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodont Res* 41:547–553 (2006).
- 7.- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofacial Res* 8:191–199 (2005).
- 8.- Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Gehron-Robey P, Wang C, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364: 149–55 (2004).
- 9.- Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten AP, Gehron Robey P, and Shi S. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res* 81:531-535 (2002).
- 10.- Risbud M, Shapiro I. Stem cell craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofacial Res* 8: 54-59 (2005).

*Clínica de Odontopediatría, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

§Profesor de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

||Profesor e Investigador del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

- 11.- Shi S, Robey P, Gronthos S. Comparison of Human Dental Pulp and Bone Marrow Stromal Stem cells by cDNA Microarray Analysis. *J Bone Miner Res* 29(6): 532-539 (2001).
- 12.- Gronthod S, Zannettino A, Graves S. Differential Cell Surface Expression of the STRO-1 and Alkaline Phosphatase Antigens on Discrete Developmental Stages in Primary Cultures of Human Bone Cell. *J Bone Miner Res* 14(1): 47-56 (1999).
- 13.- Stewart K, Walsh S, Screen A. Further Characterization of Cells Expressing STRO-1 in Cultures of Adult Human Bone Marrow Stromal Cell. *J. Bone Miner Res* 14(8): 1345-1356 (1999).
- 14.- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S y Gehron-Robey P. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells* 19:180-192 (2001).
- 15.- Liu H, Gronthos S, and SHI S. Dental Pulp Stem Cells. *METHODS IN ENZYMOLOGY* 419:99-113 (2006).
- 16.- Ganns B, him RH and Sodek J. Bone sialoproteína. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:79-98 (1999).
- 17.- Hunter GK and Goldber HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoproteína. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8562-8565 (1993).
- 18.- Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodej J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 57:52-59 (1995).
- 19.- Giachelli CM and Steitz S. Osteopontin a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology* 19:615-622 (2000).
- 20.-Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, and Akamine A. Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *J Dent Res* 83:590-595 (2004).
- 21.- National Institutes of Health. Stem Cell Information. Stem Cell Basics. <http://stemcells.nih.gov/info/basics>
- 22.- Eridani S. Stem cells for all seasons? Experimental and clinical issues. *J R Soc Med* 95:5-8 (2002).

Relación de Figuras

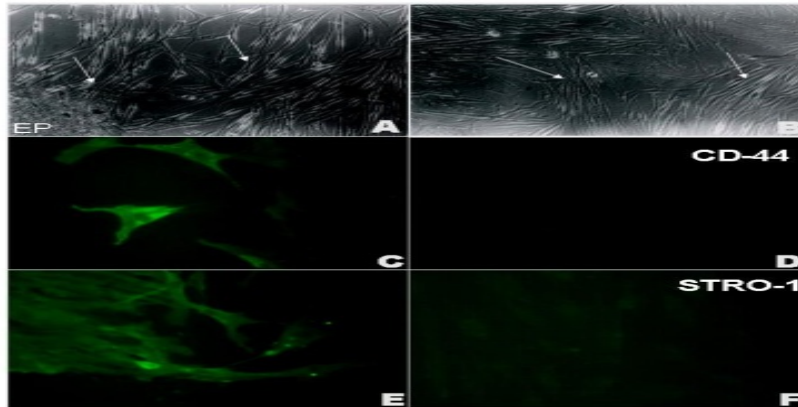


Figura 1. Fotografías donde se observan a las células madre migrando del tejido pulpar digerido después de 14 días de cultivo celular (A y B). Inmunofluorescencia de las células madre aisladas de los extractos pulpares contra epitopes superficiales de membrana CD-44 (C y D) y STRO-1 (E y F). El control son células en ausencia del primer anticuerpo. EP = extracto pulpar.

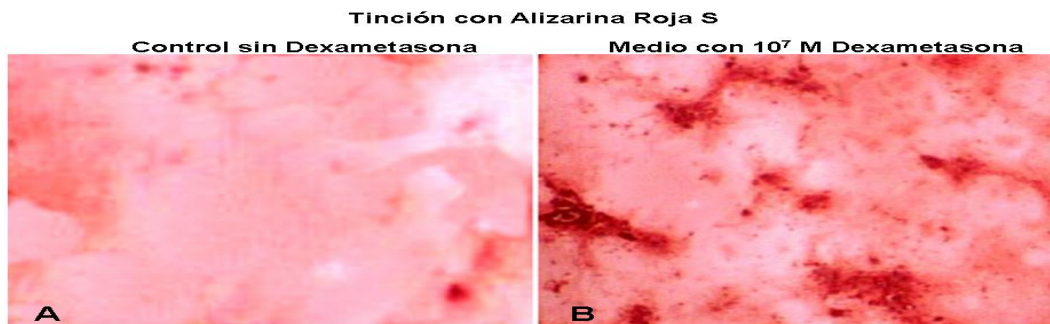


Figura 2. Nódulos de fosfato de calcio depositados por células madre diferenciadas con dexametasona (B) y control (A) teñidos por alizarina roja S.

*Clínica de Odontopediatría, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

§Profesor de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

|| Profesor e Investigador del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

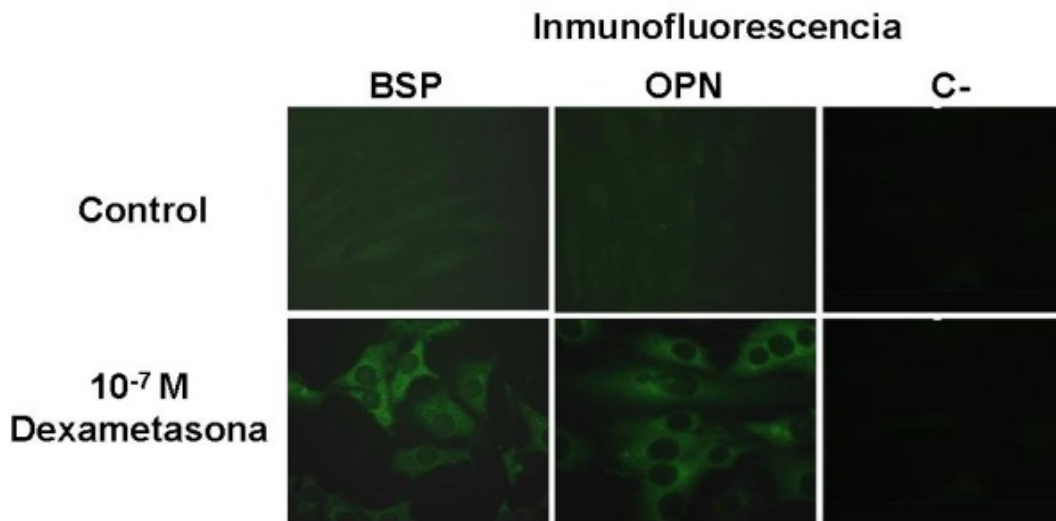


Figura 3. Inmunofluorescencia de proteínas involucradas en el proceso de mineralización BSP (A) y OPN (B) de células madre que fueron estimuladas a diferenciación celular. Control Negativo ausencia del primer anticuerpo.

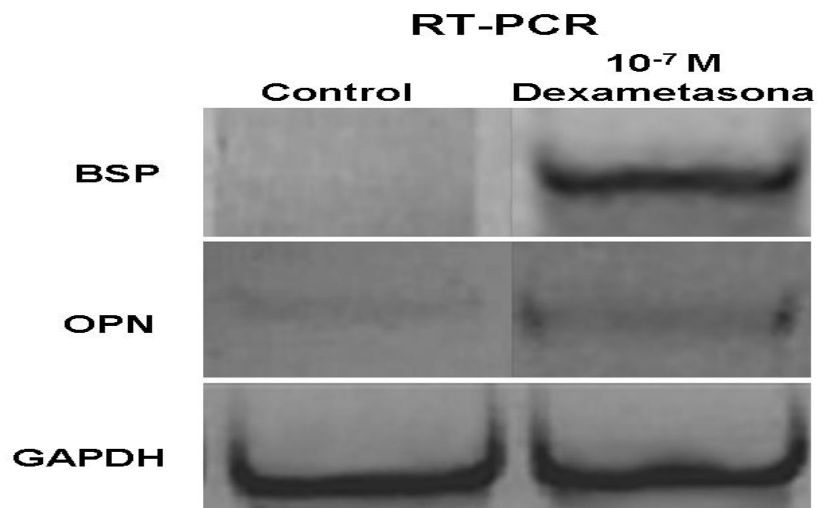


Figura 4.- RT-PCR de los genes que codifican para las proteínas involucradas en el proceso de mineralización BSP y OPN de células madre que fueron estimuladas a diferenciación celular con dexametasona. El control interno fue el gen que codifica para la GAPDH.

*Clínica de Odontopediatría, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

§Profesor de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

|| Profesor e Investigador del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.