

MULTIPOTENCIALIDAD DE LA POBLACIÓN CELULAR DE LA PULPA DENTAL HUMANA MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO

MULTIPOTENTIALITY OF THE CELLULAR POPULATION OF HUMAN DENTAL PULP THROUGH FLOW CYTOMETRY

Alcalá-Benites Maritza^{1a}, Ayón-Haro Esperanza R. ^{1b}

RESUMEN

Objetivo: Determinar la multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental humana mediante citometría de flujo . **Materiales y métodos:** Estudio descriptivo, transversal y prospectivo realizado en la población celular de 04 dientes de pacientes atendidos en el Centro Odontológico de la Universidad de San Martín de Porres. Los pacientes fueron informados del presente estudio y firmaron el consentimiento de donación voluntaria de sus dientes extraídos. La muestra fue la pulpa dental humana aislada por disgregación enzimática y ésta fue analizada mediante citometría de flujo utilizando los marcadores CD90, CD105, CD45, CD34, CD117, CD11b, CD3. **Resultados:** Los rangos que se obtuvieron de los marcadores positivos para células madre mesenquimales fueron, para CD90 (57.25%-66.21%), del marcador CD105 fue (2.69%- 21.59%) y negativo (0%) a los marcadores CD45, CD34, CD11b, CD3, CD117. Para la viabilidad celular, el rango que se obtuvo del marcador 7-AAD fue de (77.11%-96.41%). **Conclusiones:** La población celular de la pulpa dental humana presenta expresión de multipotencialidad con diferentes porcentajes.

Palabras Clave: Multipotencialidad; citometría; pulpa dental. (Fuente: DeCS BIREME)

ABSTRACT

Objective: To determine, the multipotentiality of the cell population of human dental pulp by flow cytometry. **Materials and methods:** A descriptive, cross-sectional and prospective study was carried out in the cell population of 04 teeth of patients who attended at the Dental Center of the University of San Martín de Porres. The patients were informed of the present study and signed the voluntary donation consent of their extracted teeth. The sample was the human dental pulp isolated by enzymatic disintegration and analyzed by flow cytometry using the markers CD90, CD105, CD45, CD34, CD117, CD11b, CD3. **Results:** The ranks obtained from the positive markers for mesenchymal stem cells were, for CD90 (57.25% -66.21%), the CD105 marker was (2.69%-21.59%) and negative (0%) to the CD45 markers, CD34, CD11b, CD3, CD117. For cell viability, the range obtained from the 7-AAD marker was (77.11% -96.41%). **Conclusions:** The cell population of the human dental pulp presents multipotential expression with different percentages.

Keywords: Multipotentiality; cytometry; dental pulp. (Source: MeSH NLM)

Recibido: 03 de julio de 2018

Aprobado: 20 de setiembre de 2018

Publicado: 30 de setiembre de 2018

¹ Laboratorio de Investigación, Universidad de San Martín de Porres, Facultad de Odontología. Lima, Perú

^a Bachiller en odontología

^b Doctora en Odontología. Jefa del Laboratorio de Investigación

Correspondencia:

Esperanza R. Ayón Haro

Correo electrónico: eayonh@usmp.pe

Este es un artículo Open Access distribuido bajo la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial- Compartir Igual 4.0



Citar como: Alcalá-Benites M, Ayón Haro E. Multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental humana mediante citometria de flujo. KIRU. 2018; 15(3): 127 - 133. <https://doi.org/10.24265/kiru.2018.v15n3.04>

INTRODUCCIÓN

La pulpa dental posee una importante población celular que cuenta con odontoblastos, fibrocitos, fibroblastos, células madre mesenquimales, macrófagos y linfocitos¹. Se han realizado estudios donde se ha demostrado la multipotencialidad de una célula madre en la pulpa dental². La multipotencialidad corresponde a la capacidad de la célula para dar origen a distintos tipos celulares de un mismo tejido o capa embrionaria³. Teniendo como base estudios que nos muestran que las células madre de la pulpa dental humana pueden formar tejido osteogénico, condrogénico, adipogénico, miogénicos y neurales⁴.

En el Perú no se ha desarrollado estudios en base a la expresión de multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental mediante la prueba de citometría de flujo. La importancia del estudio de las células madre de la pulpa dental corresponde a su aplicación en campos de la odontología, como la periodoncia, cirugía oral y endodoncia. La capacidad de células madre de producir hueso alveolar, ligamento periodontal y cemento disminuiría la utilización de injertos óseos y a la misma vez reemplazaría tejidos perdidos a causa de enfermedad periodontal⁵. En el campo de cirugía ayudaría a procesos de neoformación para tratar problemas óseos maxilo-mandibulares⁶. Además, la terapia con células madre ayudaría a diseñar vasos sanguíneos funcionales con el propósito de formar pulpa dental normal modificando el tratamiento endodóntico⁷. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC) debido a la ambigüedad e inconsistencia que se ha dado en los últimos años, ha establecido los siguientes criterios de identificación de células madre mesenquimales únicamente para fines de investigación.

- a) Utilizando citometría de flujo, los marcadores CD105, CD90 y CD73 deben presentar una expresión positiva $\geq 95\%$ y los marcadores CD45, CD34, CD11b, CD14 y CD19 deberían tener una expresión $\leq 2\%$ o negativa.
- b) Las células madre mesenquimales deben ser adherentes al plástico, mantenerse aún después de su expansión en los pasajes de los cultivos.
- c) La capacidad de diferenciación en cultivo in vitro de las células madre mesenquimales debe ser hacia osteoblastos, condrocitos y adipocitos⁸

Estudios sugieren que las células de la pulpa dental constituyen una población celular heterogénea y presentan una población de células madre multipotentes, proliferativas y autorenovadoras⁹. Asimismo, no está claro el porcentaje de la población total de la pulpa con multipotencialidad. Por lo tanto la presente investigación tuvo como objetivo general determinar la

multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental humana mediante la expresión positiva y negativa de marcadores. De modo que las células madre derivadas de la pulpa dental ofrecen una gran esperanza cada vez más significativa en medicina y odontología regenerativa.

MATERIALES Y METODOS

El presente estudio utilizó la población celular obtenida de 04 terceras molares post exodoncia de pacientes atendidos en el Centro Odontológico de la Universidad de San Martín de Porres. Los pacientes fueron informados del presente estudio y firmaron el consentimiento informado de donación voluntaria de sus dientes extraídos, aceptando colaborar en el estudio. El paciente realizó enjuagatorios con Clorhexidina 0.12% por 1 minuto antes de la exodoncia. Inmediatamente después de la exodoncia el diente fue depositado en un tubo estéril que contenía: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, siglas en inglés) (Sigma, Saint Louis); medio de transporte con Bbaja glucosa 1 g/litro, bicarbonato de sodio, piruvato de sodio y L-glutamina, antibióticos (Penicilina 100 U/ml y Estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$) y Anfotericina B 250 $\mu\text{g/ml}$.

El transporte del diente se realizó en cadena de frío para luego ser procesados en el Laboratorio de Investigación de la Universidad San Martín de Porres, se procedió a la limpieza del diente y se sometió el diente a tres baños. Luego se procedió a fracturar el diente y se separaron los restos de la pulpa dental en trozos pequeños para realizar la digestión enzimática con 3 mg / ml de colagenasa tipo I (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) y 4 mg/ml de Dispasa tipo II (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 45 minutos en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y 3% O₂. Al finalizar el tiempo de incubación, se filtraron los restos pulpares y se llevaron a centrifugar por 10 minutos. Se resuspendió en Solución Salina Tamponada con fosfato (FBS, siglas en inglés) y se mezcló con el colorante azul de tripán para determinar la viabilidad de la población celular. Para determinar la expresión de los marcadores de multipotencialidad se trasladó la muestra al Instituto de Investigación y Aplicación Celular y se utilizó el citómetro de flujo BD FACSCanto*II (Becton Dickinson, San Jose).

Se añadieron los siguientes marcadores ligados a sus fluorocromos: CD90-FITC (BD Pharmingen™, San Diego), CD105-PE (BD Biosciences, San José), CD34-PerCP-Cy 5-5 (BD Biosciences, San José), CD117-PE (BD Biosciences, San José), CD11b-APC (BD Biosciences, San José), CD3-APC (BD Biosciences, San José), CD45-V450 (BD Biosciences,

San José), y se mantuvo durante 30 minutos a En toda población celular se encuentran glóbulos rojos, por lo tanto se agregó 1 ml de solución lisante a base de amonio (BD FACS™ Lysing Solution, San José) y se mantuvo a temperatura ambiente por un tiempo de 15 minutos. Se centrifugó por 5 minutos. Finalmente se llevó la muestra al citómetro de flujo BD FACSCanto*II. Para la viabilidad celular se centrifugó por 4 minutos la suspensión celular y se añadió colorante 7 AAD (Beckman Coulter Stem-Kit™ Reagents, San José) y se mantuvo por 30 minutos a una temperatura de 18°C. Se volvió a centrifugar el tubo en las mismas condiciones y finalmente se llevó al citómetro Beckman Coulter. Todos los datos se registraron en el Software de Adquisición “BD FACSDIVATM Software-BD Biosciences”.

RESULTADOS:

En el estudio se emplearon 04 molares correspondientes a 04 pacientes con un rango de 18-30 años de edad, con el objetivo de determinar la multipotencialidad de la población celular de la pulpa dental de dientes humanos. Se utilizó el análisis por criometría de flujo mediante marcadores de multipotencialidad.

Según la SITC la expresión de antígenos CD90 y CD105 debe ser positiva frente a presencia de células mesenquimales y la expresión de los antígenos CD45, CD34, CD3, CD117, CD11b deben ser negativa debido a que son marcadores de células hematopoyéticas18.

Mediante el uso del programa “BD FACSDIVATM Software- BD Biosciences” se facilitó un “Dot Plot” (Figura 1) donde se expresó el FSC y SCC separando subpoblaciones que compartían un tamaño y complejidad dentro de la muestra.

En la figura 2A se observa el histograma de la población celular de una pulpa dental humana. Se encuentra en escala logarítmica decimal, donde la región color verde y fucsia representa la población celular y la región color rojo por consiguiente, el control de linfocitos. Se relaciona el eje “X” y eje “Y”, correspondientes al número de células y la intensidad de fluorescencia, respectivamente. Las escalas logarítmicas son de gran importancia debido a que agrupa señales altas y logra distinguir al control negativo. Los rangos que se obtuvieron de los marcadores positivos para células madre mesenquimales fueron para CD90 (57.25%-66.21%), del marcador CD105 (21.59%-2.69%) y negativo (0%) a los marcadores CD45, CD34, CD11b, CD3, CD117. La interpretación de resultados se ha dado mediante comparación de curvas.

En la figura 2B se observa un diagrama de puntos, donde el eje “X” representa la expresión del marcador CD105-PE y el eje “Y” la expresión del marcador CD90-FITC. Ambas expresiones fueron positivas para células madre mesenquimales, demostraron un gran tamaño y complejidad dentro de la muestra.

En la figura 3, se observa un gráfico de puntos para la viabilidad celular, donde el primer cuadrante “G” indica las células vivas. El rango que se obtuvo del marcador 7-AAD fue de (77.11%-96.41%). Por lo tanto, a mayor intensidad de fluorescencia aumenta la muerte celular.

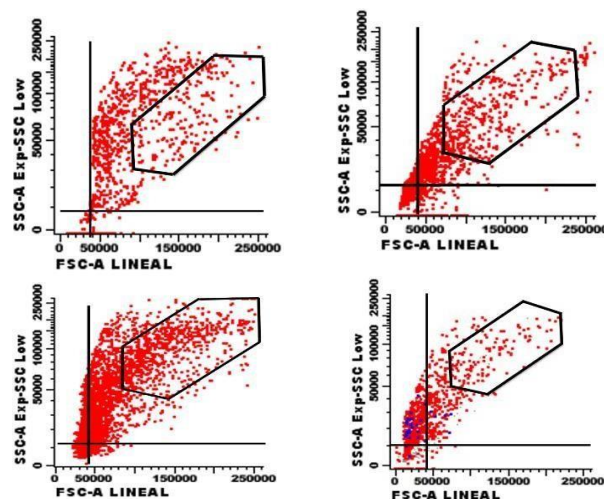


Figura 1: "Dot plot" que relaciona el tamaño celular con su complejidad de 04 muestras de poblaciones celulares

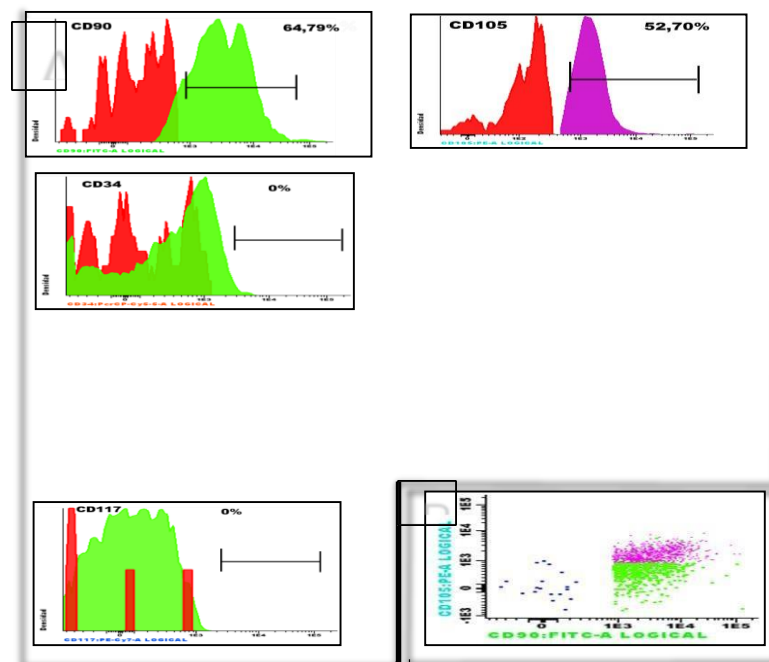


Figura 2. A. Histogramas con el análisis mediante citometría de flujo: Marcadores que expresan multipotencialidad CD90 (64.79%), CD105 (52.70%), CD45 (0%), CD34 (0%), CD117 (0%), CD11b (0%), CD3 (0%). B. Diagrama de puntos para CMPD con doble tinción. Los resultados son representativos de cuatro experimentos

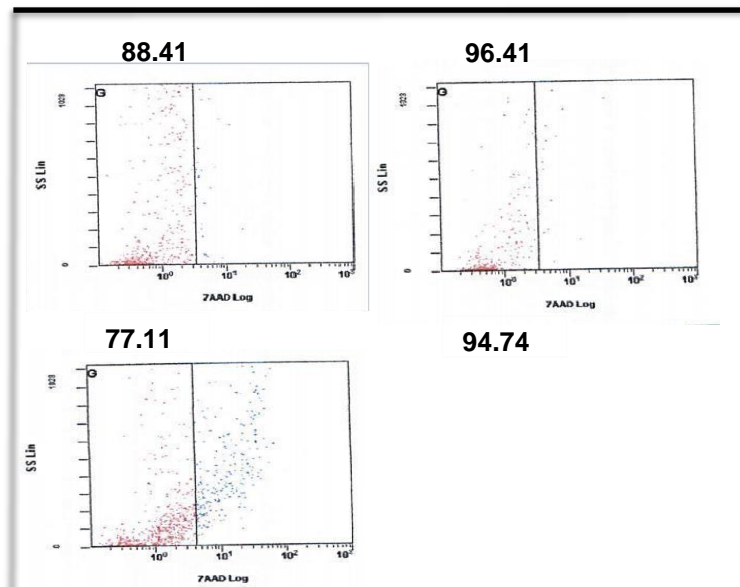


Figura 3: Análisis mediante citometría de flujo: 7-AAD; Marcador que expresa viabilidad en un rango de (77,11%-96,41%).

DISCUSIÓN

El presente estudio demostró la expresión de marcadores de membrana frente a células madre de la pulpa dental humana. Siguiendo con los criterios del SITC, las células madre deben ser positivas a los marcadores CD90, CD105 y negativas a CD45, CD34, CD117, CD11b y CD3. Se obtuvo un rango positivo para los marcadores CD90 (57.25%-66.21%), CD105 (10%-2.69%) y un rango negativo (0%) para CD45, CD34, CD117, CD11b, CD3. Sin embargo actualmente no existe un perfil fenotípico universal aceptado para la caracterización de células madre, por lo tanto se utiliza un perfil de expresión génica con marcadores de membrana que podrían variar por diferentes razones, diferencia de tiempo de aislamiento, cultivo y medio ambiente. La expresión positiva o negativa de los presentes marcadores mediante el análisis de citometría de flujo no confirma la existencia de células madre, pero si existe la probabilidad que lo sean.

Atari *et al.* analizaron la expresión de los marcadores mediante citometría de flujo. Los marcadores que utilizaron fueron CD105 con un porcentaje de expresión 90.77%, CD73 con 72%, CD34 con 0.06% y CD45 con 0.02%¹⁰. Por lo tanto estos marcadores cumplieron los criterios del SITC al igual que este estudio pero contrastan en los resultados en mayor porcentaje de expresión. Este resultado se puede atribuir, que ellos analizaron la muestra por citometría de flujo luego de realizar cultivos, a diferencia del presente estudio el cual no se ha realizado cultivos.

Jang *et al.* compararon tres métodos de aislamiento de células madre, por disgregación enzimática, explante y combinación de ambas. Utilizaron los marcadores CD105, CD90, CD73, CD45, CD34.

Como resultado los porcentajes por disgregación enzimática fueron de menor valor, CD105 se expresó 80.5% y CD73 en 98.3%, excepto el marcador CD90 siendo el más alto porcentaje 97.8% entre los tres métodos¹¹. Valores que son mayores en comparación a la presente investigación y que puede deberse por el aislamiento por una mejor disgregación enzimática. Ellos utilizaron colagenasa, dispasa, tripsina y realizaron cultivos para así analizar por citometría de flujo. En el presente estudio se utilizó solo colagenasa y dispasa para separar toda la población celular de la pulpa dental.

Patil *et al.* evaluaron la caracterización fenotípica de las células madre la pulpa dental, de la papila dental y del folículo dental. Los marcadores que utilizaron fueron CD90, CD73, CD34 y CD45. CD90 para las CMPD se expresó en 99.5% y CD73 se expresó en 97.3%¹². A diferencia, el presente estudio utilizó los marcadores CD90, CD34 y CD45 pero no alcanzó un alto nivel de porcentaje. Puede deberse a que ellos analizaron por citometría de flujo a las dos semanas luego de alcanzar una confluencia del 70%. La presente investigación se analizó inmediatamente después de obtener la población celular de la pulpa dental.

Ponnaiyan *et al.* compararon el análisis fenotípico de las células madre de la pulpa dental y del ligamento periodontal mediante los marcadores CD105, CD90, CD34 y CD45. CD105 expresó 23.2 %, CD90 (99.5%), CD34 (0.5%) y CD45 (0.05%)¹³. Estos resultados coinciden con la presente investigación por la baja expresión del marcador CD105, que expresó 21.59%. Puede ser debido al origen ectomesenquimal propio del diente.

Asimismo, Ponnaiyan *et al.* Compararon la expresión de los marcadores de las células madre provenientes de la pulpa dental y de la médula ósea. Utilizaron los marcadores CD29, CD90, CD105, CD34 y CD45. CD90 y CD29 tuvieron un alto porcentaje >90 %, mientras que CD105 expresó un nivel bajo, 34.59% para CMPD¹⁴. Teniendo como base estudios anteriores, el marcador CD105 se expresa aunque en niveles muy bajos en células progenitoras hematopoyéticas, por lo tanto se asocia a la hematopoyesis junto a la migración celular¹⁴. Por lo cual coincide en el presente estudio el bajo de nivel de expresión con el marcador CD105.

Se ha demostrado que células madre del tejido adiposo al ser recientemente aisladas expresa niveles bajos del marcador CD105 pero con los pasajes de cultivo el porcentaje se vuelve más alto¹⁵.

Los resultados hallados en este estudio demuestran que la población celular de la pulpa dental humana expresa los marcadores requeridos por el SITC evidenciando así que la población celular de la pulpa dental presenta un alto nivel de expresión de multipotencialidad.

De esta manera se busca abrir una nueva línea de investigación en el Perú, siendo a nuestro conocimiento el primer estudio realizado en nuestro país sobre el tema de células madre de un diente. Sin embargo, se requiere agregar más pruebas como PCR e Inmunocitoquímica para una mejor determinación de células madre de la pulpa dental humana.

Se concluye que según el protocolo la población celular de la pulpa dental humana presenta expresión de multipotencialidad. Utilizando los marcadores de multipotencialidad, la expresión de CD90 positiva fue moderada para identificación de células madre. La expresión de CD105 para células madre fue positiva baja y la expresión de CD34, CD45, CD11b, CD117 y CD3 fue negativa.

Contribuciones de autoría: MYAL participó en el diseño del estudio, recolección de datos y análisis de resultados. RAH participó en el diseño, el análisis de resultados y brindó asesoría. La redacción del artículo fue aprobada por todos los participantes.

Fuente de financiamiento: Financiado por los autores

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Villa García-Torres, Flores Hernández, Santibáñez-Escobar. Células madre de la pulpa dental (DPSC): prospectivas terapéuticas en enfermedades crónico degenerativas. *Salud Jalisco*. 2017 Septiembre; 4(3):168-77.
- Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb; 12(2):126-31.
- Flores-Figueroa E, Montesinos J, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia biología y aplicación clínica. *Rev. Invest. Clin*. 2006; 58(5):498-511.
- Jucht D, Rujano R, Romero M, Rodon L. Utilización de células madre en el ámbito odontológico. Revisión de la literatura. *Acta Bioclinica [Revista en Internet]*. 2014 [Consultado 5 Julio de 2017]; Disponible en:<http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinical/Article/view/4966>.
- Betancourt K, Barciela J, Guerra Menéndez J, Cabrera N. Uso de células madre en el complejo bucofacial. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2012; 16(5):651-61.
- Valencia R, Espinosa R, Sadia M, Velasco Neri J, Nario H. Panorama actual de las células madre de la pulpa de dientes primarios y permanentes. *Rodyb* 2013; 2(2):1-33.
- González Orta L, Font Rytzner A. Investigación con células madre de origen dentario. Actualización. *Gaceta Dental*. [Revista en Internet]. 2011 Mar 23 [Consultado 10 Julio de 2017] Disponible en <https://www.gacetadental.com/2011/09/investigacion-con-celulas-madre-de-origen-dentario-actualizacion-25547>.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular. Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-7.
- Liang Z, Kawano S, Chen W, Sadrkhani MS, Lee C, Kim E, Moshaverinia A, Kim RH, Kang MK. Minced Pulp as Source of Pulpal Mesenchymal Stem Cells with Odontogenic Differentiation Capacity. *J Endod*. 2018 Jan; 44(1):80-6.
- Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M, García-Fernández D, Barajas M, Carrasco MA, Jung HS, Alfaro FH, Casals N, Prosper F, Ferrés-Padró E, Giner L. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci*. 2012 Jul 15; 125(Pt 14): 3343-56.
- Jang JH, Lee HW, Cho KM, Shin HW, Kang MK, Park SH, Kim E. In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods. *RDE*. 2016 Nov; 41(4):283-95.
- Patil R, Kumar BM, Lee WJ, Jeon RH, Jang SJ, Lee YM, Park BW, Byun JH, Ahn CS, Kim JW, Rho GJ. Multilineage potential and proteomic profiling of human dental stem cells derived from a single donor. *Exp Cell Res*. 2014 Jan 1; 320(1):92-107.

13. Ponnaiyan D, Bhat KM, Bhat GS. Comparison of immuno-phenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. *Int J Immunopath Ph.* 2012 Jan-Mar; 25(1):127-34.
14. Ponnaiyan D, Jegadeesan V. Comparison of phenotype and differentiation marker gene expression profiles in human dental pulp and bone marrow mesenchymal stem cells. *Eur J Dent.* 2014 Jul; 8(3):307-13.
15. Varma M, Breuls R, Schouten T, Jurgens W, Bontkes H, Schuurhuis G, Van Ham S, Van M. *Stem Cells Dev.* 2007;16 (1): 91-104