

|Caracterización morfofuncional de células madre de tejidos dentales en cultivo. Bioestimulación con láser. Ensayo "IN VITRO".

|Morphofunctional characterization of mother cells of dental fabrics in culture. Bioestimulation with laser. "IN VITRO" test.

- Merino, Graciela; Dewey Ricardo A; Mayocchi, Karina; Blasetti; Nahuel; Basal Roxana; Dorati, Pablo; Butler, Teresa; Darrigran, Lucas; De Vita, Lucas -

## |RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron: Caracterizar morfológica y funcionalmente células madre mesenquimales (CMM) de pulpa, evaluar distintos métodos de cultivo y establecer un método de irradiación con láser de las células cultivadas. Se utilizaron terceros molares obtenidos en el Hospital Universitario con consentimiento del paciente y aprobación de Comité de Bioética de la FOLP-UNLP. Extraídas las piezas, se trasladaron al Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la FOLP-UNLP. Se ensayaron distintos métodos de obtención y aislamiento de células: 1. digestión enzimática 2. obtención de explantos. Las células fueron caracterizadas mediante el estudio de marcadores de superficie específicos de CM, como CD73, CD90, CD105 y CD146 por citometría de flujo (Citometer BD FAC SCalibur), se estudiaron morfológicamente las células mediante MET y microscopio invertido con contraste de fases (Leica mod.DM IL LED). Posteriormente se cultivaron  $5 \times 10^4$  células en cada placa de Petri de 35 mm de diámetro (día 0). Luego de 24 horas (día 1) las placas fueron divididas en 3 grupos: G1.8: se aplicó densidad energética de  $1.79 \text{ J/cm}^2$ , G3.6: se aplicó densidad energética de  $3.57 \text{ J/cm}^2$ , GC: Sin irradiación. Se utilizó láser diodo de 940 nm, con potencia regulada a 1W a t:48 y 72 hs. Morfológicamente se evidenciaron mitocondrias, vesículas y gránulos de secreción. En cultivo se observaron colonias de células fusiformes y estrelladas, formando agregados. La caracterización fenotípica por citometría de flujo para marcadores CD73, CD90, CD105 y CD146 resultó positiva. El método de irradiación con láser pudo adaptarse a los procesos de cultivo utilizados en el laboratorio. Se ha puesto a punto un eficiente método de obtención de CMM dentales, y podemos concluir que el mejor método para obtención, aislamiento y expansión es el del explanto. La morfología celular es un buen indicador de la calidad y desarrollo del cultivo.

**Palabras clave:** CULTIVO - CÉLULAS MADRE - LASER

## |SUMMARY

The objectives of this work were: Morphologically and functionally characterize pulp mesenchymal stem cells (CMM), evaluate different culture methods and establish a low frequency laser irradiation methods for cultures. Third molars obtained at the University Hospital with the patient's consent and approval of the Bioethics Committee of the FOLP-UNLP was used. Once the pieces were removed, they were transferred to the Molecular Biology and Biotechnology Laboratory of the FOLP-UNLP. Different methods of obtaining and isolating cells were tested: 1. enzymatic digestion 2. obtaining explants. The cells were characterized by studying specific surface markers of CM, such as CD73, CD90, CD105 and CD146 by flow cytometry (Citometer BD FAC SCalibur), the cells were morphologically studied by MET and inverted microscope with phase contrast (Leica mod.DM IL LED). Subsequently,  $5 \times 10^4$  cells were cultured in each 35 mm diameter Petri dish (day 0). After 24 hours (day 1) the plates were divided into 3 groups: G1.8:  $1.79 \text{ J/cm}^2$  energy density was applied, G3.6:  $3.57 \text{ J/cm}^2$  energy density was applied, GC: No irradiation. 940 nm diode laser was used, with regulated power at 1W at t: 48 and 72 hours. Morphologically, mitochondria, vesicles and secretion granules were evidenced. In culture, colonies of fusiform and star cells were observed, forming aggregates. The phenotypic characterization by flow cytometry for markers CD73, CD90, CD105 and CD146 was positive. The laser irradiation method was suitable to be used in the laboratory culture procedures. An efficient method of obtaining dental CMM has been developed, and we can conclude that the best method for obtaining, isolating and expanding is that of the explant. Cellular morphology is a good indicator of crop quality and development.

**Keywords:** CULTURE - STEM CELLS - LASER

## INTRODUCCIÓN

Las células madre (CM) son células indiferenciadas que tienen la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse a células de distintos tejidos. Se las puede aislar de tejidos adultos especializados, como la médula ósea, tejido adiposo, tejido de cordón umbilical, entre otros. Recientemente distintas poblaciones de CM mesenquimales (CMM) han sido aisladas de varios tejidos dentales. El primer tipo de CM derivada de tejidos dentales fue descrito por Gronthos y colaboradores en el año 2000<sup>(1)</sup>. Hasta ese momento, si bien se conocía que existía un mecanismo de reparación y formación de dentina en respuesta a desgaste de tipo mecánico o causado por bacterias, no se conocía cual era la población precursora que reside dentro de la pulpa dental. Gronthos aisló por primera vez una población de células con alta capacidad proliferativa a partir de pulpa dental humana adulta, a las que denominó DPSCs, y las comparó con las CMM derivadas de médula ósea (BMMSCs). En un estudio in vivo en ratones, pudo demostrar que el tejido conectivo generado a partir de las DPSCs implantadas mostraba una estructura de tipo dentino-pulpar con presencia de odontoblastos a lo largo de dentina generada, mientras que los implantes de BMMSCs generaron estructuras y tejidos similares al presente en tejido óseo<sup>(2)</sup>. Hasta el momento se han descrito al menos 4 subpoblaciones de CM derivadas de distintos tejidos dentales: CM de pulpa dental (DPSCs), CM de pulpa de dientes primarios (SHED), CM de papila apical (SCAP), CM de ligamento periodontal (PLSCs)<sup>(3,4)</sup>. El mesénquima dental es considerado tejido ecto-mesenquimal debido a su interacción en la fase embrionaria con la cresta neural, por lo que las células presentes en él tienen la capacidad de diferenciarse también a células de tejidos no mesodérmicos (por ejemplo células progenitoras de tejido neural)<sup>(5)</sup>. En condiciones normales en el adulto, las CM dentales tienen un rol muy importante en la reparación y homeostasis del diente. Por ejemplo, ante un daño moderado a la dentina, los odontoblastos son estimulados a generar nueva dentina, pero ante lesiones más severas las DPSCs se diferencian a odontoblastos que reparan la dentina dañada para proteger a la pulpa expuesta. De igual manera las PLSCs tienen un activo rol en la renovación del ligamento periodontal<sup>(3)</sup>. Hasta el momento se ha estudiado el potencial terapéutico de las CM derivadas del tejido dental (principalmente de las DPSCs y SHEDs) en varias enfermedades en modelos in vitro y animales. Enfermedades como Parkinson, isquemia cerebral, infarto de miocardio, diabetes, lupus, además de las enfermedades orales como caries, enfermedad periodontal y atrofia de hueso alveolar, han sido blanco de tratamiento con estas células en modelos animales, obteniendo buenos resultados<sup>(10)</sup>. En contraste, hay muy pocos reportes de utilización de estas células en casos clínicos, entre los que podemos citar el tratamiento de pulpitis irreversible, regeneración de hueso alveolar, enfermedad periodontal y un estudio en pacientes con diabetes tipo 2 en fase de reclutamiento<sup>(10)</sup>. Respecto al modo de acción, si bien hay reportes que indican que las DPSCs pueden diferenciarse e integrarse directamente al tejido tratado, participando directamente en la regeneración del tejido, hay estudios que afirman que las células migran al área dañada y estimulan la reparación mediante efectos paracrinos. Las células en cultivo presentan morfología similar a las CMM derivadas de médula ósea mostrando heterogeneidad en tamaño y forma, pero siempre de tipo fibroblastoide. Contienen un núcleo central

redondo u oval, con múltiples nucléolos (que indica transcripción activa de ADN y síntesis de ARN). Se observan múltiples vacuolas citoplasmáticas<sup>(6)</sup>. Se caracterizan por la expresión de marcadores de superficie como CD73, CD90 y CD105 (específicos de células mesenquimales definidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular - ISCT-), CD146 y STRO-1<sup>(5-8)</sup>. Actualmente aún no existe un consenso respecto a los métodos de extracción, purificación y expansión de estas células, por lo que es necesario optimizar todo el proceso de obtención celular para alcanzar un producto de buena calidad y número suficiente de células. Existen varias técnicas de aislamiento que pueden aplicarse para la obtención de las CM de diferentes tejidos dentales, el más utilizado siempre ha sido el de disgregación del tejido por digestión enzimática<sup>(1,8,9)</sup>. Este método si bien es útil para aislar células desde algunos tejidos (por ejemplo tejido adiposo), resulta inadecuado para el aislamiento de células de tejidos con una matriz extracelular con alta densidad fibrilar (como es el caso de la pulpa dental y de tejido de cordón umbilical por ejemplo).

## OBJETIVOS

- Caracterizar morfológica y funcionalmente células madre mesenquimales (CMM) de pulpa, evaluar distintos métodos de cultivo y establecer un método de irradiación con láser de las células cultivadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó como material de partida terceros molares obtenidos en el Hospital Universitario con el consentimiento del paciente y la aprobación de Comité de Bioética de la Facultad de Odontología de la UNLP. Una vez extraídas las piezas, se lavaron en solución fisiológica estéril, se colocaron en medio de cultivo para transporte y se trasladaron refrigeradas inmediatamente al Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Odontología de la UNLP. Se ensayaron distintos métodos de obtención y aislamiento de células derivadas tanto de pulpa, saco y ligamento periodontal: 1.- digestión enzimática con colagenasa y cultivo de la suspensión celular obtenida en placas de Petri de 9 cm<sup>2</sup>; 2.- obtención de explantos de 1mm<sup>2</sup> a partir de los tejidos y cultivo en placas de Petri de 9 cm<sup>2</sup>. En todos los casos, el cultivo se realizó en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> (p0). El medio fue renovado cada 5 días. Al alcanzar una confluencia de 80%, las células fueron repicadas a botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (p1) y cultivadas durante 10 días más hasta alcanzar nuevamente 80 % de confluencia. Las células fueron caracterizadas mediante el estudio de marcadores de superficie específicos de CM, como CD73, CD90, CD105 y CD146 por citometría de flujo (Citometer BD FAC SCalibur). La pulpa extirpada, previo al procesamiento, se estudió morfológicamente mediante microscopía electrónica de transmisión. En cada paso del cultivo celular se realizaron controles morfológicos con microscopio invertido con contraste de fases (Leica mod.DM IL LED) acoplado a un sistema de registro fotográficos. Para evaluar el método de la irradiación con láser sobre las células en cultivo, se cultivaron 5x 10<sup>4</sup> células en cada placa de petri de 35 mm de diámetro (día 0). Luego de 24 horas (día 1) las placas fueron divididas en 3 grupos que recibieron los siguientes tratamientos:

- Grupo 1.8: Fueron estimuladas con una densidad energética de 1.79 J/cm<sup>2</sup>
- Grupo 3.6: Fueron estimuladas con una densidad energética de 3.57 J/cm<sup>2</sup>
- Grupo control: Sin irradiación

Se utilizó un laser diodo de 940 nm, con la potencia regulada a 1W. El efecto de la irradiación sobre la proliferación celular fue medido a las 48 y 72 hs mediante control microscópico y conteo celular en cámara de Neubauer.

## RESULTADOS

Previo al procesamiento, se observó morfológicamente la pulpa dental mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), destacándose la presencia de células de morfología variable, con signos que indican una intensa actividad metabólica. Se evidencian mitocondrias en todas las células y gran cantidad de vesículas y gránulos de secreción (figura 1.A, 1.B, 1.C). En cultivo se observaron la formación de numerosas colonias, de células fusiformes y estrelladas, formando agregados en forma irradiada, paralelas unas a otras. 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 (figura 1.F). Los cultivos derivados de los tejidos tratados con colagenasa (figura 1.E) tardaron aproximadamente 21 días en llegar al estado de semiconfluencia, mientras que los derivados de los tejidos sin tratamiento enzimático ó explantos (figura 1.D) demoraron en promedio 14 días en alcanzar el 80% de confluencia. En ambos casos se observaron células con morfología de tipo fibroblástica, alargadas y aplanadas ubicadas en colonias clonogénicas, característica esencial de las células madre adultas.

La caracterización fenotípica 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 3 marcadores (tabla 1).

El método elegido para la irradiación con laser de baja potencia resulto apto para ser utilizado durante el proceso de cultivo celular, sin afectar el crecimiento de las células ni el desarrollo del cultivo. La irradiación con láser de baja potencia tendría un efecto estimulante sobre la proliferación celular al aplicar una densidad energética de 3.57 J/cm<sup>2</sup>, la densidad energética de 1.79 J/cm<sup>2</sup> no tuvo efecto alguno sobre la proliferación celular (tabla 2). Este efecto estimulante pudo observarse a las 48 hs luego de irradiación. A las 72 horas se obtuvieron conteos similares en los tres grupos. Esto puede deberse a que el efecto estimulante inicial del láser haya quedado compensado por el efecto parácrino que poseen los factores de crecimiento que estas mismas células liberan al medio de cultivo durante el proceso mitótico.

	CD 73	CD 90	CD 105
PULPA	99,22%	85,51%	62,01%
SACO	99,11%	96,61%	92,91%

Tabla 1. Porcentaje de células que expresan cada marcador de superficie determinados por citometría de flujo.

	CONTROL	1.79 J/cm <sup>2</sup>	3.57 J/cm <sup>2</sup>
RANGO	36000-57000	39000-42000	48000-66000
PROMEDIO	46500 células	40500 células	55500 células

Tabla 2. Conteo celular de cultivos irradiados a las 48 horas luego de la irradiación.

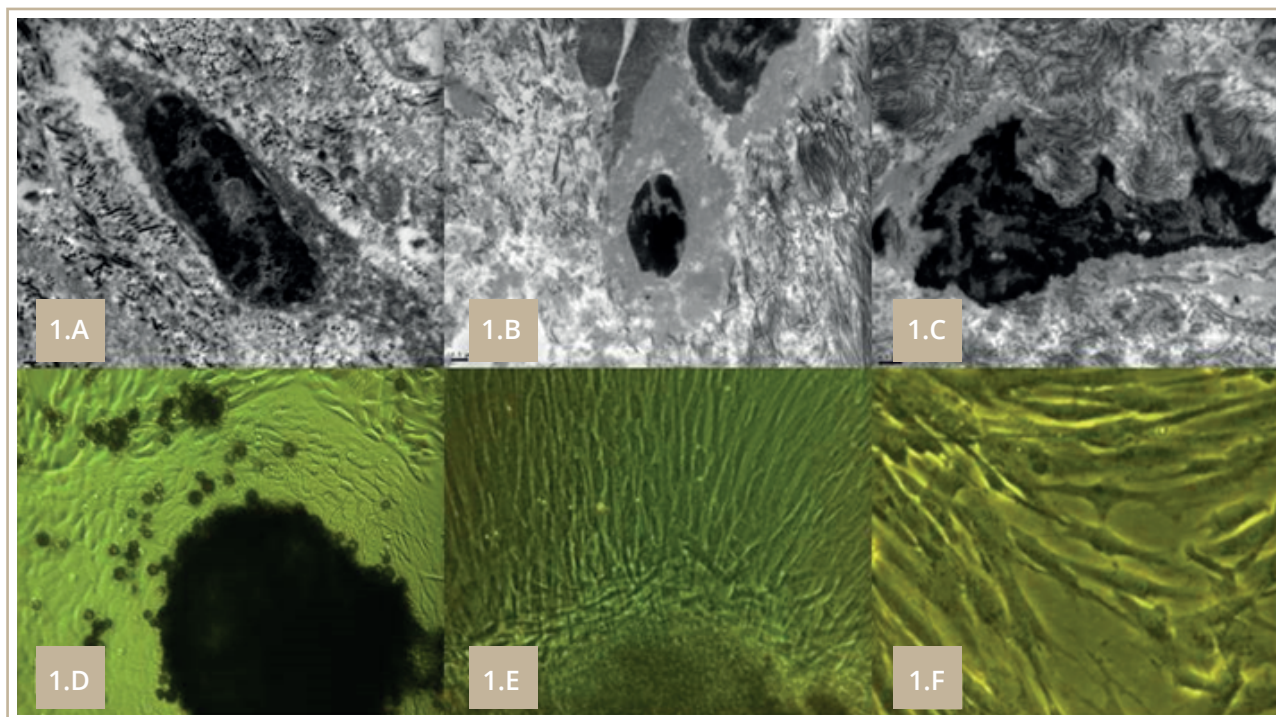


Figura 1. Observación microscópica. A,B,C) Microscopía electrónica de transmisión. D,E,F) Microscopía con contraste de fases: D) Método de explantos (día 14); E) Tratamiento con colagenasa (día 21); F) Células con morfología fusiforme similar a fibroblastos. Ver texto para más detalles.

## DISCUSIÓN

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. Respecto a la estimulación de los cultivos con láser de baja potencia, aquí sólo hemos realizado una primera aproximación al tema para poner a punto la técnica y condiciones necesarias para la irradiación de acuerdo a los materiales y equipos disponibles. La potencia y densidad energética fueron seleccionadas en base a una revisión bibliográfica sobre el tema (11-15), y si bien hay mucha diversidad en cuanto al tipo de láser usado, la longitud de onda y la potencia del láser, la mayoría de los trabajos coinciden en que la densidad energética debe estar entre 1 y 3 Joules por cm<sup>2</sup> (13-15). De confirmar nuestros resultados preliminares, estaríamos en condiciones de estudiar el efecto de la estimulación sobre la pulpa dental (explantos) antes del inicio del cultivo, lo que nos permitiría desarrollar un modelo para el estudio in vitro del efecto del láser en la reparación y regeneración de los tejidos dentales en la clínica.

## CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado y puesto a punto un eficiente método de obtención de células progenitoras mesenquimales derivadas de distintos tejidos dentales, y podemos concluir que el mejor método para obtención, aislamiento y expansión es el del explanto, ya que obtiene mayor número de células en menos tiempo, lo que es coincidente con la bibliografía publicada al respecto. La morfología celular es un buen indicador de la calidad y desarrollo del cultivo y puede usarse como un control de calidad biológico de rutina en este tipo de procesos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, P. Gehron Robey, and S. Shi; *PNAS Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo*; S.; December 5, 2000; vol. 97 no. 25.
- 2- Huang, S. Gronthos, and S. Shi; *Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine*; *J Dent Res* 88(9):792-806, 2009
- 3- Yasui et al. *Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential*; *Inflammation and Regeneration* (2017) 37:8
- 4- Munévar Niño et al *Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología*; *Revista Odontológica Mexicana* (2014) ; Vol. 18 (2): 156:163
- 5- Carrillo-Mendigaño N, García-Robayo DA, Otero-Mendoza LM. *Aislamiento y capacidad de osteodiferenciación de las células madre provenientes del ligamento periodontal y pulpa dental*. *Rev. CES Odont* 2015; 28(2): 20-34.
- 6- 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
- 7- Yoichi Yamada et al. *Clinical Potential and Current Progress of Dental Pulp Stem Cells for Various Systemic Diseases in Regenerative Medicine: A Concise Review*. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1132
- 8- Marchesin R et al. *Effect of Low-Energy Laser Irradiation on Colony Formation Capability in Different Human Tumor Cells In Vitro*. *Lasers in Surgery and Medicine* 9:59-62 (1989)
- 9- Galvão Barboza CA et al. *Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells*. *einstein*. 2014;12(1):75-81
- 10- Fernandes AP et al. *Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth*. *J. Appl. Oral Sci., Bauru*, v. 24, n. 4, p. 332-337, Aug. 2016