

EN BUSQUEDA DE MARCADORES DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES DE LA PULPA DENTAL

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

Facultad de Odontología – Universidad Nacional de La Plata. 50 e/ 1 y 115 La Plata (1900)

Director | Prof. Dr. Merino Graciela. secyt_folp@hotmail.com

“Sin conflicto de interés”

Resumen

Al plantearse aislar y cultivar células madre de la pulpa dental, es importante conocer sus características morfológicas, inmunohistoquímica, ultraestructurales y moleculares. Respecto a la inmunohistoquímica se conocen moléculas marcadoras ubicadas en la superficie celular. Ellas tienen la propiedad de reconocer determinados anticuerpos. Las siglas utilizadas para su identificación se reconocen como CD (Cluster of Differentiation). El objetivo del presente trabajo fue diseñar una tabla, en base a evidencia científica, que permitiría una selección que conlleve a una mayor exactitud en el empleo de los marcadores en etapa inicial de una línea investigativa.

Summary

When considering isolate and grow stem cells from dental pulp it is important to know their morphological, immunohistochemical, ultrastructural and molecular characteristics. Regarding immunohistochemical marker molecules located on the cell surface are known. They have the ability to recognize certain antibodies. The abbreviations used for identification are recognized as CD (Cluster of Differentiation). The aim of this study was to design a table, based on scientific evidence, which would allow a selection that may lead to greater accuracy in the use of markers in initial stage of a research line.

Introducción

Para aislar y cultivar células madre de la pulpa dental, es importante tener en cuenta sus características morfológicas, estructurales, ultraestructurales, moleculares e inmunohistoquímica. Para abordar este ítem, se ha realizado una búsqueda bibliográfica para optimizar

la selección de marcadores celulares. Las células madre denominadas multipotentes poseen gran capacidad proliferativa y de diferenciación a distintos linajes celulares. Durante las primeras investigaciones, se pensó que estas células solo podrían dar origen a

células de su propio tejido o de linajes procedentes de su misma capa embrionaria, sin embargo en la actualidad se considera la posibilidad de que ellas puedan generar tipos celulares de otros tejidos cuyo origen podría ser de su misma capa embrionaria o de capas embrionarias distintas a las de su origen. En cambio, las células madre totipotentes son aquellas que pueden dar origen a un embrión, el cual puede desarrollarse a un individuo completo y pudiendo generar todas las estirpes celulares. (1). Las células madre pluripotentes, están potencialmente preparadas para desarrollar los tejidos de un individuo pero no los tejidos extraembrionarios. Las

células unipotentes, son aquellas que pueden diferenciarse en un solo tipo celular. Siendo calificadas por algunos autores como células en tránsito precursoras (2). Ejemplo de célula unipotentes son las que se encuentran a nivel de la capa basal de la epidermis. Respecto a las células madre pluripotentes, éstas están potencialmente preparadas para desarrollar los tejidos de un individuo pero no los tejidos extraembrionarios. El objetivo de éste trabajo es diseñar una tabla en base a la evidencia científica que optimice la selección de marcadores que identifiquen células madres de la pulpa dental.

Desarrollo

De acuerdo a la Real Academia de Ingeniería se entiende como marcador a aquellos antígenos (proteínas) de superficie de todas las células. Algunas de estas proteínas se encuentran solo en ciertos tipos de células. Por ejemplo, el CD16 es la proteína que se expresa específicamente en neutrófilos, células NK y macrófagos y sirve para hacer un seguimiento de este tipo de células.(7) Las siglas CD corresponden al término en inglés "Cluster of differentiation" en inglés que significa cúmulo de diferenciación, son moléculas marcadoras ubicadas en la superficie celular, con la propiedad de reconocer ciertos anticuerpos. Estas se usan para identificación de tipos celulares, estadios de diferenciación celular y actividad de las mismas. Constituyen un sistema de antígenos de superficie celular, que pueden ser caracterizados mediante anticuerpos monoclonales. Sabiendo que un alto porcentaje de las células pulpares son de origen mesenquimático es preciso tener en cuenta los criterios propuestos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC) para definir células madre mesenquimales. Ahora bien, primero, deben ser adherentes en cultivos; segundo expresar los antígenos CD 73, CD 90 y CD 105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD 34, CD 45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y tercero deben ser capaces de diferenciarse in vitro en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo. Otros dos aspectos importantes deben considerarse para clasificar células madre mesenquimales como su capacidad de realizar procesos de autorrenovación, es decir, que durante la renovación celular solo una de las células hijas inicia la diferenciación celular y además que sean capaces de desarrollar plasticidad clonogénica o diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo. Continuando con la investigación de los marcadores se destaca otras funciones de los mismos en este caso realizada por el CD 73 el cual es una glicoproteína con capacidad de hidrolizar nucleótidos

extracelulares para permitir el ingreso de nucleósidos generando ATP y GTP (guanosa trifosfato) como fuente de energía en células diferenciadas. Este marcador se cree que está relacionado con mecanismos de adhesión celular ya que coexpresa con moléculas tipo $\alpha 2$ integrinas. El CD 90 es una proteína que es parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas, si a estas células se las somete a un estrés celular mecánico se diferencian hacia células similares a osteoblastos, con disminución de su expresión, de este modo se demuestra que este antígeno es un marcador de precursores mesenquimales tempranos de osteoblastos. CD 105 es una glicoproteína conocida como endoglina, es uno de los receptores del Factor Transformante de Crecimiento-B ó TGF- α que puede encontrarse en monocitos activados, macrófagos activados, precursores eritroides, fibroblastos, células foliculares dendríticas, melanocitos, células cardíacas, células vasculares de músculo liso, células endoteliales; también interviene en la regulación de distintos componentes de la matriz extracelular, como fibronectina y colágeno, razón por la cual se cree que está relacionada con procesos de angiogénesis y reparación vascular, siendo determinante en la generación de cardiomiocitos.(8). Otros marcadores además de los mencionados por la ISCT, y propuestos por otros autores consultados, fueron STRO-1, CD44 y CD166 para la identificación de células mesenquimales. El STRO-1 descubierto en 1991 es un antígeno marcador que se expresa en el desarrollo temprano de células madre de médula ósea. CD44 es una molécula de adhesión que actúa mediante la interacción con el ácido hialurónico, osteopontina, colágeno, anquirina, fibronectina y metaloproteinasas y contribuye en procesos de adhesión, migración y proliferación de CMM. La molécula CD166 o ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesión Molecule) interviene en la hematopoyesis involucrando a las CMM, participando en el mantenimiento del estado indiferenciado de células madre hematopoyéticas y CMM (8).

En biociencias, CD34 es una glicoproteína de 110 kD es una de las moléculas de adhesión de la superficie de adhesión que se expresa selectivamente en las células madre precursoras de la hematopoyesis. Está codificada por el gen del mismo nombre localizado en el brazo corto del cromosoma 1 humano (9-10). Ante la diversidad de marcadores que se expresan en las células madre, hemos diseñado una tabla para poder observar que tipos de células fueron marcadas con mayor frecuencia respecto del origen y lugar que se encontraban las células en el organismo y especialmente en la pulpa dental (fig 1).

Conclusión

El conocimiento sobre marcadores que identifiquen las células madre de la pulpa dental permite una adecuada selección de los mismos.

Referencias Bibliográficas

- 1-Hernández Ramírez Porfirio, Dorticós Balea Elvira. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2004 Dic.
- 2-Rosenthal N. Prometheus' s vulture and the stem-cell promise. N Engl J Med 2003;349:267-74.
- 3-Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. Exp Hematol 2002;30:896-904.
- 4-Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Names RN, et al. Adult Hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. Nat Med 2002;8:607-12.
- 5-Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell 2001;105:829-41.
- 6-Malkon RA, Poulsan R, Forbes S, Wright NA. An Introduction to stem cells. J Pathol 2002;197:419-23.
- 7-Real Academia de Ingeniería. Diccionario Español de Ingeniería.
- 8-Arévalo Romero J. A, Páez Guerrero, D. M., Rodríguez Pardo V.M.. Células madre mesenquimales: Características biológicas y aplicaciones clínicas. Publicación científica en ciencias biomédicas. 2007; 5 ; 8: 177-184.
- 9-Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B (Jan 1992). «Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a slalom of human hematopoietic stem cells». Journal of Immunology 148 (1): 267-71.
- 10-Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG (Apr 1992). «Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen». Genomics 12 (4): 788-94.

Tabla 1 | Tabla representativa de los marcadores más utilizados para la caracterización de células madre pulpares.

Marcadores	Pulpa	
	Positivos	Negativos
CD11		
CD11A		
CD11b		
CD14		
CD24	1/7	
CD28		
CD29	1/7	
CD33		
CD34	2/7	
CD35		
D44	5/7	
CD45	1/7	1/7
CD59		
CD71		
CD73	2/7	
CD90	4/7	
CD105	2/7	
CD106		
CD117	1/7	
CD133	1/7	
CD146	1/7	
CD166		
FGFR3	1/7	
NESTINA	1/7	
OCT4	1/7	
SH2		
SH3		
SH4		
STRO1	5/7	
VCAM1	1/7	

Tabla 2 | Marcadores más utilizados para la caracterización de células madre pulpares.

1. Células mesenquimáticas de Médula Ósea	cd29+	cd29+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
2. C.M. De Med. Osea, Tej. Adiposo, Sangre, Cordón Umbilical, Dermis, Piel	cd29+	cd44+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd105+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
3. Células Madres pulpa dental (ver trabajo)	cd29+	cd44+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
4. Células madres de origen dentario	cd29+	cd44+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
5. Células madres provenientes de pulpa y folículo dentario humano	cd29+	cd44+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
6. Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSC s como terapia celular en odontología (ver trabajo)	cd24+	cd29+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
7. Células madre adultas (de médula ósea)	cd29+	cd44+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
8. Aislamiento y cultivo de células madre posnatales de dientes primarios	cd29+	cd44+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
9. Bioingeniería y su aplicación en la ortodoncia (de pulpa dental humana)	cd29+	cd44+	cd44+	cd44+	cd59+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd146+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
10. Pulpa dental. Caracterización y adaptación a diversas condiciones de oxígeno	cd29+	cd34+	cd44+	cd44+	cd45+	cd71+	cd73+	cd90+	cd90+	cd106+	cd117+	cd133+	cd166+	sh2+	sh3+	sh4+	Stro1+	VCAM1+	cd11-	cd11a-	cd11b-	cd14-	cd28-	cd33-	cd34-	cd35-	cd45-
	1	4	2	8	1	1	2	3	7	3	2	2	1	1	1	1	2	2	1	6	1	1	-1	-1	-1	-1	-3

(*) Según el trabajo N° 3 (*) estos dos marcadores han sido extensivamente utilizados para caracterizar colonias altamente puras de células madres mesenquimales aisladas a partir de médula ósea.

(&) Según este trabajo n° 5 (&) los marcadores cd 44, cd 73, cd 90 y cd 105 marcaron al 99% de las células y 3% lo hicieron los marcadores cd 34, cd38, cd 45 y cd 54.

(#) Trabajo recomendado para su lectura.

(-) La caracterización de estas células la realizamos identificando la expresión de los marcadores CD 117, FGFR3, CD 90, STRO-1, CD34, CD44 y CD45 mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo. Los resultados previos obtenidos revelan un inmunomarcaje del 13.2 % de células CD117+, mientras un porcentaje del 17.5 % de células FGFR3+ (61). Estos resultados demuestran la presencia de células precursoras en la pulpa dental, probablemente de la línea hematopoyética o mesenquimatosas. Se requieren estudios de caracterización adicionales de las células que expresan el fenotipo FGFR 3+/CD 117+ con otros marcadores específicos de células Madres como STRO-1, CD-90, SH2, SH3, flujo, técnicas de biología molecular como RT-PCR para analizar el nivel de expresión de ARNm de genes propios de células madres mesenquimales (hMSCs) o células madres Hematopoyéticas(hHSCs).(10)