

Actualización

Método de obtención de células madre de ligamento periodontal

Method to obtain stem cells from the periodontal ligament

AUTORES

DR. CLAUDIO M. FADER KAISER

Profesor Adjunto. Cátedra de Bioquímica General y Estomatológica. Facultad de Odontología. UNCuyo.

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en Biología Celular.

Director del Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Glóbulo Rojo. Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM-CONICET-UNCuyo).

Codirector del Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO). Facultad de Odontología. UNCuyo.

Investigador Adjunto del CONICET.

Financiamiento del proyecto: SIIP tipo 4

Email: cfader@fodonto.uncu.edu.ar; cfader31@gmail.com

DR. SERGIO A. CARMINATI

Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra de Bioquímica General y Estomatológica. Facultad de Odontología. UNCuyo.

Doctor en Ciencias Biológicas.

Personal de Apoyo del CONICET

ESP. OD. CARLOS BOSSHARDT

Profesor Titular. Cátedra de Cirugía y Traumatología Bucomaxilofacial II y III. Facultad de Odontología. UNCuyo.

Especialista en Cirugía y Traumatología Bucomaxilofacial.

Vicedecano de la Facultad de Odontología. UNCuyo.

Presidente de la Sociedad de Cirugía y Traumatología Bucomaxilofacial. Círculo Odontológico de Mendoza.

ESP. OD. GONZALO ARIAS

Prof Titular Efectivo Cátedra Cirugía y Traumatología Bucomaxilofacial I. Facultad de Odontología. UNCuyo

Especialista en Cirugía y Traumatología Bucomaxilofacial. Jefe de Servicio de Cirugía y Traumatología Bucomaxilofacial. Hospital L. C. Lagomaggiore

DÁMARIS LEOS MORETA

Estudiante de 5to año de Odontología. Facultad de Odontología. UNCuyo.

Becaria CIN (Consejo Interuniversitario Nacional) en el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO). Facultad de Odontología. UNCuyo.

ISRAEL ACEVEDO

Estudiante de 5to año de Odontología. Facultad de Odontología. UNCuyo.

Becario en el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO). Facultad de Odontología. UNCuyo.

SOFÍA NIELLA

Estudiante de 5to año de Odontología.

Becario en el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO). Facultad de Odontología. UNCuyo.

MILAGROS YANZÓN

Estudiante de 5to año de Odontología.

Becario en el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO). Facultad de Odontología. UNCuyo.

LEANDRO ALANIZ

Estudiante de 2do año de Odontología.

Becario en el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO). Facultad de Odontología. UNCuyo.

RESUMEN

Las posibles aplicaciones terapéuticas de las células madre estromales mesenquimales (MSC) han despertado un

ABSTRACT

The possible applications of mesenchymal stromal stem cells (MSC) have aroused great interest in the field of biomedical

Método de obtención de células madre de ligamento periodontal

Dr. Claudio M. Fader Kaiser; Dr. Sergio A. Carminati; Esp. Od. Carlos Bosshardt; Esp. Od. Gonzalo Arias; Dámaris Leoz Moreta; Israel Acevedo; Sofia Niella; Milagros Yanzón; Leandro Alaniz

gran interés en el campo de la ingeniería biomédica como terapia regenerativa. Las MSC son células madre adultas multipotentes que poseen un alto potencial de diferenciación, baja inmunogenicidad, propiedades inmunomoduladoras y capacidad de expansión in vitro eficiente. Además, se ha demostrado que las células madre de origen dental producen una mejora de la dentina terciaria, regeneración del ligamento y del hueso, permiten la implantación de tejido pulpar vital, reparación de deficiencias esqueléticas craneofaciales. También es digna de mención su capacidad para interactuar con multitud de materiales biológicos (biomateriales). En este trabajo mostramos la metodología a través de la cual obtuvimos células madre de ligamento periodontal humano (hPDLSC), con la finalidad de generar un banco de hPDLSC, las cuales serán utilizadas en ensayos de maduración y diferenciación a células productoras de matriz ósea (osteoblastos), para su futura aplicación en la práctica clínica.

Palabras claves: Células madre. Ligamento periodontal. Terapia regenerativa.

engineering as regenerative therapy. MSCs are multipotent adult stem cells that possess high differentiation potential, low immunogenicity, immunomodulatory properties, and efficient in vitro expansion capacity. In addition, stem cells of dental origin have been shown to produce an improvement in tertiary dentin, regeneration of ligament and bone, allow the implantation of the vital pulp tissue, and repair of craniofacial skeletal deficiencies. It is also necessary to mention its ability to interact with a multitude of biological materials (biomaterials). In this work, we show the methodology through which we obtained human periodontal ligament stem cells (hPDLSC), to generate a bank of hPDLSC, which will be used in maturation and differentiation assays to bone matrix-producing cells (osteoblasts), for its future application in clinical practice.

Key words: Stem cells. Periodontal ligament. Regenerative therapy

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, el uso de las células madre en la práctica clínica, para tratar distintas patologías, se ha incrementado de forma exponencial. Se sabe que en los tejidos adultos existe una alta cantidad de células madre capaces de ser utilizadas con este propósito gracias a sus propiedades regenerativa (1,2). Las células madre mesenquimales (MSC) son células multipotenciales primitivas, con morfología fibroblastoide, originadas a partir de la capa germinal mesodermal, que se autorenewan y son capaces de diferenciarse a otros linajes como el osteogénico, condrogénico, adipogénico, eritropoyético y miogénico, aunque también se ha demostrado su capacidad de diferenciarse a células de origen no mesenquimal como las del tejido nervioso (3-6). Se han establecido tres criterios mínimos para definir las MSC humanas. El primero corresponde a la capacidad de adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; el segundo, al fenotipo celular determinado idealmente por cito-

metría de flujo en la que las células madre mesenquimales deben expresar proteínas específicas tales como los CD (Cluster of differentiation); y el tercero, hace referencia a la capacidad de diferenciarse in vitro a los linajes osteogénico, condrogénico, hematopoyético y adipogénico (4,5).

En el tejido dental existe un gran número de células madre mesenquimales (MSC), que poseen una alta capacidad regenerativa. Estas son células de tipo multipotenciales, las cuales se pueden obtener de la pulpa dental, del ligamento periodontal, de dientes primarios exfoliados, de la papila dental y del foliculo dental en determinados tejidos, pudiendo dar origen a linajes celulares diferentes al suyo original. En cuanto a lo estrictamente técnico, las MSC obtenidas de los tejidos dentales son células fáciles de obtener y de expandir en cultivo. Por otro lado, su gran plasticidad y su capacidad de migrar hacia los tejidos lesionados las hacen extremadamente útiles para ser utilizadas como terapia regenerativa. Además tienen propiedades inmunomoduladoras,

antiapoptóticas y antifibróticas(7, 8). También son capaces de promover la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), producir múltiples tipos de tejido conectivo, como el hueso, y disminuir la respuesta inflamatoria. Por otro lado, se ha demostrado científicamente que las células madre de origen dental aportan: mejora de la dentina terciaria, regeneración del ligamento y del hueso, permiten la implantación de tejido pulpar vital, reparación de deficiencias esqueléticas craneofaciales. También es digna de mención su capacidad para interactuar con multitud de materiales biológicos (biomateriales).

El ligamento periodontal es un tejido conectivo fibroso altamente especializado que se encuentra ubicado entre el cemento que cubre a la raíz dental y el hueso que forma el alveolo (posee 0,2mm de espesor), el cual provee resistencia mecánica. Es un tejido altamente vascularizado, lo cual refleja alto contenido de constituyentes celulares y extracelulares. La porción celular incluye osteo-

Método de obtención de células madre de ligamento periodontal

Dr. Claudio M. Fader Kaiser; Dr. Sergio A. Carminati; Esp. Od. Carlos Bosshardt; Esp. Od. Gonzalo Arias; Dámaris Leoz Moreta; Israel Acevedo; Sofia Niella; Milagros Yanzón; Leandro Alaniz

blastos y osteoclastos (contenidos en el ligamento y asociados funcionalmente a hueso), fibroblastos, células epiteliales de Malassez, macrófagos, cementoblastos y células madre mesenquimales. Las MSC obtenidas del ligamento periodontal de dientes humanos (hPDLSC) son fáciles de cultivar, pudiendo expresar marcadores de superficie, como Stro1, CD105 (endoglina, antígeno SH2), CD29 (integrina beta 1), CD173 (ecto-5'-nucleotidase) y CD90 (Thy-1) (9). De forma interesante se ha observado que las hPDLSC pueden generar células formadoras de colágeno, adipocitos, cementoblastos células, osteoblastos y condrocitos in vitro (8, 10). Por otro lado, estudios alentadores en el área de la odontología regenerativa han demostrado que las hPDLSC pueden generar una raíz biológica, cuando son cultivadas junto con el tejido periodontal adyacente (11-14). El tejido periodontal rodea a la raíz y aparentemente, tenía una relación natural y biológica con el hueso que lo rodeaba. Sin embargo, la fuerza mecánica que poseía esta raíz, era un tercio menor que la de las raíces naturales ya que no se generó el mismo tipo de dentina que la presente en un diente natural, lo que se comprobó con la detección de hidroxapatita residual. Esto demuestra que si bien los avances son prolíficos, aún faltan ensayos que nos permitan comprender todo el proceso.

Con el fin de desarrollar un modelo para la aplicación clínica de las hPDLSC en patologías odontológicas, se desarrolló un protocolo de obtención de dichas células a partir de la exodoncia de premolares sanos. Así mismo, se caracterizó el perfil de proteínas de superficie de las células aisladas, como también su capacidad de crecimiento in vitro. Finalmente, se criopreservaron en nitrógeno líquido, con la finalidad poder ser utilizadas en futuros ensayos de maduración y diferenciación celular a osteoblastos. Debido a la capacidad de diferenciación que poseen las hPDLSC a células productoras



Figura 1a: Obtención de hPDLSC. Recepción de las muestras desde las clínicas de la F.O.



Figura 1b: Obtención de hPDLSC. Traslado de la pieza dental en medio con suero y antibiótico.

de matriz ósea, nuestros estudios podría llegar a ser una estrategia exitosa en la búsqueda de una nueva alternativa para su administración y aplicación clínica en medicina regenerativa.

MÉTODO Y RESULTADO Obtención de células madre de ligamento periodontal

Mediante cirugía programada por la Cátedra de Cirugía, en las clínicas odontológicas de la FO, de la UNCuyo, y previo consentimiento informado, se obtuvieron premolares sanos. Dichas muestras, fueron transportadas en medio completo (D-MEN, 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina-estreptomina (figura 1a y b). Posteriormente, se procedió al raspado del ligamento periodontal en una caja de Petri con medio de cultivo D-MEN. Dicho proceso, se realizó en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar. El líquido, conteniendo el raspado del ligamento periodontal, se recolectó en tubos de 1,5 ml y se centrifugó a 2500 RPM. Luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en buffer PBS/tripsina, durante 5 min, a fin de disgregar el tejido obtenido. La muestra se centrifu-

gó nuevamente a 2500 RPM y se eliminó el sobrenadante. El nuevo pellet obtenido, se resuspendió en medio de cultivo completo y se colocó en placas de cultivo celular de 6 pocillos (Figura 2a y b). Posteriormente, la placa se ubicó dentro del incubador de CO₂, a 37°C, para favorecer el crecimiento celular. La morfología celular, así como el crecimiento en monocapa de dichas células, se observó mediante microscopía de luz transmitida (Figura 3). Nuestros resultados indicaron que las células aisladas del ligamento periodontal de los premolares sanos, crecieron sobre un soporte plástico en condiciones estándar de cultivo y presentaron una morfología alargada y estirada (tipo fibroblastos), características de las hPDLSC.

Caracterización de las células obtenidas del ligamento periodontal

Luego de 3 semanas de cultivo, las células que crecieron fueron recolectadas y caracterizadas por citometría de flujo, a fin de determinar su linaje específico como hPDLSC. En este ensayo se determinó, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos, la presencia de

Método de obtención de células madre de ligamento periodontal

Dr. Claudio M. Fader Kaiser; Dr. Sergio A. Carminati; Esp. Od. Carlos Bosshardt; Esp. Od. Gonzalo Arias; Dámaris Leoz Moreta; Israel Acevedo; Sofia Niella; Milagros Yanzón; Leandro Alaniz



Figura 2a: Raspado del ligamento periodontal en condiciones de asepsia, bajo campana de flujo laminar.

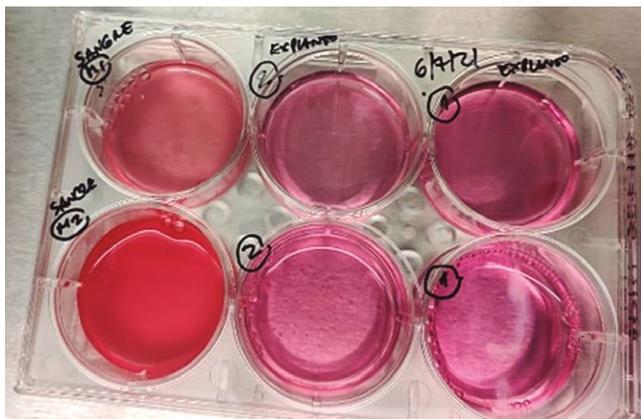


Figura 2b: Cultivo en placa, de la disgregación del ligamento periodontal, en estufa de cultivo celular a 37°C y 5% CO₂.

distintas proteínas de superficie celular o CDs. Nuestros resultados determinaron que las células aisladas del ligamento periodontal fueron positivas para los marcadores de superficie específicos de las hPDLSC, tales como los CD105, CD90, CD73 y CD29 y negativas (control negativo) para los marcadores CD31 y CD106. Estos resultados evidenciaron el éxito de nuestra técnica de aislamiento de hPDLSC, a partir de premolares sanos (Figura 4). Luego del proceso de caracterización, las células aisladas se expandieron en cultivo y se congelaron en nitrógeno líquido

(criopreservación), con el fin de generar un banco de hPDLSC, las cuales serán utilizadas en ensayos de maduración y diferenciación a células productoras de matriz ósea (osteoblastos).

CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

La ingeniería tisular y regenerativa basada en el uso de las células madre de origen dental tiene un futuro prometedor dentro de las ciencias sanitarias. Para poder hablar de la terapéutica basada en el empleo de células madre es muy importante comprender el concepto de transdiferen-

ciación: «Capacidad de las células madre para ser transplantadas bajo determinadas condiciones en determinados tejidos y dar origen a linajes celulares diferentes al suyo original».

En la actualidad, la reparación de defectos óseos que se producen por trauma, tumores, infecciones, trastornos bioquímicos, tratamientos como por ejemplo, la exodoncia, requiere una intervención quirúrgica y de la utilización de materiales como hueso autólogo (del mismo paciente), hueso heterólogo (de un donante), matrices desmineralizadas, biomateriales



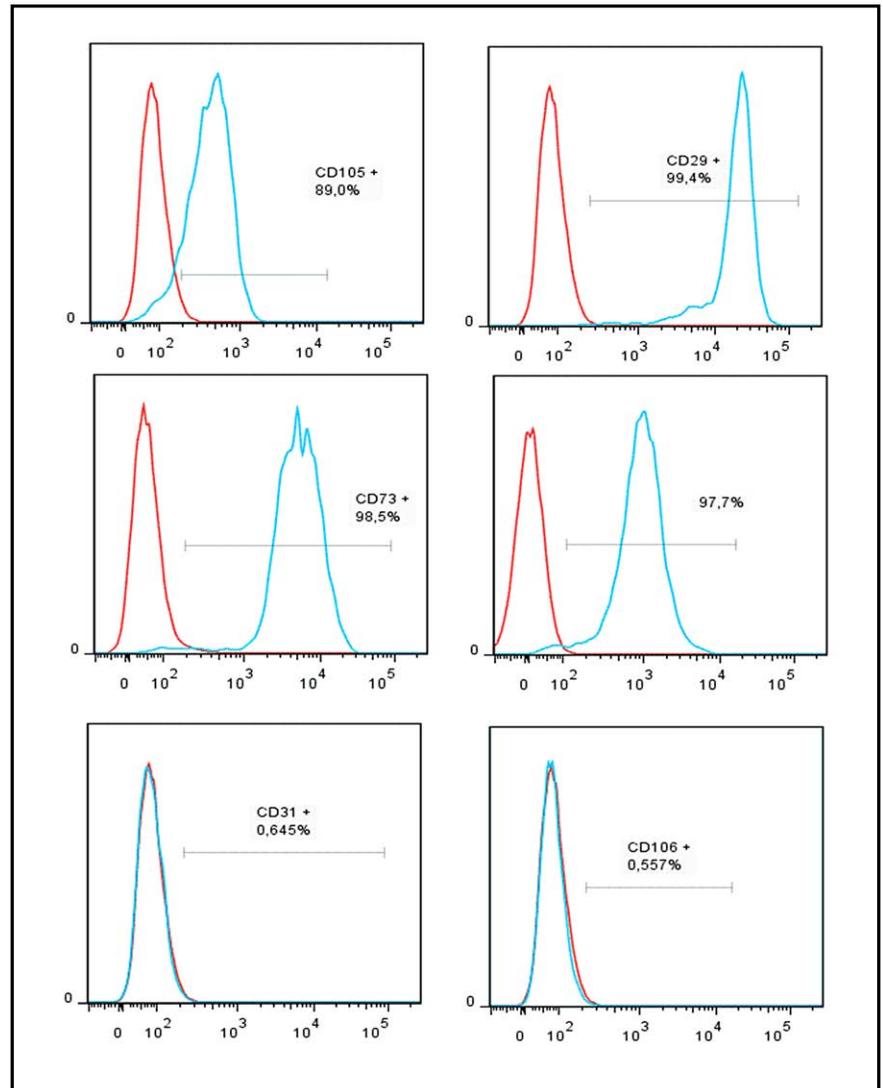
Figura 3: hPDLSC. Microscopía de luz transmitida de nuestro cultivo de células madres humanas de ligamento periodontal. Aumento 40x.

Método de obtención de células madre de ligamento periodontal

Dr. Claudio M. Fader Kaiser; Dr. Sergio A. Carminati; Esp. Od. Carlos Bosshardt; Esp. Od. Gonzalo Arias; Dámaris Leoz Moreta; Israel Acevedo; Sofía Niella; Milagros Yanzón; Leandro Alaniz

Figura 4:

Caracterización de hPDLSC. Se caracterizaron las células mediante la detección, por citometría de flujo, de marcadores específicos de superficie celular (CD o Cluster of differentiation). Los histogramas muestran que las células fueron positivas para CD 105, CD29, CD73 y CD90 y negativas para CD31 y CD106. Línea roja: autofluorescencia. Línea azul: marcador de superficie.



sintéticos como metales, cerámicas, polímeros, etc. para subsanar dichas alteraciones. El uso de injertos óseos tiene varias desventajas: por un lado, los condicionamientos legislativos y, por otro lado la escasez de donantes, la transmisión de enfermedades, la morbilidad del sitio de extracción, etc. Los materiales anteriormente nombrados son incapaces de remodelarse y reaccionar ante determinadas condiciones fisiológicas, presentan un alto porcentaje de pérdidas por complicaciones como la falta de unión, la reabsorción osteoclástica, la mayor prevalencia de microfracturas y la disminución de la densidad mineral ósea.

Para reducir tales problemas, la ingeniería regenerativa de tejidos se ha convertido en una estrategia encaminada a reparar, reconstruir o regenerar tejido vivo utilizando células y biomoléculas en una matriz tridimensional para la formación y el crecimiento de los nuevos tejidos a ser empleados en la reconstitución morfológica y funcional del tejido perdido.

En los últimos años la investigación odontológica ha avanzado notoriamente, acercando el laboratorio a los consultorios clínicos. La investigación en curso más valiosa que posee la odontología regenerativa es el estudio de las células madre, las cuales, junto a la utilización de la terapia génica, están consideradas como uno de los futuros más prometedores de la Medicina.

En conclusión, la importancia de la obtención de las hPDLSC se ve claramente

al tomar en cuenta las posibles múltiples aplicaciones terapéuticas en las que pueden ser implementadas. Su gran potencial de proliferación y su capacidad de diferenciación han hecho que sean muy atractivas para las terapias regenerativas. En lo que concierne a la odontología, la reparación de defectos óseos que se producen por trauma, tumores o tratamientos son situaciones clínicas en las cuales el uso de estas células madre podrían subsanar dichas alteraciones.

Nuestros resultados abren un abanico de posibilidades importante para nuestro grupo de investigación, dentro del CIO-FO-UNCuyo (Centro de Investigaciones Odontológicas), en el campo de la biología celular y molecular, ya que en un futuro cercano podremos utilizar dichas células para el estudio y generación de modelos de terapia regenerativa, siendo un objetivo importante y ambicioso su posterior uso en la práctica odontológica.

Método de obtención de células madre de ligamento periodontal

Dr. Claudio M. Fader Kaiser; Dr. Sergio A. Carminati; Esp. Od. Carlos Bosshardt; Esp. Od. Gonzalo Arias; Dámaris Leoz Moreta; Israel Acevedo; Sofia Niella; Milagros Yanzón; Leandro Alaniz

BIBLIOGRAFÍA

1. ZHANG X, TANG T, SHI Q, FERNANDES JC, DAI K. *The immunologic properties of undifferentiated and osteogenic differentiated mouse mesenchymal stem cells and its potential application in bone regeneration. Immunobiology.* 2009;214:179-86.
2. SETHE S, SCUTT A, STOLZING A. *Aging of mesenchymal stem cells. Ageing Res Rev.* 2006;5:91-116.
3. SALASZNYK RM, KLEES RF, WILLIAMS WA, BOSKEY A, PLOPPER GE. *Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Exp Cell Res.* 2007;313:22-37.
4. MEIRELLES LDA S, FONTES AM, COVAS DT, CAPLAN AI. *Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:419-27.
5. SALEM HK, THIEMERMANN C. *Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. Stem Cells.* 2010;28:585-96.
6. KRAMPERA M, PIZZOLO G, APRILI G, FRANCHINI M. *Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. Bone.* 2006;39:678-83.
7. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, ET AL. *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science.* 1999;284:143-7.
8. C. GARCÍA SAMARTINO, S.A. CARMINATI, M. AGUILERA, M. MORAS, M.A. OSTUNI, C.M. FADER. *Método de obtención de células madre de cordón umbilical y su potencial uso en la odontología y hematología. Facultad de Odontología.* 2019. 13; 13-19
9. YAMADA Y, FUJIMOTO A, ITO A, YOSHIMI R, UEDA M. *Cluster analysis and gene expression profiles: A cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. Biomaterials.* 2006;27:3766-81.
10. KAWANABE N, MURATA S, MURAKAMI K, ISHIHARA Y, HAYANO S, KUROSAKA H, ET AL. *Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. Differentiation.*
11. LEVI B, LONGAKER MT. *Osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells in mouse and human: In vitro and in vivo methods. J Craniofac Surg.* 2010;22:388-91.
12. LEVI B, NELSON ER, BROWN K, JAMES AW, XU D, DUNLEVIE R, ET AL. *Differences in osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells from murine, canine, and human sources in vitro and in vivo. Plast Reconstr Surg.* 2010;128:373-86.
13. SHANTI RM, LI WJ, NESTI LJ, WANG X, TUAN RS. *Adult mesenchymal stem cells: Biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:1640-7.
14. BEHNIA H, KHOJASTEH A, SOLEIMANI M, TEHRANCHI A, KHOSHZABAN A, KESHEL SH, ET AL. *Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108:e1-6.